

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE : 3MPL

Année 2012

Structure et interactions moléculaires
d'agonistes et de modulateurs allostériques
des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie
Spécialité : Chimie Physique

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Alexandre Atkinson

Le 21 décembre 2012, devant le jury ci-dessous

| | |
|-------------|--|
| Président | Bernard OFFMANN, Professeur, Université de Nantes |
| Rapporteurs | Ronan BUREAU, Professeur, Université de Caen Gilles GREGOIRE, Chargé de Recherche CNRS, Université Paris 13 |
| Examineurs | Jérôme GRATON, Maître de Conférences, Université de Nantes Jean-Yves LE QUESTEL, Professeur, Université de Nantes Thérèse MALLIAVIN, Chargée de Recherche CNRS, Institut Pasteur |

Directeurs de thèse : M. Jean-Yves LE QUESTEL et Jérôme GRATON

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTÉ DES SCIENCES ET DES TECHNIQUES

ÉCOLE DOCTORALE : 3MPL

Année 2012

Structure et interactions moléculaires
d'agonistes et de modulateurs allostériques
des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Chimie
Spécialité : Chimie Physique

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Alexandre Atkinson

Le 21 décembre 2012, devant le jury ci-dessous

| | |
|-------------|--|
| Président | Bernard OFFMANN, Professeur, Université de Nantes |
| Rapporteurs | Ronan BUREAU, Professeur, Université de Caen Gilles GREGOIRE, Chargé de Recherche CNRS, Université Paris 13 |
| Examineurs | Jérôme GRATON, Maître de Conférences, Université de Nantes Jean-Yves LE QUESTEL, Professeur, Université de Nantes Thérèse MALLIAVIN, Chargée de Recherche CNRS, Institut Pasteur |

Directeurs de thèse : M. Jean-Yves LE QUESTEL et Jérôme GRATON

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe Modélisation Et Spectroscopie (ModES) du laboratoire CEISAM.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements,

A Messieurs Ronan BUREAU, Professeur du Centre d'Etudes et de Recherches sur le Médicament de Normandie de l'Université de Caen, ainsi que Gilles GREGOIRE, Chargé de Recherche au Laboratoire de Physique des Lasers de l'Université Paris 13 pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs.

A Monsieur Bruno BUJOLI pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire durant ces cinq années.

A Madame Thérèse MALLIAVIN, Chargée de Recherche CNRS à l'Institut Pasteur et à Monsieur Bernard OFFMANN, Professeur à l'Université de Nantes pour avoir accepté d'être examinateurs à ma soutenance de thèse et de juger mon travail.

A mon directeur de thèse le Professeur Jean-Yves LE QUESTEL, responsable de l'équipe ModES pour avoir accepté de me prendre comme doctorant. Je lui suis reconnaissant de m'avoir aidé à obtenir une bourse auprès du CNRS. Je remercie également mon directeur de thèse adjoint Jérôme GRATON, Maître de Conférences. Je tiens à leur exprimer ma

profonde reconnaissance pour l'aide et les conseils avisés qu'ils m'ont apportés au cours de cette thèse et au cours de la rédaction de mon manuscrit.

A Madame Evelyne BAGUET-GENRE-GRANDPIERRE du groupe EBSI du laboratoire CEISAM pour son travail sur la partie RMN.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe ModES du laboratoire CEISAM pour leur bonne humeur et en particulier Eric Renault et Nicolas Galland pour leur aide ponctuelle précieuse dans certaines phases de ce travail.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Introduction | 1 |
| Chapitre 1- Aspect structuraux et fonctionnels des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs). | 9 |
| I] Les nAChRs, membres de la famille de canaux ioniques activés par des ligands (LGIC). | |
| I.1- Le transports des ions à travers les membranes cellulaires. | 11 |
| I.2- Modes d'ouverture du canal ionique. | 11 |
| II] Généralités sur les récepteurs nicotiques. | |
| II.1- Localisation. | 13 |
| II.2- Les nAChRs des protéines multimériques. | 13 |
| II.3- Les différents états possibles des nAChrs. | 15 |
| II.4- Organisation structurale des nAChRs. | 16 |
| II.5- Types de ligands des nAChRs. | 17 |
| II.6- Le domaine de fixation des agonistes. | 18 |
| III] Structure tridimensionnelle des nAChRs. | 20 |
| IV] L'acetylcholine binding protein (AChBP). | |
| IV.1- L'AChBP, un modèle des nAChRs. | 21 |
| IV.2- Types de ligands de l'AChBP. | 22 |
| IV.3- Structure atomique du site de fixation des agonistes. | 23 |
| IV.4- Comparaison des interactions de quelques agonistes. | 24 |
| IV.5- Limites des informations structurales disponibles. | 26 |
| V] Les nAChRs neuronaux : une cible thérapeutique prometteuse. | |
| V.1- La maladie d'Alzheimer (MA). | 27 |
| V.2- La maladie de Parkinson (MP). | 28 |
| V.3- La schizophrénie. | 28 |

| | |
|--|-----------|
| V.4- Les troubles déficitaires de l'attention (TDA). | 29 |
| V.5- L'épilepsie. | 29 |
| V6- L'autisme. | 30 |
| V.7- L'accoutumance. | 30 |
| VI] Conclusion. | 31 |

Chapitre 2- Méthodologies théoriques et expérimentales. 35

A] La banque de données des protéines (PDB) : un outil de choix pour l'étude de la structure et des interactions des nAChRs avec leurs ligands.

| | |
|---|-----------|
| I] Présentation de la PDB. | 37 |
| II] Critères de recherche et méthodologie. | 39 |
| II.1- Conformation du tryptophane. | 40 |
| II.2- Structure du site de fixation. | 41 |

B] La spectroscopie IRMPD

| | |
|--|-----------|
| I] Introduction. | 43 |
| II] Principe. | 44 |
| III] Le Centre Laser Infrarouge d'Orsay (CLIO). | 45 |

C] La spectroscopie IRTF : une méthode puissante pour l'analyse structurale des ligands en solution et l'étude de leurs interactions par liaison H

| | |
|---|-----------|
| I] Introduction. | 47 |
| II] Paramètres thermodynamiques et spectroscopiques accessibles. | |
| II.1- L'échelle pK_{BHX} , une mesure de basicité de liaison H. | 48 |
| II.2- L'échelle spectroscopique $\Delta\nu(OH)$. | 50 |

D] Calculs de chimie quantiques.

| | |
|--|----|
| I] Introduction. | |
| I.1- Présentation générale des méthodes utilisées. | 51 |
| I.2- La méthode Hartree-Fock (HF). | 52 |
| I.3- L'approche Moller-Plesset (MPn). | 54 |

| | | |
|--|--|----|
| I.4- | Le traitement local de la corrélation électronique. | 56 |
| I.5- | La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT). | 58 |
| I.6- | Les bases de fonction. | 61 |
| I.7- | Les méthodes mixtes. | |
| I.7.1- | Généralités. | 63 |
| I.7.2- | Les méthodes basées sur l'utilisation d'un hamiltonien mixte. | 64 |
| I.7.3- | La méthode ONIOM. | |
| 1.7.3.1- | Principe général. | 65 |
| 1.7.3.2- | Traitement de la zone de jonction. | 68 |
| II] | Application à l'étude de la structure et des interactions d'agonistes des nAChRs. | |
| II.1- | Structures et propriétés des différents partenaires. | 69 |
| II.1.1- | Choix des agonistes et méthodologie. | 69 |
| II.1.2- | Analyse conformationnelle. | 70 |
| II.1.3- | Etude d'un motif structural de l'AChBP. | 71 |
| II.2- | Définition d'un modèle 3D pour l'étude des interactions agonistes-AChBP | |
| II.2.1- | Mise au point du modèle. | 72 |
| II.2.2- | Position des agonistes dans le site de fixation. | 74 |
| II.2.3- | Calcul QM/QM'. | 76 |
| III] | Conclusion. | 78 |
| | | |
| Chapitre 3- Caractéristiques structurales et conformationnelles de quelques ligands des nAChRs. | | 85 |
| I] | Nicotine. | |
| I.1- | Rappels bibliographiques. | 87 |
| I.2- | Résultats. | 89 |
| II] | Epibatidine. | |
| I.1- | Rappels bibliographiques. | 89 |
| I.2- | Résultats. | 90 |

| | | |
|-------------|---------------------------------|-----|
| III] | Acétylcholine. | |
| | I.1- Rappels bibliographiques. | 95 |
| | I.2- Résultats. | 97 |
| IV] | Galanthamine et codéine. | |
| | I.1- Rappels bibliographiques. | 98 |
| | I.2- Résultats. | 100 |
| V] | Conclusion. | 123 |

Chapitre 4- Analyse structurale d'un motif caractéristique du site de fixation des ligands de l'AChBP. 129

| | | |
|-------------|--|-----|
| I] | Analyse des structures cristallographiques d'AChBP contenues dans la PDB. | |
| | I.1- Introduction. | 131 |
| | I.2- Conformation du tryptophane. | 132 |
| | I.3- Structure et interactions au niveau du site de fixation des agoniste et antagonistes compétitifs. | 137 |
| II] | Calculs de chimie quantique. | |
| | II.1- Modèles successifs considérés. | 142 |
| | II.2- Résultats/discussion. | 144 |
| | II.3-Influence de l'interaction $\text{NH}_{\text{his}} \cdots \text{OH}_{\text{ser}}$. | 149 |
| III] | Conclusion. | 153 |

Chapitre 5- Etude des interactions de quelques agonistes des nAChRs dans l'environnement du site actif de l'AChBP. 157

| | | |
|-----------|---|-----|
| I] | Structure de quelques complexes agonistes-AChBP. | |
| | I.1- Complexe nicotine-AChBP. | 159 |
| | I.2- Complexe ACh-AChBP. | 166 |
| | I.3- Complexe épibatidine-AChBP. | 173 |

| | |
|--|-----|
| II] Comparaison de la structure et des énergies d'interaction de quelques ligands avec l'AChBP. | 179 |
| III] Conclusion. | 186 |

| | |
|--------------------|-----|
| Conclusion. | 191 |
|--------------------|-----|

| | |
|-----------------|-----|
| ANNEXES. | 199 |
|-----------------|-----|

| | |
|----------------------|-----|
| Abréviations. | 201 |
|----------------------|-----|

| | |
|----------------------|-----|
| Publications. | 203 |
|----------------------|-----|

Publication 1 : *Structural features and protonation site of epibatidine in the gas phase: an investigation through infrared multiphoton dissociation spectroscopy and computational chemistry*, A. P. Atkinson, A. Planchat, J. Graton, E. Renault, G. Grégoire, J-Y. Le Questel, Phys. Chem. Chem. Phys., 2011, **13**, 2272.

Publication 2 : *Structural Features and Hydrogen-Bond Properties of Galanthamine and Codeine: An Experimental and Theoretical Study*, A.P. Atkinson, E. Baguet, N. Galland, J-Y. Le Questel, A. Planchat, J. Graton, Chem. Eur. J., 2011, **17**, 11637.

INTRODUCTION

Les récepteurs de l'acétylcholine (AChR) sont des protéines activées par des ligands appelés neurotransmetteurs. Ces récepteurs transmembranaires peuvent être de deux types différents, muscariniques ou nicotiniques, selon la nature des agonistes pour lesquels ils présentent la plus grande affinité : la muscarine ou la nicotine. Ils possèdent cependant la particularité d'être tous deux activés par le neurotransmetteur acétylcholine (ACh).¹ Leur structure s'organise de sorte à délimiter en leur centre un canal cationique permettant une réponse excitatrice à la fois des muscles et des neurones.² Les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) appartiennent à la superfamille des canaux ioniques activés par des ligands (Ligand-Gated Ion Channel ou LGIC). Ces récepteurs résultent de l'assemblage de 5 sous-unités pouvant être homogènes ou hétérogènes. Chez les vertébrés, 17 sous-unités ont été répertoriées ($\alpha(1-10)$, $\beta(1-4)$, γ , δ et ϵ).³ Grâce à cette grande possibilité de combinaisons, les nAChRs offrent une importante diversité de propriétés physiologiques et pharmacologiques.⁴

Ces dernières années, les nAChRs sont apparus comme une cible thérapeutique très prometteuse du fait de leur implication dans un grand nombre de fonctions majeures du système nerveux central (SNC).^{4, 5} Ils sont ainsi notamment ciblés pour la mise au point de nouveaux médicaments⁶ pour lutter contre les troubles cognitifs, l'accoutumance aux drogues, la douleur et les maladies neurodégénératives. Aujourd'hui, l'un des objectifs poursuivis est le développement de molécules sélectives des sous-types de populations distinctes des nAChRs afin de minimiser les effets secondaires potentiels et d'exercer un effet pharmacologique spécifique.⁴ Cependant, plusieurs sites des nAChRs peuvent être ciblés pour la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques. En effet, ces protéines possèdent, en plus du site de fixation des agonistes, le site d'interaction des antagonistes et le

site d'accrochage des modulateurs allostériques. Ce dernier est distinct du site de fixation des agonistes mais est couplé à celui-ci par une transition conformationnelle.² La fixation d'un modulateur allostérique peut ainsi entraîner la potentialisation de l'effet d'un agoniste. Dans ce contexte, plusieurs molécules ciblant spécifiquement ces différentes cibles ont récemment été découvertes. Ainsi, la clozapine cible le site des antagonistes des récepteurs $\alpha 7$ et donne de bons résultats dans le traitement de la schizophrénie. La galanthamine, un modulateur allostérique des nAChRs et un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE), est prescrite lors de certains traitements de la maladie d'Alzheimer et, du fait de sa double action, constitue un chef de file exploité pour la mise au point de nouvelles molécules.⁷

La nature transmembranaire et oligomérique des nAChRs, l'existence de plusieurs états structuraux interconvertibles (au repos (canal fermé), actif (canal ouvert) et désensibilisé (canal fermé)) auxquelles s'ajoute la diversité structurale et fonctionnelle des sites, font de ces récepteurs une cible particulièrement complexe et rendent leur caractérisation structurale très difficile.⁸ Ces caractéristiques expliquent le manque de données structurales sur les nAChRs, une seule structure de ces récepteurs ayant été élucidée à l'heure actuelle par cryomicroscopie électronique par Unwin *et al.*⁹ Malheureusement, la résolution précise accessible par cette technique reste limitée, et se révèle donc insuffisante (4 Å) pour appréhender en détail, à l'échelle atomique, la structure des nAChRs.¹⁰ Récemment, une étape décisive dans l'avancée de ces recherches a cependant été franchie grâce à la résolution structurale d'un modèle des nAChRs : l'Acetylcholine Binding Protein (AChBP), initialement isolée du système nerveux d'un escargot d'eau douce. En effet, cette protéine a l'avantage de présenter un fort degré d'homologie avec la partie N-terminale des nAChRs, qui comprend le site de fixation des ligands. A la suite de cette découverte, plusieurs structures de complexes de l'AChBP avec différents ligands des nAChRs ont été

résolues par cristallographie des rayons X et ont servi de support pour l'élaboration de modèles tridimensionnels des différents isotypes des nAChRs.¹¹

Dans le cadre de cette thèse, à travers l'analyse structurale de données cristallographiques relatives à l'AChBP et à ses complexes et grâce à la mise en œuvre de différentes méthodes de chimie quantique, nos objectifs sont :

- d'approfondir les connaissances sur les caractéristiques structurales du site de fixation des agonistes,
- de mettre au point un modèle tridimensionnel du site étudiable par les méthodes quantiques,
- de caractériser les éléments structuraux des agonistes,
- de déterminer la structure et les énergies d'interaction d'une série de ligands avec ce modèle.

Ce mémoire est divisé en cinq chapitres. Le premier est consacré à une présentation générale des caractéristiques des nAChRs, aussi bien sur le plan structural que fonctionnel. Le rôle de l'AChBP, en particulier sa capacité à pouvoir servir de modèle aux nAChRs, est discuté. Dans une dernière partie, quelques pathologies associées aux désordres neuronaux dans lesquels les nAChRs sont impliqués sont évoquées.

Le deuxième chapitre présente les méthodes utilisées et la stratégie « expérimentale/théorique » mise en œuvre pour atteindre les objectifs fixés. La méthode d'analyse des données structurales issues de l'exploitation des bases de données cristallographiques, en particulier de Protein Data Bank (PDB), est ainsi présentée. Dans un second temps, une présentation des techniques de spectroscopie IRMPD (Infrared Multiphoton Dissociation) et IRTF (Infrarouge à Transformée de Fourier) employées pour

caractériser structurellement différents ligands sera effectuée. Enfin, les méthodes théoriques utilisées, d'une part, pour effectuer l'analyse conformationnelle des agonistes sélectionnés et en déterminer quelques propriétés physicochimiques, et d'autre part étudier la structure et les énergies d'interactions de ces ligands avec le modèle des nAChRs seront exposées. Plusieurs méthodes, caractérisées par différents niveaux de sophistication, ont été testées dans le cadre de ce travail et seront donc successivement évoquées dans ce chapitre.

Les résultats obtenus au cours de l'analyse structurale des molécules sélectionnées et de leurs sites d'interaction seront présentés dans le troisième chapitre. Pour chaque agoniste des nAChRs étudié, un rappel bibliographique relatif à l'activité biologique et aux travaux antérieurs d'élucidation structurale sera en premier lieu effectué. Nos données théoriques seront alors confrontées aux observations expérimentales disponibles. Dans le cas de l'épibatidine, l'ensemble des résultats obtenus par spectroscopie IRMPD en phase gazeuse et à l'état isolé par les calculs quantiques sera exposé.

Dans la quatrième partie, un motif structural du site de fixation des agonistes des nAChRs dans l'AChBP est étudié de façon approfondi, à partir de l'analyse des données cristallographiques issues de la PDB et de calculs théoriques. Ce modèle est constitué de cinq acides aminés dont les chaînes latérales et/ou les groupes du squelette peptidique sont engagés dans un réseau d'interaction par liaison hydrogène (liaison H) très particulier. De nouvelles liaisons H intervenant dans la stabilisation locale des conformations des différents acides aminés ont été mises en évidence dans cette phase du travail et sont discutées.

Le dernier chapitre est dédié à l'étude des variations relatives d'énergie et de paramètres géométriques des interactions entre une sélection d'agonistes et un modèle du site de fixation des ligands dans l'environnement de l'AChBP. Des calculs de type QM/QM', basés sur la méthodologie ONIOM disponible dans le programme Gaussian, ont

été effectués et sont discutés. L'intérêt de cette méthodologie pour rationaliser les variations d'affinité des agonistes pour l'AChBP est démontré.

Références bibliographiques.

-
- 1) E. X. Albuquerque, E. F. R. Pereira, M. Alkondon and S. W. Rogers, *Physiol. Rev.*, **89**, 73-120 (2009).
 - 2) J.-P. Changeux and A. Taly, *Trends Mol. Med.*, **14**, 93-102 (2008).
 - 3) D. D'Hoedt and D. Bertrand, *Expert Opin. Ther. Targets*, **13**, 395-411 (2009).
 - 4) A. A. Jensen, B. Frolund, T. Liljefors and P. Krosgaard-Larsen, *J. Med. Chem.*, **48**, 4705-4745 (2005).
 - 5) M. N. Romanelli, P. Gratteri, L. Guandalini, E. Martini, C. Bonaccini and F. Gualtieri, *ChemMedChem*, **2**, 746-767 (2007).
 - 6) R. A. Glennon and M. Dukat, *Pharm. Acta Helv.*, **74**, 103-114 (2000).
 - 7) S. P. Arneric, M. Holladay and M. Williams, *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1092-1101 (2007).
 - 8) C. G. Sharples and S. Wannacott, *Tocris Reviews*, **19** (2001).
 - 9) N. Unwin, *J. Mol. Biol.*, **346**, 967-989 (2005).
 - 10) T. Grutter and J. P. Changeux, *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 459-463 (2001).
 - 11) D. Kalamida, K. Poulas, V. Avramopoulou, E. Fostieri, G. Lagoumintzis, K. Lazaridis, A. Sideri, M. Zouridakis and S. J. Tzartos, *FEBS Journal*, **274**, 3799-3845 (2007).

Chapitre 1

Aspects structuraux et fonctionnels des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs)

I] Les nAChRs, membres de la famille des canaux ioniques activés par des ligands (LGIC)

I.1- Le transport des ions à travers les membranes cellulaires

Les canaux ioniques ont pour rôle de permettre le passage d'ions à travers la membrane cellulaire. Ils permettent ainsi le transport d'ions dans le sens du gradient électrochimique. Ces canaux présentent des spécificités plus ou moins strictes vis-à-vis des ions transportés. En général un canal donné discrimine bien entre anions et cations mais certains acceptent indifféremment cations et anions. Ces canaux partagent tous un motif structural commun : un pore central, formé généralement par quatre ou cinq hélices α transmembranaires à travers lequel les ions peuvent passer.¹

I.2-Modes d'ouvertures du canal ionique

Différents stimuli peuvent conduire à l'activation du canal ionique :

- *Modification du potentiel de membrane.* Le fonctionnement de nombreux canaux est contrôlé par la valeur du potentiel membranaire, c'est-à-dire la différence de potentiel ou de tension mesurée entre la face externe et la face interne de la membrane d'une cellule. Ces canaux, dits potentiel dépendant, peuvent être spécifiques d'un cation donné comme les canaux Na^+ , K^+ et Ca^{2+} .²
- *La fixation d'un ligand.* L'ouverture de certains canaux est régie par la présence au sein du site de fixation du récepteur d'un ligand, appelé agoniste.

Parmi ces types de récepteurs, on peut en citer de nombreux appartenant au système nerveux tels que : les récepteurs de l'acétylcholine, de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), de la sérotonine, de la glycine... Dans le cas des récepteurs de l'acétylcholine, on en distingue deux types: les récepteurs muscariniques (mAChRs) et les récepteurs nicotiniques (nAChRs). Les mAChRs appartiennent à la famille des récepteurs couplés à une protéine G et sont activés par l'ACh et la muscarine, toxine extraite du champignon *Amanita muscaria* (amanite tue-mouche).³ Ils permettent une réponse métabolique lente de l'ACh grâce au couplage d'une cascade de seconds messagers.⁴ Les nAChRs, quant à eux, appartiennent à la superfamille des canaux ioniques activés par des ligands (LGIC). Ils permettent une transmission rapide du signal nerveux au niveau des synapses.⁴

- *Variation de concentration en Ca^{2+} intracellulaire.* La variation de Ca^{2+} libre intracellulaire contrôle de nombreuses fonctions cellulaires. Cette variation peut être le résultat de l'ouverture de canaux Ca^{2+} localisés dans la membrane plasmique. Elle est le plus souvent le résultat de l'ouverture de canaux localisés dans le réticulum sarcoplasmique et endoplasmique dont la concentration en Ca^{2+} est élevée.² On peut citer le récepteur de la ryanodine et de l'inisitol trisphosphate comme appartenant à ce groupe de récepteurs.

II] Généralités sur les nAChRs

II.1- Localisation

Les nAChRs se rencontrent non seulement dans le système nerveux central et périphérique mais également dans des cellules non excitables telles que les kératinocytes, les macrophages, l'épithélium etc. La position de ces récepteurs au niveau des synapses dépend en fait du type de récepteur. Ainsi, les récepteurs de type musculaire sont situés postsynaptiquement au niveau de la jonction neuromusculaire, tandis que les récepteurs neuronaux sont localisés de façon pré ou postsynaptique (Figure 1) au niveau des neurones cholinergiques ou de ganglions.⁴

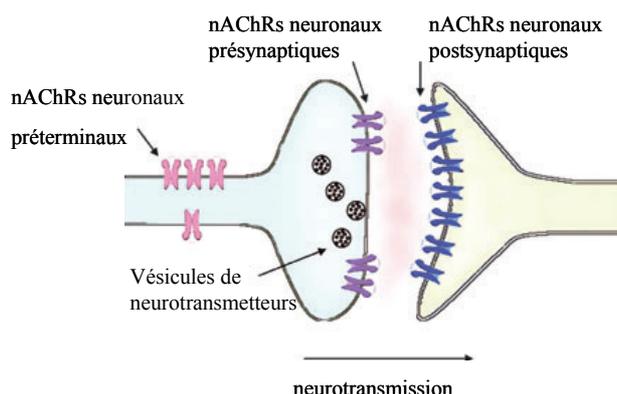


Figure 1. Différentes localisations possibles des nAChRs au niveau synaptique.¹

II.2- Les nAChRs, des protéines multimériques

La caractérisation de l'organe électrique des poissons torpilles (*Torpedo californica* ou *Torpedo marmorata*) très riche en nAChRs neuronaux et musculaires (plusieurs mg/kg) a fait l'objet d'études approfondies ces dernières décennies et a conduit à d'importantes découvertes.^{1, 5} Grâce à cette concentration importante et à l'aide de ligands possédant de grandes affinités pour les nAChRs tels que l' α -bungarotoxine. Ils ont pu être isolés et

purifiés dans les années 70.⁶ Ces premières études sur les nAChRs ont démontré qu'ils étaient de nature pentamérique, c'est-à-dire qu'ils sont composés de cinq sous-unités (Figure 2). Au centre de cinq sous-unités, se trouve le pore du canal permettant le passage des ions. Aujourd'hui, on recense 17 sous-unités différentes. Elles ont été divisées en deux groupes, de type musculaire ($\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ , et ϵ) et de type neuronal ($\alpha 2$ - $\alpha 10$ et $\beta 2$ - $\beta 4$).⁴ Quand les cinq sous-unités sont identiques, le récepteur est dit homomérique alors que dans le cas contraire il est dit hétéromérique. Ainsi, les différents types de sous-unités existantes entraînent un très grand nombre de possibilités de combinaisons qui sont à l'origine de la diversité pharmacologique des nAChRs. Par exemple, en ce qui concerne les sous-unités α , les récepteurs homopentamériques $\alpha 7$ ont été identifiés comme une cible thérapeutique potentielle.⁷ Par contre, toutes les sous-unités ne constituent pas des assemblages pentamériques fonctionnels.

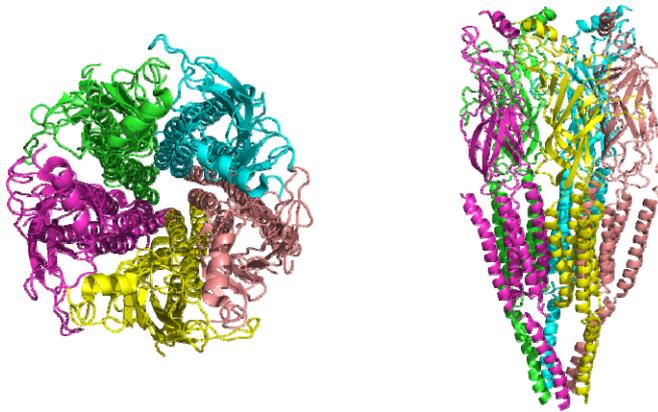


Figure 2. Vue de dessus (à gauche) et latérale (à droite) d'un nAChR. Chaque sous-unité est représentée par une couleur différente.

II-3 Les différents états possibles des nAChRs

Les nAChRs existent sous différents états interconvertibles : basal (repos), actif (ou ouvert) et désensibilisé (souvent divisé en 2 sous-états : d'efficacité rapide et d'efficacité lente) comme l'illustre la Figure 3.^{4, 8} Un ligand des nAChRs va préférentiellement stabiliser l'état pour lequel il a la plus forte affinité. Ainsi, la fixation des agonistes comme la nicotine stabilise l'état ouvert (au moins de manière provisoire).⁸ Pour l'état désensibilisé, la présence d'agonistes ne permet pas l'ouverture du canal, contrairement à l'état fermé où la fixation de l'agoniste va permettre aux nAChRs de passer à l'état ouvert.

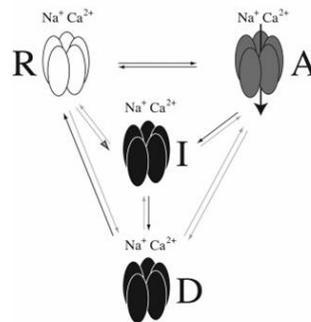


Figure 3. Transitions allostériques selon le modèle MWC (Monod-Wyman-Changeux) entre le récepteur au repos (R, complexe blanc), actif (A, complexe grisé) et les états désensibilisés d'efficacité rapide (I) et d'efficacité lente (D) (complexes noirs).⁴

Les agonistes présentent une affinité particulière pour chaque sous-type de nAChRs selon la nature des sous-unités constitutives de celui-ci, en particulier leur composition en acides aminés. Certains agonistes auront ainsi des effets plus puissants selon la nature du récepteur, musculaire ou neuronal, tandis que d'autres n'activeront qu'un seul sous-type de récepteurs et seront sans effet sur leurs autres types.

II.4- Organisation structurale des nAChRs.

L'organisation des nAChRs s'articule autour de trois domaines. Un domaine intracellulaire (DIC), un domaine s'étendant dans la partie membranaire (DTM) et un dernier extracellulaire (DEC) comprenant le site de fixation des ligands⁹ (Figure 4). Dans la partie N-terminale, située dans le domaine extracellulaire, est localisée une séquence de 13 résidus bordée par des cystéines (Cys) formant un pont disulfure, délimitant une boucle localisée entre le domaine du site de fixation des ligands (ligand binding site ou LBD) et le pore du canal.¹ C'est pour cette raison que les LGICs sont aussi appelés superfamille des récepteurs à boucle cystéine. Les sous-unités du récepteur sont chacune organisées au niveau du domaine du site de fixation autour de deux séries de feuillets β arrangés dans un sandwich β ondulé rejoint par le pont disulfure formant la boucle cystéine⁹ (Figure 4). Trois autres boucles (A, B et C) permettent la connexion des feuillets β . La partie membranaire du récepteur est constituée de 4 segments d'hélice α (M1-M4) (Figure 4). Ces segments forment un cercle intérieur d'hélices qui délimitent le pore. Dans un récepteur fermé, les hélices du cercle intérieur (M2) se rapprochent du milieu de la membrane afin de former une ceinture hydrophobe, constituant une barrière imperméable aux ions.⁹

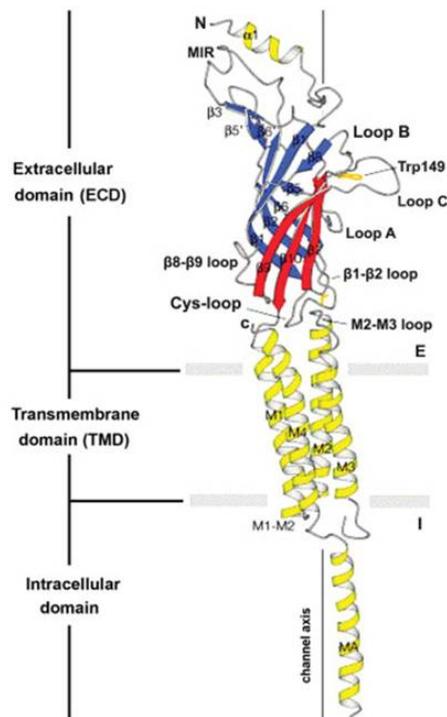


Figure 4. Représentation en ruban d'une vue latérale d'une sous-unité α parallèle à l'axe du pore tirée d'une structure de microscopie électronique.¹⁰

II.5- Types de ligands des nAChRs

Comme nous l'avons vu précédemment, les nAChRs sont des canaux ioniques qui s'ouvrent en présence d'un agoniste. Mais il existe également d'autres ligands ayant d'autres activités et d'autres sites spécifiques tels que les antagonistes et les modulateurs allostériques (Figure 5). Les antagonistes ont un effet opposé aux agonistes. Ils peuvent être compétitifs des agonistes s'ils se fixent sur le même site que les agonistes ou non compétitifs lorsqu'ils interagissent avec le récepteur sur un site distinct de celui-ci.

Le concept de modulation allostérique prévoit que la protéine change continuellement d'état conformationnel. Les transitions entre chaque état sont caractérisées par une barrière d'énergie différente, chaque état possédant une affinité différente pour un ligand. La liaison de n'importe quelle molécule sur la protéine peut affecter le complexe et/ou la barrière d'énergie relative à un changement conformationnel.¹¹ Les modulateurs

allostériques peuvent être positifs ou négatifs. Ils sont dits positifs lorsqu'ils potentialisent l'effet des agonistes sur les récepteurs et négatifs s'ils produisent l'effet inverse. Il est à noter que les antagonistes non-compétitifs peuvent donc être considérés comme des modulateurs allostériques négatifs.

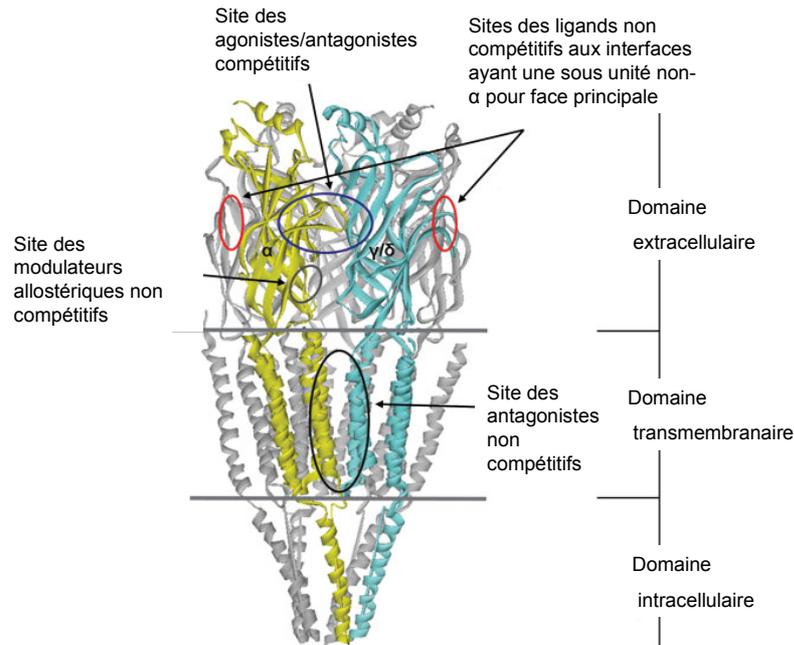


Figure 5. Représentation schématique tirée d'une structure de microscopie électronique des différents sites des nAChRs. Les ovales rouges indiquent les positions du site de fixation des ligands non compétitifs (allostériques) sur les nAChRs neuronaux hétéromériques. L'ovale bleu représente le site de fixation des ligands compétitifs (constitué de sous-unités α et/ou β).¹⁰

II.6- Le domaine de fixation des agonistes

Le site de fixation des agonistes des nAChRs se situe à l'interface de deux sous-unités.¹ Il est composé de résidus appartenant aux boucles A, B et C (Figure 6)⁹ créant une poche hydrophobe notamment du fait de la présence d'acides aminés contenant des cycles aromatiques. La sous-unité possédant les boucles A, B et C du site est dite « principale », l'autre étant appelée complémentaire contenant les boucles D, E et F.¹

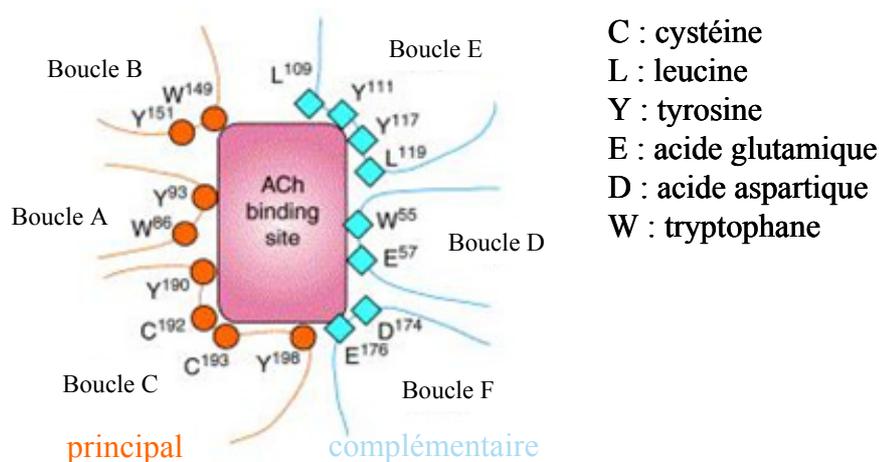


Figure 6. Schéma représentant le site de fixation des agonistes. La numérotation des résidus correspond au récepteur des organes électriques du poisson torpille¹² (*Torpedo californica*).

Dans le cas des récepteurs de mammifères, la sous-unité principale est de type α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$, $\alpha 6$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$) et comprend une paire Cys-Cys située dans la boucle C (Figure 6). La composante complémentaire du site peut être constituée d'éléments provenant de sous-unités $\alpha 10$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$, δ , γ ou ε . Comme nous l'avons évoqué précédemment, certains récepteurs constitués exclusivement de sous-unités α ne forment pas d'assemblages pentamériques fonctionnels. Ainsi, les récepteurs $\alpha 5$ et $\alpha 10$ ne fixent pas d'agonistes. De même les sous-unités $\beta 1$, $\beta 3$ et $\alpha 5$ n'existent qu'en cinquième position dans l'architecture de ce récepteur et ne participent pas directement à la formation d'un site de fixation des agonistes.¹³

De nombreux acides aminés aromatiques contribuent au caractère apolaire du site. Ainsi, les sous-unités α comportent des résidus possédant une chaîne latérale aromatique hydrophobe (Tyr 93, Trp 149, Trp 190 et Tyr 198, numération basée sur la numération du nAChR de *Torpedo californica*).¹³

III] Structure tridimensionnelle des nAChRS.

Aucune structure 3D expérimentale précise des nAChRs n'est à ce jour disponible. Cette situation est due au fait qu'il existe différents obstacles empêchant l'accès aisé à une structure expérimentale « intégrale » des nAChRs:

- L'existence de plusieurs états interconvertibles, qui implique de savoir de quel état la protéine cristallisée est la plus proche.
- La nature transmembranaire des nAChRs, qui impose des contraintes particulières en terme de purification, d'extraction et de cristallisation ¹⁴.
- La nécessité d'obtenir une quantité suffisante de nAChRs pour la cristallisation et les mesures.

Seule une structure complète des nAChRs obtenue par cryomicroscopie électronique à une résolution de 4 Å a été déposée en 2005 dans la PDB. Cette structure, obtenue par Unwin,⁹ provient d'un nAChR isolé d'un poisson torpille et non d'un mammifère. Afin de réussir à cristalliser de plus grandes quantités de nAChRs, Liu et coll. ont mis au point une technique permettant d'obtenir des masses de nAChRs purifiés de l'ordre de plusieurs milligrammes.¹⁵ Cette méthode consiste à produire des nAChRs chimériques de types $\alpha 7$ avec des cellules HEK-293F puis à les complexer avec (i) un agoniste (R)-5-(4-aminophenyl)-N-(quinuclidin-3-yl) furan-2-carboxamide) ou (ii) un antagoniste (α -bungarotoxine). Ensuite, le complexe peut être purifié par HPLC.¹⁵

De plus, c'est principalement le domaine extracellulaire, domaine de fixation des ligands, qui est connu le plus précisément, grâce aux travaux sur une protéine homologue des nAChRs appelé ACetylcholine Binding Protein (AChBP) pour laquelle des structures allant jusqu'à une résolution de 1,76 Å sont disponibles.¹⁶ Ces différentes données ont permis

d'appréhender des éléments de la structure 3D des nAChRs. Ainsi, la structure expérimentale d'Unwin est proche de l'état fermé du canal. Elle a mis en lumière la symétrie d'ordre 5 quasi parfaite autour du pore des hélices M1 à M4. La déviation observée apparaît comme une conséquence de la variation en séquence qui est la plus prononcée avec M4. Par ailleurs, ces structures ont montré que les hélices M2 sont plus particulièrement responsables de la forme du pore central, lui conférant une longueur de 40 Å et une forme d'entonnoir. La largeur du pore à son endroit le plus étroit est d'environ 6 Å dans son état fermé et de 7,4 Å dans son état ouvert.¹⁷ Les dimensions d'une sous-unité sont de 30 Å × 40 Å × 160 Å.⁹

IV] L'ACetylcholine Binding Protein (AChBP)

IV.1- L'AChBP, un modèle des nAChRs.

Le dysfonctionnement des nAChRs étant responsable de nombreuses pathologies, ces récepteurs constituent une cible thérapeutique de choix pour la mise au point de nouveaux médicaments. Cependant la conception rationnelle de nouveaux ligands des nAChRs se heurte à plusieurs obstacles que nous venons d'évoquer. En 2001, l'élucidation structurale par diffraction des rayons X de l'AcetylCholine Binding Protein (AChBP), une protéine issue de mollusque, ainsi que la cristallisation de plusieurs complexes ligands-AChBP ont permis une avancée significative dans la caractérisation structurale des nAChRs. L'AChBP est une protéine hydrosoluble qui a pour rôle de moduler les transmissions synaptiques d'acétylcholine. Cette molécule possède un fort degré d'homologie avec la partie N-terminale des nAChRs (15-28%)¹⁸, qui comprend le site de fixation des ligands. L'AChBP de l'espèce *Lymnea stagnalis* possède des propriétés pharmacologiques semblables aux

nAChRs $\alpha 7$.¹⁸ Par contre, l'AChBP n'est pas une protéine transmembranaire et ne possède donc pas les domaines DTM et DIC des nAChRs. De plus, son rôle étant de réguler la concentration d'ACh elle ne constitue pas un canal ionique bien que son organisation structurale délimite un pore en son centre. Enfin, l'AChBP est toujours homomérique, contrairement aux nAChRs.

IV.2- Types de ligands de l'AChBP

L'AChBP partage donc une homologie structurale significative avec la partie extracellulaire des nAChRs et possède, comme eux, trois différents types de sites de fixations des nAChRs. Des travaux dédiés à l'étude structurale de la fixation d'agonistes (épibatidine et lobeline) et d'antagonistes (α -conotoxine Im I et méthyllycaconitine) avec l'AChBP ont montré que l'interaction avec les agonistes se traduisait par un mouvement de fermeture de la boucle C tandis qu'au contraire la fixation des antagonistes induit un mouvement d'ouverture de celle-ci. Ces investigations ont donc mis à jour la participation de la boucle C dans la différenciation des effets des agonistes/antagonistes compétitifs.¹⁹ Par ailleurs, les modulateurs allostériques tels que la galanthamine et la cocaïne se lient profondément à l'interface des sous-unités, mais sans toucher la boucle C.¹⁹ Enfin, en utilisant des α -conotoxines extraites des mollusques marins vénéneux, une étude menée par Kasheverov *et al.* a montré que certaines toxines se fixaient sur le site des agonistes/antagonistes-compétitifs alors que d'autres se lient sur un autre site que celui des agonistes.²⁰

IV.3- Structure atomique du site de fixation des agonistes

Les AChBPs dont les structures 3D sont disponibles proviennent de trois espèces différentes de mollusques : *Aplysia californica*, *Lymnaea stagnalis* et *Bulinus truncatus*. Un des résidus importants du site de fixation est le tryptophane 143²¹ (sur la base de la numérotation *Lymnaea stagnalis*). Pour plus de clarté, nous utiliserons la même numérotation dans le reste de ce manuscrit pour positionner les résidus pertinents.²¹ Ce résidu, Trp 143, est considéré comme jouant un rôle primordial dans l'interaction entre la protéine et le ligand. Plusieurs études ont suggéré une interaction entre l'ammonium tertiaire NH^+ du cycle pyrrolidine de la nicotine et le carbonyle du Trp 143.^{22, 23} Cet acide aminé appartient à la sous-unité principale du site et est situé sur la boucle B.¹⁹ Des travaux ont également mis en évidence l'importance d'un aspartate 85 (Asp 85) qui n'est pas directement au contact du ligand mais, spatialement proche du site de fixation, joue un rôle essentiel pour son organisation.²⁴ Cet acide aminé, appartenant à la boucle A, est au cœur d'un réseau de liaisons H créées avec le Trp 143 et des résidus voisins (Figure 7). Par mutagenèse dirigée, Lee et coll. ont remplacé l'Asp 85 par une asparagine, substituant ainsi la fonction carboxylate chargée négativement par une fonction amide neutre.²⁵ Une importante perte d'activité a ainsi été observée, montrant le rôle essentiel de la chaîne latérale de l'Asp 85 dans le site de fixation.

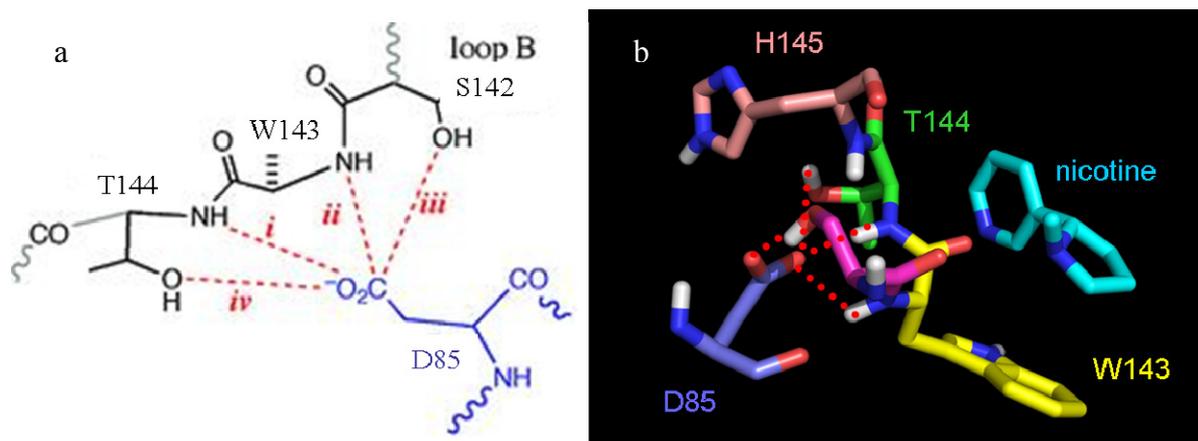


Figure 7. (a) Représentation du réseau de liaisons H (···) entre l'Aspartate 85 d'une part, le Tryptophane 143 et ses résidus voisins d'autre part.²⁴(b) Arrangement tridimensionnel de l'Asp 85 et du Trp 143 autour du ligand.

IV.4- Comparaison des interactions de quelques agonistes

Différentes études ont été menées sur un plan thermodynamique pour comparer les interactions de plusieurs agonistes avec les nAChRs à travers la mesure des constantes de dissociation des complexes (K_d). Ces grandeurs sont en effet généralement utilisées pour caractériser l'affinité d'un ligand. Plus la valeur est faible, plus faible est la concentration nécessaire pour former le complexe et par conséquent plus grande est l'affinité. Ainsi, une étude de Celie et coll., par calorimétrie isotherme de titration (ITC) a permis de comparer les constantes d'affinité de trois ligands (i.e. nicotine, acétylcholine et carbamylcholine) avec l'AChBP¹⁸. Ces résultats, rassemblés dans le Tableau I, montrent que la nicotine a une affinité pour l'AChBP 10 et 100 fois supérieure à l'acétylcholine et à la carbamylcholine, respectivement. Sur la base de mesures de fluorescence du Trp 143, Hansen et coll. ont par ailleurs mis en évidence l'affinité 100 fois plus grande de l'épibatidine pour l'AChBP par rapport à la nicotine.²⁶

Tableau I. Constante de dissociation de différents ligands des nAChRs.

| molécules | K_d (nM) ^a | K_d (nM) ^b |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| Acétylcholine | 823 | |
| Carbamylcholine | 7575 | |
| Nicotine | 45,2 | 38 |
| Épipatidine | | 0,16 |

^a: Celie *et al.*¹⁸, ^b: Hansen *et al.*²⁶

Ces données quantitatives sont essentielles pour appréhender, sur le plan macroscopique, l'affinité des agonistes vis-à-vis des nAChRs. Cependant, elles doivent être couplées avec des investigations structurales expérimentales et/ou des études de modélisation moléculaire pour rationaliser, au niveau atomique, l'interaction de ces composés avec leur récepteur. Pour expliquer les différences d'affinité entre l'épipatidine et la nicotine, Dougherty *et al.* ont suggéré à l'aide de calculs quantiques sur un modèle simplifié du site de reconnaissance, un nombre d'interactions avec le Trp 143 plus important pour l'épipatidine que pour la nicotine.²¹ Plus précisément, l'épipatidine interagit par une liaison H de type $\text{NH}^+ \cdots \text{O}=\text{C}$ avec le carbonyle peptidique du Trp 143 et par une interaction cation- π avec le noyau indole du Trp tandis que dans le cas de la nicotine, le même type d'interaction est bien observé mais avec une liaison H $\text{N}^+\text{CH} \cdots \text{O}=\text{C}$ moins favorable.

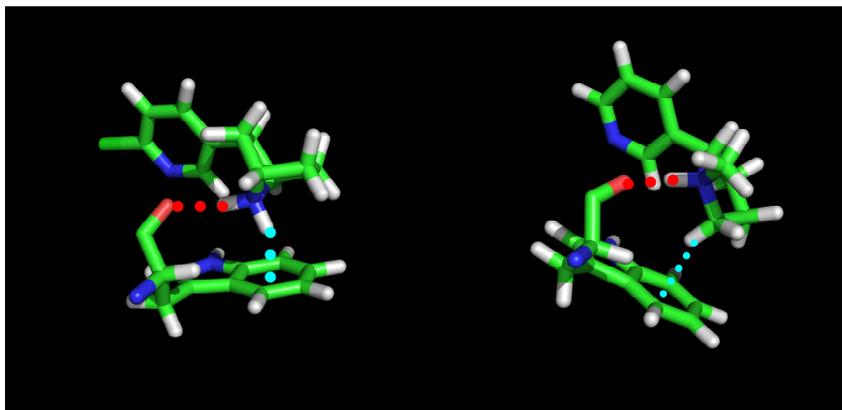


Figure 8- Représentation des interactions cation- π (•••) et des liaisons H (•••) de l'épipatidine (à gauche) et de la nicotine (à droite) avec le Trp 143.

IV.5- Limites des informations structurales disponibles.

Le niveau de précision des paramètres géométriques d'une structure cristallographique de protéine, et *a fortiori* d'un complexe récepteur-ligand, dépend principalement de la résolution de la structure élucidée. Communément, une structure est considérée comme ayant une haute résolution si celle-ci est inférieure à 2,3Å.²⁷ Par ailleurs, la majeure partie des structures disponibles sont obtenues par diffraction des rayons X, or cette méthode ne permet pas de positionner les atomes d'hydrogène.²⁸ En effet, avec cette technique, les rayons X sont diffractés par collision avec le nuage électronique et dans un cristal ordonné, ce phénomène est à l'origine de différents motifs qui peuvent être interprétés pour fournir des indications sur les positions des atomes. Du fait de la faible densité électronique des atomes d'hydrogène, ceux-ci sont invisibles sauf par diffraction des rayons X à très haute résolution (< 1Å).²⁸ Cette limite est donc importante du fait de l'implication centrale des liaisons H dans les interactions ligands-protéines. Mais ce problème est encore plus dérangeant quand une ou des molécules d'eau sont impliquées. Les atomes d'hydrogène de molécules d'eau pouvant théoriquement donner différents réseaux d'interaction par

liaisons H (i.e. avec d'autres molécules d'eau, des résidus du site ou bien des groupes fonctionnels du ligand), il est primordial de connaître leurs positions.²⁹ La diffraction neutronique, quant à elle, permet d'observer les atomes d'hydrogène car les neutrons sont diffractés par collision avec le noyau atomique.²⁸ Malheureusement, cette méthode étant plus difficile à mettre en place, il n'existe pas de structure de l'AChBP disponible par cette technique.

V] Les nAChRs neuronaux : une cible thérapeutique prometteuse.

Si de très nombreuses études ont été menées depuis des décennies sur les nAChRs neuronaux, c'est du fait que leurs dysfonctionnements sont impliqués dans de très nombreuses pathologies telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, la schizophrénie, la dépendance au tabac, etc... De plus, contrairement aux nAChRs musculaires, leurs fonctions pathophysiologiques sont mal définies.¹

V.1- La maladie d'Alzheimer (MA).

Du fait de l'augmentation de l'espérance de vie, les maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer (MA) sont devenues un problème de santé publique majeur. En 2010, environ 35,6 millions de personnes étaient déjà atteintes de cette maladie dans le monde et des estimations prévoient qu'en 2050 115 millions de personnes en souffriront.³⁰ Sa caractéristique fondamentale est l'altération de la cognition (capacité à évoluer dans son environnement), notamment la dysmnésie (difficulté à mémoriser).²⁹ De nombreux

événements cruciaux dans les communications neuronales apparaissent dans la MA tels que l'apparition de plaques d'amyloïde β et d'enchevêtrements composés de protéines tau hyperphosphorylées.³¹ Par ailleurs, l'une des caractéristiques prédominantes de la MA est une perte progressive et précoce de la fonction cholinergique.³² Selon l'hypothèse dite cholinergique, ce serait une diminution significative du taux d'ACh contenue dans les neurones du cerveau qui serait responsable de la perte de mémoire observée chez les patients affectés de la MA.

V.2- La maladie de Parkinson (MP).

La MP est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente. Elle se manifeste par des tremblements, de la brakinésie (lenteur des mouvements), des troubles de l'équilibre et de la coordination et des effets non-moteurs (perte de la mémoire).³³ En plus d'une perte de neurones dopaminergiques, plusieurs études ont montré l'importance des nAChRs.¹ Le nombre de récepteurs nicotiniques baissant au cours de la maladie de Parkinson et la consommation de tabac étant inversement proportionnelle à la prévalence de la MP, des agonistes de la nicotine pourraient être une piste de traitement.³⁴

V.3- La schizophrénie.

La schizophrénie englobe un ensemble de troubles mentaux responsables de désordres psychotiques. Des études épistémologiques ont révélé un pourcentage de fumeurs significativement plus élevé chez les schizophrènes que dans la population générale. Cette observation a été rationalisée par des travaux qui ont montré que l'interaction de la nicotine avec les nAChRs se traduit par une normalisation d'un déficit sensoriel présent dans la

schizophrénie. De plus, une expression et une régulation aberrante des nAChRs ont été mises en évidence au niveau du cerveau de patients atteints par cette maladie.³⁵

V.4- Les troubles déficitaires de l'attention (TDA).

Les TDA sont une pathologie caractérisée par un trouble persistant de l'attention, de la distractibilité et/ou une hyperactivité à un degré tel que les activités académiques ou occupationnelles sont détériorées.¹ Ueno *et al*³⁶ ont démontré que la nicotine améliorait des dysfonctionnements liés au TDA via les nAChRs $\alpha 4\beta 2$ mais non via les nAChRs $\alpha 7$ dans des modèles animaux. Des agonistes sélectifs des nAChRs $\alpha 4\beta 2$ pourraient leur fournir une aide thérapeutique pour améliorer des problèmes cognitifs, telle que l'inattention chez les patients souffrant de TDA.

V.5- L'épilepsie.

L'épilepsie est une affection neurologique causée par une décharge non contrôlée des neurones, soit du cortex en entier (épilepsie généralisée) soit localisés dans certaines régions du cerveau (épilepsie partielle).³⁷ Certains gènes codant pour des canaux activés par des ligands ou potentiel-dépendants sont associés à des épilepsies héréditaires. Par exemple, des mutations sur les gènes CHRNA4 et CHRBN2 codant pour des sous unités des nAChRs sont associées à certaines épilepsies familiales comme l'épilepsie frontale à crise nocturne.

V.6- L'autisme.

L'autisme est un désordre neurodéveloppemental caractérisé par un comportement social, sensimoteur, cognitif et linguistique anormal. Des anomalies au niveau du cervelet ont été identifiées par neuropathologie ou neuroimagerie. Perry *et al.* ont montré une baisse d'affinité de l'acétylcholine pour les nAChRs dans le cortex de sujets autistes pour les sous-types $\alpha 4\beta 2$ mais aussi un accroissement d'activité dans le cervelet pour le sous-type $\alpha 7$.³⁸

V.7- L'accoutumance.

L'accoutumance au tabac est un problème de santé publique majeur du fait des risques grandement accrus de cancer du poumon. Les récepteurs nicotiques de type $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 7$ sont les plus présents dans le cerveau et sont étroitement associés à la dépendance à la nicotine.¹ L'administration répétée de nicotine entraîne ainsi une augmentation de l'expression de nAChRs, les récepteurs comprenant des sous-unités $\alpha 4$ ou $\beta 2$ subissant de plus une hypersensibilisation. Plusieurs voies thérapeutiques sont envisagées dans cette lutte, notamment l'utilisation d'agonistes partiels ou d'antagonistes. Les agonistes partiels remplacent et miment la thérapie de sevrage par la nicotine en réduisant les effets de manque dus à la cessation de fumer. Cependant, par rapport à l'effet observé avec un agoniste total, les agonistes partiels impulsent une diminution de la consommation de tabac du fait qu'ils génèrent une réponse du récepteur moins importante.³⁹ L'inconvénient du traitement par agoniste est qu'il ne supprime pas la sensation de plaisir associée à l'acte de fumer. Une autre approche est d'utiliser des antagonistes de la nicotine. Le taux de rechute est important chez les fumeurs essayant d'arrêter de fumer. La plupart du temps la rechute se fait en deux temps, d'abord un essai rapide avec une cigarette puis la rechute totale vers un modèle de

consommation régulière de tabac. Il peut donc être avantageux d'utiliser une thérapie qui bloque le plaisir de la première cigarette, évitant ainsi la rechute complète. De plus, fournir une médication multiple avec un large panel de cibles devrait permettre d'augmenter l'efficacité clinique parmi les individus ne répondant pas à une thérapie classique.³⁹

VI] Conclusion

Du fait de leur importance physiologique, les nAChRs font l'objet d'une importante recherche depuis plusieurs décennies. Malgré le fait que ces travaux aient permis de collecter de grandes quantités d'information, de nombreuses questions restent encore non résolues.¹ En effet, la complexité intrinsèque des nAChRs du fait de leur grande diversité et de l'existence de plusieurs états structuraux interconvertibles en font une cible particulièrement délicate à appréhender. La découverte de l'AChBP en tant que modèle des nAChRs et son exploitation ont été à l'origine d'avancées significatives. Les éléments structuraux sur le site de fixation des ligands obtenus grâce à l'AChBP seront certainement efficaces dans la mise au point de nouveaux représentants de ces composés. Toutefois, l'AChBP étant homomérique, le défi reste de pouvoir concevoir des ligands sélectifs des différents sous-types de récepteurs. De nombreux aspects restent encore à élucider, telles que la fonction exacte du canal, le rôle exact des différents sous-types de récepteurs en fonction de leur localisation ou encore l'identification des sous-types de nAChRs impliqués dans les différentes pathologies.¹ On peut espérer que dans les prochaines années, de meilleures connaissances sur ces récepteurs, permettront l'émergence de nouveaux médicaments plus sélectifs et possédant peu ou pas d'effets secondaires.

Références bibliographiques.

-
- 1) D. Kalamida, K. Poulas, V. Avramopoulou, E. Fostieri, G. Lagoumintzis, K. Lazaridis, A. Sideri, M. Zouridakis and S. J. Tzartos, *FEBS Journal*, **274**, 3799-3845 (2007).
 - 2) E. Shechter, "Biochimie et biophysique des membranes: aspects structuraux et fonctionnels " Dunod, 2004.
 - 3) D. D'Hoedt and D. Bertrand, *Expert Opin. Ther. Targets*, **13**, 395-411 (2009).
 - 4) A. A. Jensen, B. Frolund, T. Liljefors and P. Krosgaard-Larsen, *J. Med. Chem.*, **48**, 4705-4745 (2005).
 - 5) M. Sanghvi, A. K. Hamouda, K. Jozwiak, M. P. Blanton, J. R. Trudell and H. R. Arias, *Biochim. Biophys. Acta*, **1778**, 2690-2699 (2008).
 - 6) M. N. Romanelli, P. Gratteri, L. Guandalini, E. Martini, C. Bonaccini and F. Gualtieri, *ChemMedChem*, **2**, 746-767 (2007).
 - 7) X. Huang, F. Zheng, X. Chen, P. A. Crooks, L. P. Dwoskin and C.-G. Zhan, *J. Med. Chem.*, **49**, 7661-7674 (2006).
 - 8) V. Arnaud, *Thèse de doctorat, Université de Nantes* (2005).
 - 9) N. Unwin, *J. Mol. Biol.*, **346**, 967-989 (2005).
 - 10) M. Zouridakis, P. Zisimopoulou, K. Poulas and S. J. Tzartos, *IUBMB Life*, **61**, 407-423 (2009).
 - 11) R. C. Hogg, B. Buisson and D. Bertrand, *Biochem. Pharmacol.*, **70**, 1267-1276 (2005).
 - 12) T. Grutter and J. P. Changeux, *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 459-463 (2001).
 - 13) E. X. Albuquerque, E. F. R. Pereira, M. Alkondon and S. W. Rogers, *Physiol. Rev.*, **89**, 73-120 (2009).
 - 14) D. L. Minor Jr, *Neuron*, **54**, 511-533 (2007).

- 15) S. Liu, M. S. Babcock, J. Bode, J. S. Chang, H. D. Fischer, R. L. Garlick, G. S. Gill, E. T. Lund, B. J. Margolis, W. R. Mathews, B. N. Rogers, M. Wolfe, V. Groppi and E. T. Baldwin, *Protein Expr. Purif.*, **79**, 102-110 (2011).
- 16) J.-P. Changeux and A. Taly, *Trends Mol. Med.*, **14**, 93-102 (2008).
- 17) N. Absalom, P. Schofield and T. Lewis, *Neurochem. Res.*, **34**, 1805-1815 (2009).
- 18) P. H. N. Celie, S. E. Van Rossum-Fikkert, W. J. Van Dijk, K. Brejc, A. B. Smit and T. K. Sixma, *Neuron*, **41**, 907-914 (2004).
- 19) G. B. Wells, *Front. Biosci.*, **13**, 5479-5510 (2008).
- 20) I. E. Kasheverov, M. N. Zhmak, A. Fish, P. Rucktooa, A. Y. Khruschov, A. V. Osipov, R. H. Ziganshin, D. D'hoedt, D. Bertrand, T. K. Sixma, A. B. Smit and V. I. Tsetlin, *J. Neurochem.*, **111**, 934-944 (2009).
- 21) A. L. Cashin, E. J. Petersson, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 350-356 (2005).
- 22) N. Le Novere, T. Grutter and J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 3210-3215 (2002).
- 23) M. Schapira, R. Abagyan and M. Totrov, *BMC Struct. Biol.*, **2**, 1-8 (2002).
- 24) A. L. Cashin, M. M. Torrice, K. A. McMenimen, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *Biochemistry*, **46**, 630-639 (2007).
- 25) W. Y. Lee and S. M. Sine, *J. Gen. Physiol.*, **124**, 555-567 (2004).
- 26) S. B. Hansen, Z. Radic, T. T. Talley, B. E. Molles, T. Deerinck, I. Tsigelny and P. Taylor, *J. Biol. Chem.*, **277**, 41299-41302 (2002).
- 27) S. K. Panigrahi and G. R. Desiraju, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, **67**, 128-141 (2007).
- 28) G. S. H.-J. Böhme, "Protein-Ligand Interactions," Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- 29) S. Koné, Thèse de doctorat, Université de Cocody-Abidjan/Université de Nantes (2009).
- 30) <http://www.alz.co.uk/research/world-report>.

- 31) B. Kaj, J. d. L. Mony and Z. Henrik, *LANCET*, **368**, 387-403 (2006).
- 32) A. V. Terry and J. J. Buccafusco, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 821-827 (2003).
- 33) J. J. Chen, *Am. J. Manag. Care*, **4**, 87 (2010).
- 34) M. Quik and G. Jeyarasasingam, *Eur. J. Pharmacol.*, **393**, 223-230 (2000).
- 35) S. Leonard, C. Breese, C. Adams, K. Benhammou, J. Gault, K. Stevens, M. Lee, L. Adler, A. Olincy, R. Ross and R. Freedman, *Eur. J. Pharmacol.*, **393**, 237-242 (2000).
- 36) K.-i. Ueno, H. Togashi, M. Matsumoto, S. Ohashi, H. Saito and M. Yoshioka, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **302**, 95-100 (2002).
- 37) B. Moulard, F. Picard, S. le Hellard, C. Agulhon, S. Weiland, I. Favre, S. Bertrand, A. Malafosse and D. Bertrand, *Brain Res. Rev.*, **36**, 275-284 (2001).
- 38) C. M. Martin-Ruiz, M. Lee, R. H. Perry, M. Baumann, J. A. Court and E. K. Perry, *Mol. Brain Res.*, **123**, 81-90 (2004).
- 39) L. P. Dwoskin, A. M. Smith, T. E. Wooters, Z. Zhang, P. A. Crooks and M. T. Bardo, *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 732-743 (2009).

Chapitre 2

Méthodologies théoriques et expérimentales

AJ La banque de données des protéines (PDB) : un outil de choix pour l'étude de la structure et des interactions des nAChRs avec leurs ligands

La banque de données des protéines (Protein Data Bank : PDB)¹ constitue une des ressources sur la structure et les propriétés des macromolécules d'intérêt biologique parmi les plus importantes au monde. L'idée d'une telle base de données est née en 1970 grâce à Helen M. Berman, Edgar Meyer et Gerson Cohen. Leur souhait était de créer une plateforme de stockage dédiée aux structures de protéines et plus généralement aux macromolécules d'intérêt biologique la plus complète possible et d'accès public. La PDB naquit donc en 1971 au Brookhaven National Laboratories (BNL) avec 7 structures...² Aujourd'hui, la PDB compte plus de 85 000 entrées.

IJ Présentation de la PDB.

Née en 1971 sous l'effort conjoint du Laboratoire national de Brookhaven et du Centre Cristallographique de Cambridge (CCDC), la PDB a vu dans les années 80 le nombre de ses structures augmenter de façon importante grâce à l'action conjuguée de plusieurs facteurs. Ainsi, l'amélioration technologique de toutes les étapes du processus de résolution cristallographique, l'addition des structures déterminées par RMN, la mise en réseau et le partage de ces informations ont permis l'augmentation rapide du nombre de structures.³ En 1998, la direction de la PDB est passée sous la responsabilité du consortium « Research Collaboratory for Structural Bioinformatics » (RCSB).³ Cette institution était initialement composée des Universités de Rutgers (New Jersey), de San Diego (Californie) et du National Institute of Standards and Technology (NIST). Quelques années plus tard, d'autres

ressources importantes ont intégré la plate-forme de la PDB. Il s'agit de la base de données de structures de macromolécules (MSD) de l'Institut Européen de Bioinformatique (EBI) et de la banque de données dédiée aux structures de biomolécules résolues par RMN (BMRB) mise au point à l'Université du Wisconsin-Madison.² Aujourd'hui, l'EBI, le RCSB et la banque de données des protéines développée au Japon se sont réunis pour former la banque de données mondiale des protéines (Worldwide Protein Databank (wwPDB)), qui a pour but de maintenir à jour une archive PDB unique de données structurales macromoléculaires accessible gratuitement et publiquement.⁴ Dans la version actuelle, environ 87% des structures répertoriées ont été résolues par des techniques de diffraction (rayon X ou neutrons), 13% par RMN, et seulement 0,5% par cryomicroscopie électronique.⁵

De nombreux logiciels de visualisation, d'exploitation et d'analyse des données sont disponibles via internet à travers la PDB. Le programme WHAT_CHECK⁶ est ainsi un outil de validation des données structurales parmi les plus importants accessible à travers la PDB. WHAT_CHECK permet en effet de vérifier des données essentielles pour la précision et la qualité du modèle telles que le nom et le type des atomes, la nature des acides aminés et la position des atomes d'hydrogène. Dans le même ordre d'idées, ce programme permet également de générer des cartes de Ramachandran, de façon à analyser la conformation du squelette peptidique d'une protéine et détecter les éventuelles anomalies d'angles de torsion. Par ailleurs, il permet de localiser à l'intérieur d'une structure des erreurs au niveau des positions atomiques (atomes manquants ou inattendus) et des coordonnées des atomes. Enfin, le programme vérifie la valeur des paramètres géométriques (longueur des liaisons, angles de valence) de la structure protéique.²

Un autre programme très apprécié par la communauté scientifique pour le contrôle des structures protéiques est PROCHECK. Ce programme permet de vérifier la stéréochimie

d'une structure protéinique, d'estimer la qualité globale d'une structure en la comparant avec d'autres structures bien affinées de même résolution et permet également de repérer les régions qui nécessitent une investigation plus poussée du fait d'incertitudes ou d'erreurs manifestes. Cette suite de programmes n'est pas seulement nécessaire pour évaluer la qualité d'une structure protéinique qui vient d'être établie, elle l'est aussi pour des structures déjà existantes.⁷

PDBsum⁸ est un service web accessible sous forme de lien à travers la PDB qui permet de naviguer, de visualiser et d'exploiter rapidement les données de la PDB.⁹ De nombreux outils y sont disponibles notamment LIGPLOT qui donne des diagrammes d'interaction protéine-ligand et NUCPLOT dédié aux interactions acides nucléiques-protéines.

Un très grand nombre d'autres ressources sont disponibles à travers la PDB, qu'elles concernent des programmes, notamment d'alignement de séquences, ou des liens vers des bases de données de séquences ou encore de structures de ligands. La PDB apparaît donc très clairement comme un portail d'informations et de ressources incontournable pour le chimiste s'intéressant aux interactions avec des macromolécules biologiques.

II- Critères de recherche et méthodologie

Pour cette thèse, nous avons utilisé la PDB pour répertorier les structures tridimensionnelles d'AChBP résolues par cristallographie des rayons X, dans la mesure où aucune structure de nAChR de résolution suffisante n'est disponible à l'heure actuelle. La recherche des structures d'AChBP a été effectuée en utilisant le sigle « AChBP » dans la fenêtre d'interrogation de la base de données. Cette requête a ainsi permis de recenser 57 entrées de structures d'AChBP issues de 3 espèces biologiques différentes dont seulement

deux correspondent à des formes libres. Les structures d'AChBP répertoriées dans la PDB ont une résolution variant de 1,75 à 4,20Å. De façon à analyser les éventuelles réorganisations structurales au niveau du site de reconnaissance des agonistes entre formes libre et complexée, nous avons séparé en deux sous-ensembles distincts les sites inoccupés et occupés par un ligand.

II.1- Conformation du tryptophane

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre I, le site de fixation des agonistes est situé à l'interface de deux sous-unités dont une est la principale. Le Trp 143 constituant un des éléments essentiels du site de fixation,¹⁰ nous avons cherché à analyser de façon précise les caractéristiques structurales et conformationnelles de ce résidu à partir des données collectées dans la PDB. Pour cette étude, nous avons considéré 6 angles de torsion φ , ψ , χ_1 , χ_2 , ω_0 et ω_1 (Figure 1) sélectionnés récemment dans la littérature¹¹ pour comparer les fluctuations structurales du résidu Trp dans différents environnements (état isolé, solution et dans les protéines). Les angles φ et ψ correspondent aux angles de la chaîne peptidique, les angles χ_1 et χ_2 appartiennent à la chaîne latérale et permettent de mesurer les changements d'orientation du noyau indole par rapport à la chaîne principale. Les angles ω_0 et ω_1 , quant à eux, correspondent aux angles entre les groupements CO et NH des liaisons peptidiques. Du fait du nombre important de sites, le logiciel Prequest¹² a été utilisé pour créer des sous-ensembles de données à partir des structures répertoriées dans la PDB. Les structures correspondantes ont été visualisées grâce au logiciel Mercury et le logiciel Conquest¹³ a été exploité pour effectuer des recherches propres à ces sous-ensemble de structures, permettant ainsi l'automatisation de la tâche et donc un gain de temps. Dans une dernière phase, le

logiciel Vista¹⁴ (Vista, Centre Cristallographique de Cambridge (1995)) a permis l'analyse statistique (calcul de différents paramètres, représentation des données sous forme d'histogrammes...) des résultats.

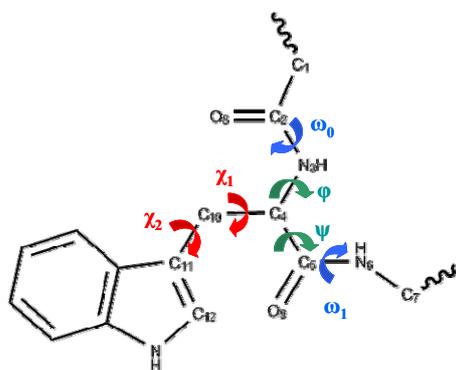


Figure 1- Principaux angles de torsion du Trp 143.

II.2.- Structure du site de fixation

Pour étudier la structure du site de fixation des ligands, nous avons sélectionné les résidus voisins en séquence du Trp 143 (Ser 142, Thr 144), spatialement proches et/ou en interaction avec l'Asp 85. Afin d'appréhender les fluctuations structurales caractérisant l'arrangement de ces quatre acides aminés, une série de superposition de ces motifs, en prenant en compte les atomes lourds impliqués dans le réseau de liaisons H ainsi que ceux appartenant aux chaînes principales des résidus Ser 142 et Trp 143, a été réalisée (total de 13 paires atomiques). Seules les structures PDB ayant une résolution inférieure ou égale à 2,20 Å ont été sélectionnées, la structure de référence correspondant au site libre de l'entrée 2Y7Y.^{15, 16} Cette structure a en effet été proposée récemment, pour remplacer la référence précédente, 2W8E,¹⁵ correspondant à la forme apo. Les superpositions des structures et les calculs de RMSD¹⁷ correspondants (root mean square deviation) [eq 2.1] ont été réalisés avec le logiciel Pymol.¹⁷

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N \Delta d^2}{N}} \quad (2.1)$$

Dans cette équation, d représente la distance entre deux atomes d'une paire homologue et N correspond au nombre total de paires atomiques définies.

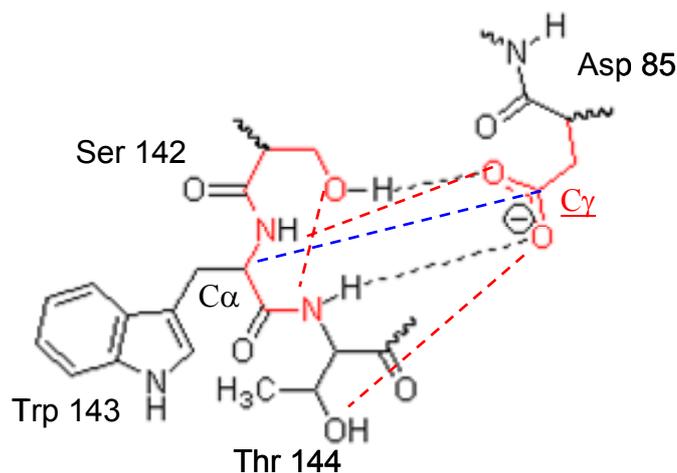


Figure 2- Représentation schématique d'une partie du site de fixation montrant (en rouge) les treize atomes pris en compte dans la comparaison et le calcul du RMSD des différentes structures d'AChBP.

Cette étude nous a permis de caractériser de façon approfondie le motif mis en lumière par Cashin *et al.*¹⁸ Ainsi, pour appréhender plus en détail sur un plan structural les modifications éventuelles du réseau de liaison H entre les différentes formes (complexées ou non) de l'AChBP, nous avons mesuré un ensemble de distances interatomiques sélectionnées par Cashin pour vérifier l'existence de ces interactions. Ces paramètres correspondent, d'une part, aux distances entre les atomes d'oxygène (OD1 et OD2) du groupe carboxylate de l'aspartate et les atomes d'azote des groupes NH du squelette peptidique du Trp 143 et de la Thr 142, et, d'autre part, aux distances entre les atomes d'oxygène du groupe aspartate et les atomes d'oxygène des chaînes latérales des résidus Ser 142 et Thr 144. La distance entre le carbone γ du carboxylate de l'Asp 85 et le carbone α du Trp 143 a également été recensée,

de même que la distance entre l'oxygène de la chaîne latérale de la Thr 142 et l'azote du squelette peptidique de la Thr 144. Un total de sept distances a donc été analysé.

B) La spectroscopie IRMPD

I) Introduction

La spectroscopie laser IR de dissociation par absorption résonante multi-photonique (IRMPD : infrared multiphoton dissociation) est une technique permettant, lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec des calculs de chimie quantique, l'élucidation structurale de cations moléculaires en phase gazeuse.^{19, 20} On peut ainsi étudier des structures d'intérêt biologique telles que des oligosaccharides, des oligonucléotides, des peptides, des ligands d'intérêt pharmaceutique.^{20, 21} Cette méthode peut être particulièrement efficace pour étudier le site de protonation d'ions biomoléculaires, ou encore la formation de complexes entre des atomes métalliques et différents types de ligands.²² Grâce à un temps de faisceau obtenu au Centre Laser Infrarouge d'Orsay (CLIO), nous avons pu déterminer les conformations de l'épibatidine sous sa forme protonée en phase gazeuse. Ces données ont été confrontées à celles rapportées dans la littérature à travers la mise en œuvre de la même technique sur la nicotine et l'acétylcholine dans leur forme cationique. La spectroscopie IRMPD permet donc de déterminer les propriétés structurales intrinsèques des cations biomoléculaires, dans un milieu affranchi des effets d'environnement. De telles données sont donc importantes pour étudier en profondeur le comportement de biomolécules.²³

II] Principe

Les ions étudiés peuvent être excités et fragmentés par l'absorption d'un ou plusieurs photon(s), cette étape constituant le fondement de la spectroscopie IRMPD. On utilise à cette fin un laser capable de fragmenter des ions. Seuls des lasers à électrons libres, à CO₂ ou à CO, sont suffisamment puissants pour induire cette fragmentation.²⁴ Historiquement, les lasers employés émettaient un rayonnement appartenant au domaine UV et un seul photon était nécessaire pour dissocier un ion. Aujourd'hui, on utilise essentiellement des lasers émettant des photons de la région infrarouge du spectre²¹ (entre 1000 et 2000 cm⁻¹). L'énergie d'un photon IR étant de quelques centaines de meV seulement, alors que l'ordre de grandeur d'une liaison covalente est de plusieurs eV (4,5 eV pour la liaison H-H par exemple) l'ion doit absorber au moins une dizaine de photons²³ pour être fragmenté. Le mécanisme de dissociation est obtenu grâce à l'absorption de la radiation IR par l'un des modes de vibrations fondamentaux (transition $\nu=0$ à $\nu=1$) présents dans l'ion, suivie par une rapide redistribution de l'énergie sur tous les degrés vibrationnels de plus basse fréquence.^{21,}
²³ Lorsque le mode de vibration ayant absorbé le photon IR est revenu à l'état vibrationnel fondamental, l'ion peut de nouveau absorber un autre photon. L'énergie du photon précédent étant conservée par le système, la répétition du processus peut donc aboutir au dépassement de la limite de dissociation d'une liaison au sein de l'ion.²³ L'activation est donc progressive grâce à l'absorption consécutive de plusieurs photons. La dissociation se produit alors par des voies de fragmentation de basses énergies, le plus souvent par celle de plus basse énergie.²¹

Pour obtenir un spectre IRMPD, on sélectionne en masse l'espèce voulue à l'aide d'un spectromètre de masse (ion parent) et on détecte la baisse du signal apparaissant à son rapport m/q (avec m la masse de l'ion et q sa charge), en même temps que l'apparition des

fragments. Ensuite, on mesure le taux de fragmentation $k(E)$ pour une énergie interne donnée. On a alors pour une dissociation statistique unimoléculaire [équation 2.2]:

$$\frac{F}{F + P} = 1 - e^{-k(E)t} \quad (2.2)$$

Dans cette équation, F correspond à la somme des ions fragments et P le nombre d'ions parents. Pour obtenir un spectre, le temps d'irradiation étant constant, il suffit de tracer la quantité $-\ln(1-F/(F+P))$ en fonction de la longueur d'onde du laser.²³ Les calculs théoriques permettent l'interprétation des données expérimentales : les spectres infrarouges théoriques des principaux conformères des ions étudiés sont comparés au spectre expérimental, ce qui conduit à l'obtention des populations des différentes conformations contribuant au spectre observé.

III] Le Centre Laser Infrarouge d'Orsay (CLIO)

Dans le cadre de cette thèse, nous avons eu accès à l'équipement utilisé au centre CLIO constitué d'un laser à électrons libres couplé à un spectromètre de masse Bruker Esquire 3000+ équipé d'une source électrospray et d'un piège à ions. La source électrospray et le piège à ions servent à générer et à stocker les ions. Le fonctionnement d'un laser à électrons libres (Figure 3) consiste à faire passer des électrons accélérés à une vitesse relativiste dans des dispositifs appelés « onduleurs ». Ces onduleurs sont constitués d'aimants placés les uns à la suite des autres, mais de façon à ce que deux aimants successifs soient antiparallèles. Les électrons ont alors un mouvement ondulant qui a pour conséquence l'émission d'un rayonnement synchrotron. En capturant la lumière dans une cavité optique, les électrons fraîchement injectés interagissent avec les pulsations de lumière, puis génèrent

une émission stimulée. La longueur d'onde du rayonnement stimulé est déterminée par la condition de résonance du laser.²⁴

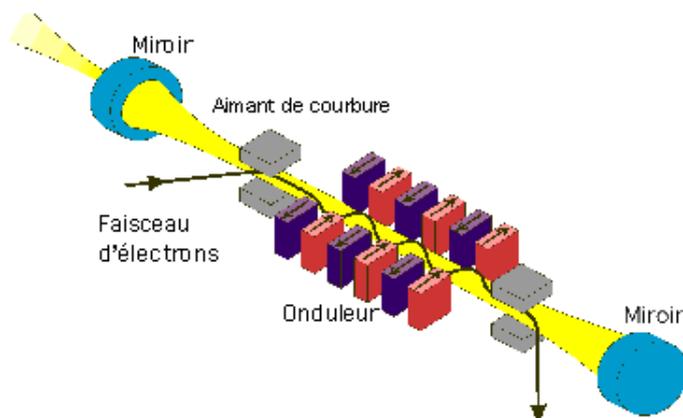


Figure 3- Schéma du laser à électrons libres CLIO.²³

Les pulsations du laser CLIO consistent en des macro-impulsions de lumière de 8 μs , délivrées à la fréquence de 25 Hz. Chaque macro-impulsion est composée d'environ 500 micro-impulsions de quelques picosecondes. Les micro- et macro-impulsions ont des énergies respectives d'environ 60 μJ et 30 mJ. La résolution du laser est de l'ordre de 15 cm^{-1} dans la gamme utilisée (entre 1000 et 1850 cm^{-1}).²³

Le piège à ions est de nature quadrupolaire et permet de stocker les ions et de les sélectionner en masse. A l'intérieur, les ions ont une trajectoire sphérique correspondant à un rayon r qui augmente avec le rapport m/q . Le piège est percé de manière à ce que le laser IR passe à travers. La sélection en masse s'effectue grâce à un champ de radiofréquence excitant les ions possédant un rapport m/q différent de l'ion étudié. Le laser est ensuite utilisé pour dissocier les ions sélectionnés. Enfin, on détecte les fragments pour en déduire le taux de fragmentation.²³

C] La spectroscopie IRTF : une méthode puissante pour l'analyse structurale des ligands en solution et l'étude de leurs interactions par liaison H

I] Introduction

La spectroscopie infrarouge est une technique de choix pour l'étude des interactions par liaison H. En effet, son échelle temporelle permet d'identifier, à partir de signaux distincts, non seulement les espèces libres et les espèces associées par liaison H, mais également les différents complexes éventuellement formés en solution. L'existence de ces signaux propres à chaque espèce permet la quantification de l'ensemble des complexes formés entre un accepteur de liaison H (B) et un donneur de liaison H (AH) [eq 2.3]²⁵



Si l'une des espèces possède une sonde vibrationnelle sensible à cette association, située dans une zone transparente du solvant, on peut alors mesurer avec précision la constante de complexation par liaison H. La mesure de la variation d'absorbance de la bande d'absorption du vibreur libre lorsque l'on rajoute des quantités croissantes de l'autre espèce permet ainsi d'accéder à cette grandeur.²⁵

La présence dans l'espèce chimique à analyser, d'une sonde vibrationnelle sensible à l'environnement intra et intermoléculaire offre également la possibilité d'étudier le comportement de la molécule dans différents solvants et à différentes températures. De telles études permettent de sonder l'influence du milieu sur les propriétés physicochimiques d'une molécule, par exemple en terme de conformation, et d'interactions. Dans certains cas, il peut être par exemple possible de déterminer expérimentalement par cette technique des

constantes d'équilibre d'échanges conformationnels. Celles-ci peuvent être estimées grâce aux variations, lors de mesures effectuées à différentes températures, des intensités intégrées de la bande du conformère principal et de l'épaulement dû au conformère minoritaire.²⁶

II] Paramètres thermodynamiques et spectroscopiques accessibles

II.1. L'échelle pK_{BHX} : une mesure de la basicité de liaison H

L'importance de la liaison H a incité les chercheurs à mettre au point dès 1969 des échelles quantitatives permettant de déterminer précisément l'influence de l'environnement moléculaire sur la force des interactions impliquant les principales fonctionnalités organiques. La diversité de la chimie organique étant beaucoup plus importante du point de vue des groupes potentiellement accepteurs de liaison H (se comportant comme des bases de Lewis : puisque donneurs d'électrons) par rapport aux groupes donneurs (se comportant comme des acides de Lewis dans la mesure où ils sont accepteurs d'électrons), les travaux dédiés à la mise au point de telles échelles ont en premier lieu été consacrés à la basicité de liaison H. C'est ainsi que Taft^{27, 28} et Arnett,²⁹ en sélectionnant pour ces mesures le 4-fluorophénol, ont entrepris ces travaux. Cette molécule a été choisie pour plusieurs raisons (i) elle donne des interactions plus fortes que le phénol avec l'ensemble des bases (ii) elle est peu sujette à l'autoassociation et facile à purifier par sublimation (iii) elle évite la protonation des bases dans les solvants utilisés.²⁵ La basicité de liaison H d'une série de bases B est mesurée par la constante d'équilibre du complexe 1:1 [eq 2.4-5] dans le CCl_4 :



$$K_c = C_{\text{complex}} / (C_{\text{base}} C_{\text{pFP}}); \quad K_x = x_{\text{complex}} / (x_{\text{base}} x_{\text{pFP}}) \quad (2.5)$$

Par la suite, notre groupe a repris ces mesures et constitué une base de données unique dans le domaine de la liaison H, dénommée pK_{BHX} [eqs 2.6-7 où K_c et K_x sont les constantes de complexation, C la concentration molaire à l'équilibre, x la fraction molaire à l'équilibre] définie par :

$$pK_{\text{BHX}} = \log K_c; \quad \Delta G_{\text{BHX}}^0 = -RT \ln K_x \quad (2.6)$$

$$\Delta H^0 = RT^2 (\partial \ln K_x / \partial T)_p \quad (2.7)$$

La version actuelle de la base de données renferme les valeurs de près de 1400 composés, son intérêt dans le domaine de la chimie médicinale ayant récemment été démontré.³⁰ Par ailleurs, l'importance de ces paramètres pour le monde industriel est attestée par l'acquisition de la base de données par plusieurs groupes pharmaceutiques internationaux. Un des avantages de l'échelle pK_{BHX} par rapport à d'autres échelles de basicité de liaison H est qu'elle peut permettre de déterminer la constante individuelle de basicité de chaque site des molécules polyfonctionnelles.³⁰ Par exemple, dans le cas d'un composé organique comportant deux sites potentiellement accepteurs de liaison H, le pFP forme deux complexes 1:1 caractérisés par des concentrations respectives C_1 et C_2 et des constantes d'équilibre K_1 et K_2 . Le contrôle minutieux des conditions de concentration permet à la fois d'éviter l'autoassociation du donneur de liaison H et la formation de complexes de stœchiométrie 1:n (accepteur / donneur de liaison H), phénomènes qui fausseraient les grandeurs expérimentales. La constante d'équilibre totale s'exprime donc en fonction de la somme de C_1 et C_2 [eq. 2.8] :

$$K_t = \frac{C_{C_1} + C_{C_2}}{C_{\text{base}} C_{\text{pFP}}} \quad (2.8)$$

Ce qui donne la relation suivante entre K_1 et K_2 et la constante totale K_t [eq 2.9] :

$$K_t = K_1 + K_2 \quad (2.9)$$

Pour les composés possédant plus de deux sites potentiellement accepteurs de liaison H, la généralisation de cette expression conduit à l'équation 2.10 :

$$K_t = \sum_{i=1}^n K_i \quad (2.10)$$

Des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe ont cependant montré que dans la pratique, la détermination expérimentale simultanée de l'ensemble des constantes individuelles par cette méthode n'est réalisable que dans des cas limités.²⁵ Dans ces conditions, des méthodes alternatives doivent être mises en œuvre pour évaluer les constantes individuelles propres à certains sites.

II.2. L'échelle spectroscopique $\Delta\nu(\text{OH})$

Une autre manière de déterminer indépendamment la basicité de liaison H consiste à mesurer le déplacement de fréquence de la bande d'élongation de la fonction hydroxyle $\Delta\nu(\text{OH})$ d'un alcool, généralement le méthanol (dont la bande $\nu(\text{OH})$ libre est située à 3644 cm^{-1} dans le CCl_4), lors de l'association avec la base étudiée [eq 2.11]. La mesure de $\Delta\nu(\text{OH})$ avec des donneurs d'acidité de liaison H significativement différentes (par exemple, par ordre croissant d'acidité, méthanol, trifluoroéthanol et p-fluorophénol) peut être effectuée dans le cas de molécules polyfonctionnelles pour visualiser la contribution de l'ensemble des sites, parfois « masqués » par des vibrations propres au donneur et/ou du fait d'un pouvoir accepteur de liaison H faible.

$$\Delta\nu_{\text{OH}}^{\text{alcool}} = \nu(\text{OH,alcool libre}) - \nu(\text{OH,alcool} \cdots \text{B}) \quad (2.11)$$

D) Calculs de chimie quantique.

I) Introduction

Pour compléter les études expérimentales et l'analyse des données cristallographiques effectuées, des calculs de chimie quantique de différents niveaux de sophistication ont été réalisés. Dans une première étape, la surface d'énergie potentielle des différents ligands sélectionnés a été explorée de façon à déterminer leurs conformations privilégiées et confronter ces données aux observations expérimentales disponibles. Des propriétés physicochimiques des minima énergétiques ont également été évaluées. Dans une deuxième phase, un motif structural du site de fixation des agonistes des nAChRs dans l'AChBP a été étudié. Dans un dernier temps, la complexation de quelques agonistes au sein d'un modèle du site de fixation des agonistes des nAChRs dans l'AChBP a été étudiée de façon à quantifier les variations de paramètres structuraux et énergétiques relatives aux différentes interactions.

Dans ce sous-chapitre, une présentation générale des différentes méthodes utilisées sera tout d'abord effectuée. Cet exposé permettra d'appréhender les approximations inhérentes à ces méthodologies, leur niveau d'approximation et leur degré d'exigence respectifs en termes de ressources informatiques.

I.1- Présentation générale des méthodes utilisées

Un des principaux buts de la chimie quantique est de résoudre de la manière la plus juste possible l'équation de Schrödinger non-relativiste indépendante du temps [eq 2.12], où E est l'énergie totale du système, H l'opérateur hamiltonien non relativiste et ψ la fonction d'onde.

$$H\Psi = E\Psi \quad (2.12)$$

Cette fonction d'onde ψ permet de déterminer l'état et toutes les propriétés observables d'un système quantique. L'équation de Schrödinger ne peut être parfaitement résolue du fait de la corrélation du mouvement des électrons et des noyaux. La communauté scientifique a donc développé différentes méthodes de résolutions approchées utilisant diverses approximations. Dans cette partie du manuscrit, nous décrirons succinctement les principales méthodes que nous avons utilisées, c'est-à-dire les méthodes post Hartree-Fock et issues de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT). Dans un premier temps, nous présenterons la méthode Hartree-Fock, développée en 1928 et historiquement très utilisée. Cette présentation permettra par ailleurs d'appréhender ses faiblesses et la nécessité de développement de méthodes plus élaborées (post-Hartree-Fock) ou issues de la DFT.

I.2- La méthode Hartree-Fock (HF)

La méthode Hartree-Fock est une méthode *ab initio* basée sur l'approximation orbitalaire. Cette approximation consiste à exprimer la fonction d'onde électronique comme le produit de N fonctions monoélectroniques $\varphi_i(J)$. Les électrons étant des fermions, un type de particules indiscernables, l'interchangement de deux particules ne doit pas modifier les propriétés observables de la fonction d'onde et celle-ci doit donc être antisymétrique lors d'un tel changement. Cette règle correspond au principe de Pauli. Mathématiquement, cette caractéristique implique d'écrire la fonction d'onde sous la forme d'un déterminant, appelé le déterminant de Slater [eq 2.13], où N est le nombre total d'électrons et φ une spin-orbitale,

$$\psi_{el}(1, 2, \dots, N) = \frac{1}{\sqrt{N!}} \begin{vmatrix} \varphi_1(1) & \varphi_2(1) & \dots & \varphi_N(1) \\ \varphi_1(2) & \varphi_2(2) & \dots & \varphi_N(2) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \varphi_1(N) & \dots & \dots & \varphi_N(N) \end{vmatrix} \quad (2.13)$$

c'est à dire une fonction monoélectronique qui s'exprime comme le produit d'une fonction des coordonnées de l'électron i (l'orbitale) et d'une fonction de spin. L'étape suivante consiste à déterminer la fonction d'onde électronique totale optimale ψ_{el} , c'est-à-dire caractérisée par la valeur la plus basse de l'énergie, à travers le principe des variations. Le problème repose donc sur la recherche des meilleures spins-orbitales, c'est-à-dire celles qui confèrent l'énergie la plus basse au système. A l'issue de cette phase, on obtient les équations canoniques de Hartree-Fock [eq. 2.14], dans lesquelles F est

$$F(\alpha)\varphi_i(\alpha) = \varepsilon_i \cdot \varphi_i(\alpha) \quad \alpha = 1, 2, \dots, n_{el} \quad (2.14)$$

l'opérateur de Fock et les termes ε_i sont des multiplicateurs de Lagrange ayant pour interprétation physique une énergie d'orbitale. L'opérateur de Fock est un opérateur monoélectronique et on obtient donc n équations où les ε_i sont des valeurs propres de l'opérateur F . Afin de résoudre ces équations, Hartree a proposé une méthode de résolution dite méthode du champ auto-cohérent (Self Consistent Field en anglais (SCF)). Au départ de la résolution, il est nécessaire de partir d'un jeu d'orbitales d'essai $\varphi_0(\alpha)$ pour toutes les orbitales occupées, celles-ci étant utilisées pour construire l'opérateur $F_1(\alpha)$. La résolution de cette équation permet alors d'obtenir un nouveau jeu d'orbitales $\varphi_1(\alpha)$ utilisé à son tour pour construire un nouvel opérateur de Fock $F_2(\alpha)$. Cette opération est répétée jusqu'à ce qu'entre deux itérations, les variations des différents termes de l'équation : $\varphi_i(\alpha)$, $F_i(\alpha)$ et ε_i soient minimales. Le jeu d'orbitales ainsi obtenu conduit à la valeur minimale de l'énergie. Cette solution est donc stationnaire ou autocohérente d'où son nom. Une approche proposée par Roothaan en 1951 décompose les orbitales moléculaires en une combinaison linéaire d'orbitales atomiques. Cette méthode est appelée MO-LCAO (Molecular Orbital-Linear Combination Atomic Orbital [eq 2.15] où l'ensemble des N fonctions φ_i est appelé base de

fonctions et chaque orbitale atomique φ_i est associée à un coefficient α_i optimisé pendant le processus SCF :

$$\phi = \sum_{i=1}^N \alpha_i \varphi_i \quad (2.15)$$

Malheureusement, la méthode HF donne toujours un résultat supérieur à l'énergie exacte. On désigne par le nom de limite Hartree-Fock, la solution à l'équation de HF atteinte avec l'utilisation d'une base de fonctions infinies et qui s'approchera au plus près de la valeur réelle. Cependant, cette méthode traitant indépendamment le mouvement des électrons, l'énergie interne n'est pas la « vraie » énergie du système. La différence entre les deux est l'énergie de corrélation, due au fait qu'en réalité la position de chaque électron est influencée par la position des autres puisqu'en tant que corpuscules chargés négativement ils se repoussent, et qu'en tant que fermions ils se repoussent s'ils sont de même signe. Les méthodes post Hartree-Fock ont ainsi été développées pour prendre en compte cette corrélation électronique.

I.3- L'approche perturbative de Møller-Plesset (MP n)

Le traitement quasi-indépendant des mouvements des électrons dans la méthode Hartree-Fock se traduit par la non prise en compte des effets de corrélation électronique et donc par une surestimation systématique de l'énergie du système considéré. L'objectif des méthodes post Hartree-Fock telles que les méthodes Møller-Plesset est d'utiliser des orbitales virtuelles issues du calcul Hartree-Fock afin de favoriser les situations où les électrons s'évitent pour ensuite réintroduire la corrélation électronique. Dans un premier ensemble de méthodes,

basées sur le traitement de la corrélation par « interactions de configurations », la fonction d'onde totale du système n'est plus décrite par un seul déterminant de Slater correspondant aux OM occupées mais par une combinaison linéaire de déterminants de Slater dans laquelle chaque déterminant représente une configuration électronique faisant intervenir des OM initialement vacantes. Ces méthodes restent très exigeantes en ressources informatiques. Dans un deuxième type de méthodologies, une correction (perturbation) est ajoutée à la fonction d'onde du système pour simuler le problème à n-corps. Le but est d'utiliser un opérateur plus facilement utilisable qu'un opérateur plus complexe qui n'utiliserait pas d'orbitales virtuelles. Ainsi, on utilise au départ l'hamiltonien $H^{(0)}$ correspondant à celui de Hartree Fock et une perturbation V comme la différence entre le vrai Hamiltonien et celui de HF. Moller et Plesset ont ainsi publié en 1934³¹ une approche perturbative consistant à séparer l'opérateur hamiltonien en deux parties [eq 2.16]:

$$H = H^{(0)} + \lambda V \quad (2.16)$$

Où V est le potentiel de fluctuation introduisant la perturbation, λ un paramètre sans dimension et $H^{(0)}$ la somme des opérateurs de Fock servant d'opérateur non perturbé tel que :

$$H^{(0)} = \sum_{i=1}^n f_i \quad (2.17)$$

$$H^{(0)} |\psi_i\rangle = E_i |\psi_i\rangle$$

Si on développe cet hamiltonien en série de Taylor, alors l'énergie et la fonction d'onde de l'état fondamental ont pour expression :

$$E = E^{(0)} + \lambda E^{(1)} + \lambda_2 E^{(2)} \dots \quad (2.18)$$

$$|\psi\rangle = |\psi^{(0)}\rangle + \lambda |\psi^{(1)}\rangle + \lambda_2 |\psi^{(2)}\rangle \dots$$

Les développements d'ordre 0, 1 et 2 donnent les relations suivantes :

$$\begin{aligned}
 E^{(0)} &= E_0 \\
 E^{(1)} &= \langle \psi_i | V | \psi_i \rangle \\
 E^{(2)} &= \sum_i \frac{|\langle \psi_i | V | \psi_i \rangle|^2}{E_0 - E_i}
 \end{aligned}
 \tag{2.19}$$

Cette méthode porte l'acronyme MPn où n est l'ordre auquel la perturbation est tronquée. Comme MP1 n'est pas plus performante que HF pour la détermination de l'énergie, il faut utiliser au minimum la perturbation d'ordre 2 (MP2) pour estimer l'énergie de corrélation. Le méthode MP2 est de nos jours la méthode MP la plus utilisée du fait de son temps de calcul relativement peu coûteux.⁴ Elle permet ainsi de prendre en compte une partie de l'énergie de corrélation. Cependant il convient de garder à l'esprit d'une part, que cette approche est non variationnelle, l'énergie obtenue pouvant par conséquent être *plus basse* que l'énergie exacte et d'autre part qu'elle n'est fiable que lorsque ψ_0 décrit qualitativement bien le système, c'est-à-dire si les termes correctifs sont petits par rapport à la grandeur à corriger.

I.4- Le traitement local de la corrélation électronique

Le principal obstacle à une utilisation plus systématique des méthodes *ab initio* corrélées est leur exigence en temps de calcul, qui augmente très fortement avec la taille du système étudié. Pour la méthode MP2, qui constitue le traitement le plus approché de la corrélation électronique, le temps de calcul est ainsi proportionnel à N^5 où N est le nombre de bases de fonctions. Cet inconvénient limite la taille des systèmes auxquels on peut appliquer ces méthodes. Cependant, l'utilisation de méthodes fondées sur un traitement local de la corrélation électronique permet de réduire de façon significative le temps de calcul. Avec ces méthodes, basées sur une description en orbitales localisées du système, l'énergie

de corrélation d'une paire d'électrons décroît rapidement et régulièrement en fonction de la distance car seules les orbitales virtuelles spatialement proches des orbitales occupées contribuent significativement. Saebo et Pulay ont développé dans le cadre de l'approche perturbative de Møller et Plesset des méthodes locales jusqu'à l'ordre 4.³² Peu après la publication de leurs travaux, les mêmes auteurs ont montré que leurs méthodes locales recouvrent plus de 98 % de l'énergie de corrélation obtenue par les méthodes non-locales correspondantes.³³ En fait, ce pourcentage peut encore être augmenté en utilisant une base de fonctions plus étendue pour la description des orbitales. L'existence de ce lien entre pourcentage de prise en compte de l'énergie de corrélation et la qualité (donc la taille) de la base de fonctions montre qu'une partie de l'écart observé tient à la réduction de l'erreur de superposition des bases de fonctions (BSSE). La BSSE est un problème intrinsèque et récurrent des méthodes usuelles de chimie quantique. Elle résulte des défauts des bases de fonctions, plus précisément de l'utilisation des fonctions de base centrées sur des atomes voisins pour améliorer la fonction d'onde localement sur un atome. Il a également été démontré que l'erreur introduite par l'approche locale est généralement petite par comparaison aux autres sources d'erreur, telles que l'utilisation de bases de fonctions non-complètes.³⁴ Malgré les avantages des méthodes de type LMP2, en particulier la réduction significative du nombre total d'intégrales requises pour l'étude de systèmes de taille importante,³⁵ il convient de noter que les méthodes LMP2 sont limitées à l'étude de systèmes pour lesquelles l'approche perturbative demeure valide. Par ailleurs, ces méthodes sous-estiment par construction³⁶ la contribution des configurations ioniques à l'énergie de corrélation électronique, ce qui peut être à l'origine d'erreurs significatives pour l'étude de complexes moléculaires où le transfert de charge est important. Dans le cadre d'une partie des études théoriques réalisées dans cette thèse, des calculs LMP2 ont été effectués.

I.5- La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité (DFT)

La théorie de la fonctionnelle de la densité a été mise au point par Kohn, Sham et Hodenberg. Cette théorie ne cherche pas à résoudre l'équation de Schrödinger mais à trouver la formulation de la fonctionnelle reliant l'énergie du système étudié à sa densité électronique totale $\rho(r)$. Ce lien entre $\rho(r)$ et énergie d'un système a été établi par Kohn, Sham et Hodenberg en 1964 à travers les deux théorèmes suivants:

- L'ensemble des propriétés observables d'un système à l'état fondamental est entièrement déterminé par sa densité électronique. L'énergie, en particulier, est donc une fonctionnelle de la densité [eq 2.20]:

$$E = F[\rho] \quad (2.20)$$

- L'énergie du système atteint sa valeur minimale si et seulement si la densité électronique est celle de l'état fondamental. Ce théorème est l'équivalent, pour la densité électronique, du principe de la méthode des variations pour les énergies associées aux fonctions d'onde.

Si ce lien a donc clairement été établi, la fonctionnelle exacte qui relie l'énergie à la densité électronique demeure malheureusement inconnue pour un système constitué par N électrons en interaction. En 1965, Kohn et Sham proposèrent alors de décomposer l'énergie totale du système en termes d'énergie cinétique, d'énergie potentielle noyaux-électrons et électrons-électrons, toutes fonctionnelles de ρ [eq 2.21] :

$$E = \sum_{i=1}^n \langle \varphi_{i(1)} | -\frac{1}{2} \nabla_1^2 | \varphi_{i(1)} \rangle - \sum_A \frac{Z_A \rho(1)}{r_{1A}} d\tau_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(1)\rho(2)}{r_{12}} d\tau_1 d\tau_2 + E_{xc}[\rho] \quad (2.21)$$

| | | | |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Energie cinétique des électrons | Interactions Noyaux-électrons | Interaction Bi-électronique | Energie d'échange-corrélation |
|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|

Kohn et Sham proposèrent ensuite de remplacer le système réel avec plusieurs particules en interaction par un système fictif d'électrons sans interaction, et ceci aboutit aux équations de Kohn-Sham [eq 2.22] :

$$h_i^{KS} \chi_i = \varepsilon_i \chi_i \quad (2.22)$$

Où h^{KS} est l'opérateur de Kohn-Sham et χ_i sont les orbitales de Kohn-Sham. Ces orbitales ne sont pas identiques aux orbitales de HF. Il s'agit en fait de pseudo-équations aux valeurs propres, et, comme dans la méthode HF, un processus itératif permettant de déterminer les orbitales de Kohn-Sham χ_i minimisant l'énergie totale est utilisé.

Le principal inconvénient de la DFT réside dans l'expression de la fonctionnelle d'échange corrélation $E_{XC}[\rho]$, qui demeure totalement inconnue. La recherche de l'expression de cette fonctionnelle constitue donc un des enjeux actuels de la DFT. Des méthodes fondées sur différentes approximations ont donc été mises au point pour en proposer une formulation :

- Les méthodes basées sur l'approximation de la densité locale (LDA). Dans cette méthode, la densité électronique est supposée localement uniforme et la fonctionnelle d'échange corrélation ne dépend donc que de la densité électronique locale.
- Les méthodes fondées sur l'approximation du gradient généralisé (Generalised Gradient Approximation (GGA)). Les méthodes LDA étant fondées sur une description de la densité électronique erronée, leur champ d'application est très limité et des améliorations ont été apportées. La méthode GGA utilise ainsi une fonctionnelle d'échange-corrélation dépendant non seulement de la densité en chaque point, mais aussi de son gradient.
- Les méthodes hybrides, issues de la combinaison de termes provenant de différentes approximations, de façon à compenser leurs faiblesses respectives. Elles constituent

des méthodes « non-locales » dans lesquelles une partie de l'échange de Slater est substituée par le terme d'échange exact Hartree-Fock, purement non local. La fonctionnelle B3LYP³⁷ probablement une des plus célèbres et des plus utilisées dans le domaine de la chimie moléculaire, constitue un des tous premiers représentants de cette catégorie.

Les méthodes DFT ont connu un succès et un développement extrêmement rapide du fait qu'elles sont considérées comme équivalentes, du point de vue de la qualité et de la fiabilité des résultats obtenus, à des méthodes post Hartree-Fock telles que MP2 tout en nécessitant par comparaison de moindres ressources informatiques (le temps de calcul, par exemple, est très légèrement supérieur à celui requis par les méthodes HF). Malheureusement, la DFT possède quelques limites, notamment la difficulté à modéliser quantitativement les interactions moléculaires présentant une forte composante de forces de dispersion.³⁸ De plus, leur caractère empirique, dans la mesure où des paramètres intervenant dans les différents termes des DFT hybrides sont ajustés en fonction d'une valeur expérimentale particulière, ne garantit pas de performances équivalentes lors du calcul d'autres grandeurs.

Pour nos travaux, nous avons retenu la fonctionnelle MPWB1K, mise au point en 2004 par Zhao et Truhlar.³⁹ Elle appartient à des fonctionnelles de seconde génération dites méta-GGA et méta-hybride-GGA développées autour de formulations du terme d'échange-corrélation explicitement dépendant de la densité d'énergie cinétique τ des électrons. Ces développements ont permis d'améliorer en partie les déficiences évoquées dans la description des forces de dispersion. Plus précisément, la fonctionnelle MPWB1K est basée sur une fonctionnelle d'échange de Perdrew et Wang (mPW)⁴⁰ modifiée et sur la fonctionnelle de corrélation de Becke (B95)⁴¹. Une grande partie de nos études théoriques dans le cadre de cette thèse ayant pour objectif une analyse approfondie d'interactions intra

ou intermoléculaires, nous avons sélectionné MPWB1K, puisqu'il a été montré que cette fonctionnelle décrit ces propriétés moléculaires⁴¹ précisément, à la fois sur un plan structural et énergétique.

I.6- Les bases de fonction

Les bases de fonction sont des fonctions mathématiques utilisées afin de construire les orbitales moléculaires employées pour la résolution des équations de HF ou de l'équation de Kohn et Sham. On utilise généralement des fonctions gaussiennes (gaussian-type orbitals (GTO)) décrivant les orbitales des différents atomes de la molécule (théorie CLOA). Ces fonctions gaussiennes ont pour expression [eq. 2.23] :

$$\eta^{GTO} = N x^l y^m z^n \exp(-\alpha r^2) \quad (2.23)$$

dans laquelle N est un facteur de normalisation, $r^2 = x^2 + y^2 + z^2$ et α un exposant déterminé par minimisation de l'énergie de l'atome. Le type de la fonction gaussienne dépend de la valeur de la somme $l+m+n$. Si cette somme vaut 0, alors la fonction est de type s, de type p si la somme vaut 1 et d pour une valeur de 2. La grande préférence des bases de fonction GTO est motivée par les avantages informatiques qu'elles offrent car il existe un grand nombre d'algorithmes optimisés pour traiter des intégrales bi-centriques. Il existe également les fonctions de Slater ou Slater Type Orbital (STO) qui constituent une bonne approximation des orbitales de Hartree (dérivées des solutions exactes pour l'atome d'hydrogène). Ces fonctions offrent une meilleure représentation des orbitales réelles au voisinage de $r \rightarrow 0$ et de $r \rightarrow \infty$ que les GTO mais sont moins appropriées pour un calcul rapide des intégrales bi-centriques. Il est donc nécessaire d'utiliser plusieurs gaussiennes pour obtenir la même précision qu'avec une seule fonction de Slater. On combine alors linéairement plusieurs fonctions gaussiennes, cette combinaison portant le nom de « contraction » [eq 2.24] :

$$\eta_{\tau}^{CGF} = \sum_a^A d_{a\tau} \eta_a^{GTO} \quad (2.24)$$

où A est le nombre de fonctions gaussiennes contractées également appelées primitives.

Le plus simple mais le moins précis consiste à utiliser une contraction par orbitale. Ce type de représentation est appelé « base minimale » ou « simple zêta (ζ) ». C'est le cas par exemple de la base STO-3G où 3 primitives GTO sont combinées en une contraction. Ces bases de fonction présentent toutefois des déficiences sévères, en particulier leur incapacité à décrire l'anisotropie des distributions de charge. Pour améliorer la description des propriétés des systèmes, il est donc nécessaire d'utiliser plusieurs contractions de gaussiennes pour représenter une orbitale. Ces bases sont dites à double ou à triple zêta selon qu'elles emploient deux ou trois contractions respectivement. Pople et coll. ont mis au point à partir de 1972⁴² une série de base dites « split valence » notée n-ijG (ou n-ijkG) très largement utilisées de nos jours du fait d'un bon compromis entre précision et efficacité. Ces bases n'utilisent qu'une seule contraction de n primitives pour les orbitales de cœur contre deux (ou trois) contractions de i et j (et k) primitives pour les orbitales de valence. Elles donnent ainsi plus de poids aux orbitales de valence qu'à celles de cœur.

On peut également adjoindre à ces bases des fonctions de polarisation ou des fonctions diffuses. Les fonctions de polarisation ont un moment angulaire plus grand que celui des OA de valence ce qui permet aux orbitales de mieux se déformer à partir de leurs symétries atomiques et de mieux s'adapter à l'environnement électronique. Il s'agit typiquement de rajouter des orbitales d (voire f) aux atomes lourds et p (voire d) aux atomes d'hydrogène. Elles sont alors notées n-ij(k)G(d,p). Les fonctions diffuses, quant à elles, sont nécessaires pour décrire avec précision les systèmes dans lesquels le nuage électronique est étendu. Elles sont indispensables pour décrire les liaisons faibles et le calcul des affinités électroniques.

Leur notation pour les bases de Pople est $(n-ij(k)\llcorner\lrcorner)G$ dans les cas où ces fonctions ne sont ajoutées à la base que sur les atomes lourds et $n-ij(k)\lrcorner\lrcorner G$ pour les cas où ces fonctions sont ajoutées sur tous les atomes).

D'autres types de bases de type « split valence » ont également été mises au point par Dunning en 1989⁴³. Ces bases ont pour notation $cc-pVXZ$ où $cc-pV$ signifie correlation-consistent polarised valence et X indique le nombre de contractions par orbitales (D pour double, T pour triple, Q pour quadruple et 5 pour quintuple zêta). Ces bases ont été développées par des calculs faisant intervenir la corrélation électronique. On peut également ajouter des fonctions diffuses à ce type de base mais uniquement sur tous les atomes. Dans ce cas la base est notée $aug-cc-pVXZ$ (aug signifiant augmented).

I.7- Les méthodes mixtes

I.7.1- Généralités

Pour décrire de façon fiable et précise certains paramètres chimiques ou pour étudier la formation ou la rupture d'une liaison se produisant lors d'une réaction, il est indispensable d'utiliser des méthodes quantiques, telles que celles décrites précédemment. Cependant, l'étude d'une réaction enzymatique ou de l'association/dissociation d'un ligand sur une protéine reste impossible par ces méthodes du fait de la taille du système. Des méthodes mixtes, utilisant plusieurs niveaux de théorie, ont donc été élaborées depuis une trentaine d'années pour rendre accessible l'étude de système de taille de plus en plus importante. Leur principe est donc de séparer celui-ci en deux ou trois couches traitées par des niveaux de calcul différents. Par exemple, une représentation précise des interactions mises en jeu lors de la fixation d'un ligand au sein d'une protéine nécessite une description fine, grâce à une méthode quantique (QM) d'un niveau élevé, de cette région du système. En revanche,

l'environnement du site de fixation, plus «spectateur» mais exerçant une influence importante, pourra être décrit par une méthode QM moins sophistiquée ou une méthode de mécanique moléculaire (MM). Historiquement, les premiers travaux effectués utilisant une méthode mixte sont ceux de Warshel et Levitt en 1976,⁴⁴ Alagona et coll.⁴⁵ en 1982 puis de Bash et col. en 1987.⁴⁶ Il existe à l'heure actuelle un grand nombre de méthodes QM/MM.⁴⁷⁴⁸ On peut toutefois considérer qu'il en existe deux grands types (i) les méthodes utilisant un hamiltonien mixte $H_{QM/MM}$ (ii) les méthodes basées sur une décomposition de l'énergie totale en différents termes calculés à des niveaux de théorie propres. Le principal représentant de cette deuxième catégorie de méthodes est la technique ONIOM, mise en œuvre dans cette thèse.

I.7.2- Les méthodes basées sur l'utilisation d'un hamiltonien mixte

Historiquement, ce fut la première méthode employée par Warshel et Levitt.⁴⁴ Avec ces méthodes, le système est divisé en deux couches comportant une partie « cœur » traitée par mécanique quantique (QM) et une partie « périphérique » traitée par mécanique moléculaire (MM) (Figure 4).

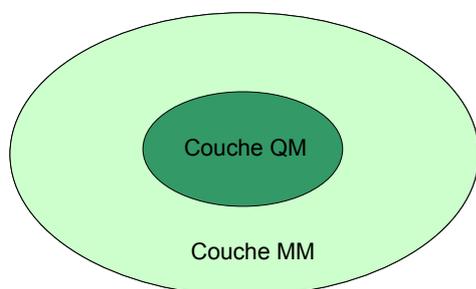


Figure 4- Schéma décrivant le découpage d'un calcul QM/MM.

De façon simplifiée, l'hamiltonien « total » (H_{TOTAL}), « complet » du système, correspond donc à la somme de trois hamiltoniens [eq 2.25].

$$H_{TOTAL} = H_{QM} + H_{MM} + H_{QM/MM} \quad (2.25)$$

Dans cette équation, H_{QM} représente l'hamiltonien du système QM, c'est-à-dire l'énergie d'interaction entre l'ensemble des particules constituant ce système, H_{MM} décrit l'hamiltonien du système MM, c'est-à-dire l'énergie d'interaction entre l'ensemble des composantes « classiques » et $H_{QM/MM}$ prend en compte l'énergie d'interaction entre les éléments quantiques et classiques. Chaque zone QM et MM est donc traitée par un hamiltonien différent tandis qu'un troisième hamiltonien se charge d'opérer la jonction entre les deux couches. Les détails du terme $H_{QM/MM}$ constituent bien sûr le cœur et la difficulté principale de ce type de méthodes mixtes.

I.7.3- La méthode ONIOM

I.7.3.1- Principe général

La méthode ONIOM (**O**ur own **N**-layered **I**ntegrated molecular **O**rbital and molecular **M**echanics) est une méthode mixte mise au point par Morokuma et coll. dans le milieu des années 90.^{49, 50} Nous avons sélectionné cette méthode à la fois pour des raisons pratiques, dans la mesure où elle est intégrée avec ses développements les plus récents dans le package de chimie quantique Gaussian09, utilisé dans le cadre de cette thèse, mais également du fait de son application avec succès dans un grand nombre de domaines de la chimie. Ainsi, des calculs ONIOM ont été mis en œuvre pour déterminer les énergies de dissociation de liaison de molécules organiques,⁵¹ l'étude des interactions protéine-ligand,⁵² ou encore la réactivité chimique de nanotubes de carbone.⁵³ La validité de cette méthode a été démontrée pour des composés purement organiques en comparant les résultats théoriques avec ceux obtenus à l'aide de niveaux de théorie plus élaborés et des données expérimentales.⁴⁹ ONIOM est en fait un acronyme général désignant une méthodologie

regroupant deux autres méthodes également développées par Morokuma : IMOMM⁵⁰ (Integrated Molecular Orbital-Molecular Mechanics) et IMOMO⁵⁴ (Integrated Molecular Orbital-Molecular Orbital), moins souples qu'ONIOM du fait de l'utilisation d'un niveau de calcul imposé pour la couche de bas niveau. Dans le cadre de la méthode IMOMO, la périphérie du système est ainsi nécessairement traitée par une méthode QM tandis que la méthode IMOMM impose l'utilisation d'un champ de force de mécanique moléculaire pour cette partie. ONIOM, quant à elle, permet donc de combiner des calculs avec des méthodes quantiques et classiques (désignées par QM/MM) ou des méthodes quantiques présentant différents niveaux de sophistication (QM/QM'). ONIOM a démontré son efficacité pour la simulation de systèmes chimiques de grande taille dans des domaines très diversifiés (étude de mécanismes de réaction pour des systèmes organiques pouvant aller jusqu'à plusieurs milliers d'atomes,⁵⁵ de catalyse homogène,⁵⁶ de réactions enzymatiques⁵⁷ ou encore de la réactivité de composés organiques et organométalliques⁵⁵). Une autre amélioration de la méthode ONIOM apportée depuis son développement est la possibilité de diviser le système étudié non plus en deux mais en trois couches décrites par trois niveaux de théorie différents (ONIOM3). Avec cette méthode, le cœur du système est généralement traité par une méthode DFT ou *ab initio*, une couche intermédiaire par une méthode semi-empirique de mécanique quantique, la périphérie étant décrite par mécanique moléculaire.

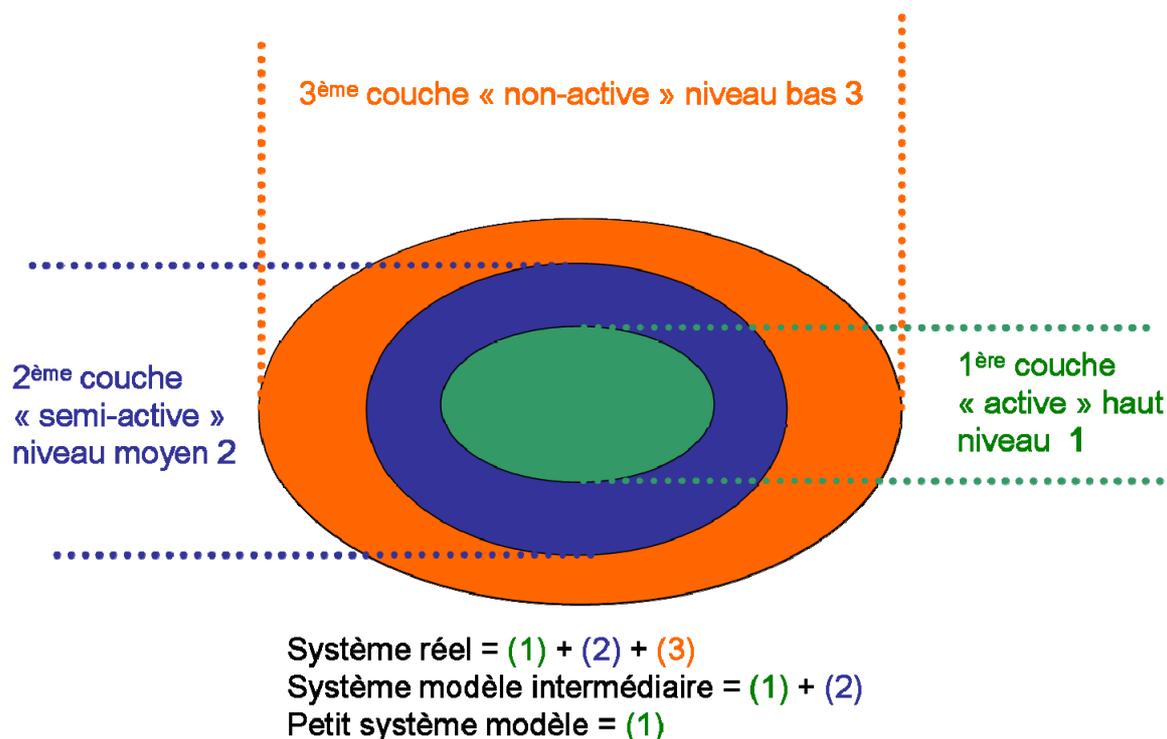


Figure 5- Schéma décrivant le découpage en trois couches d'un calcul ONIOM3.

Pour un système à deux couches, l'énergie totale calculée avec la méthode ONIOM2 à partir de l'énergie de chacune des couches décrites par leur niveau de théorie respectif s'exprime par la relation 2.26:

$$E = E(\text{faible,réel}) + E(\text{haut,modèle}) - E(\text{faible,modèle}) \quad (2.26)$$

ONIOM réalise un calcul QM pour le système modèle en l'absence de la seconde couche puis traite les interactions entre les deux couches au faible niveau de théorie. Dans les calculs que nous avons réalisés, seules des méthodes quantiques ont été mises en œuvre (ONIOM2 de type QM/QM'). L'équation 2.26 montre que la méthode d'évaluation de l'énergie du système « réel » repose sur la combinaison d'énergies des différentes parties du système traitées à leur propre niveau de théorie. Ainsi, pour un système à deux couches, l'énergie totale est évaluée à partir de trois termes : d'une part l'énergie du système entier, calculée au

plus faible niveau de théorie et d'autre part les énergies du « cœur » du système, calculées aux deux niveaux de théorie (haut et faible).

1.7.3.2- Traitement de la zone de jonction

Une des zones du système moléculaire étudié les plus difficiles à traiter par les méthodes mixtes est la jonction entre les différentes couches, notamment lorsqu'elle comporte des liaisons covalentes. ONIOM utilise par défaut l'approche dite « link-atom » (atome de jonction) pour appréhender ce type de liaisons. Des atomes d'hydrogène (d'autres atomes peuvent être spécifiés) sont ajoutés aux atomes situés à la frontière de façon à compléter leur couche de valence. Pour le « découpage » des couches, quelques règles importantes sont à respecter :

- Si la jonction implique des liaisons covalentes, elles doivent correspondre à des simples liaisons et non à des liaisons multiples
- Les groupements aromatiques ou conjugués doivent se trouver dans la même couche
- Si des liaisons se forment ou sont rompues ou encore si des atomes changent d'hybridation au cours du processus, ils doivent être situés dans la partie QM constituant le cœur du système
- La méthode ne pouvant traiter les transferts de charge entre couches, les parties du système dans lesquelles ces phénomènes peuvent avoir lieu doivent être traités par le même niveau de théorie (QM).

Les méthodes mixtes connaissent à l'heure actuelle des développements importants du fait de leur succès dans le traitement de systèmes chimiques/biochimiques de grande

taille. Par ailleurs, une alternative à l'utilisation d'atomes de jonction pour établir le lien entre les différentes couches consiste à utiliser des orbitales strictement localisées (méthode LSCF). Ce type de méthodes, développées en France à Nancy, n'a pu être utilisé dans le cadre de la thèse du fait de sa non disponibilité dans la version du programme Gaussian09 dont nous disposons localement. Elle ne sera donc pas évoquée plus en détail dans le contexte de ce manuscrit.

II. Application à l'étude de la structure et des interactions d'agonistes des nAChRs

II.1- Structures et propriétés des différents partenaires

II.1.1- Choix des agonistes et méthodologie

Pour ce travail, nous avons sélectionné la (S)-nicotine et l'épipatidine (Figure 6a et 6b respectivement), du fait de leur différence d'affinité significative pour les nAChRs,^{58, 59} et de leur statut de chef de file pour le développement de nouveaux agonistes des nAChRs.⁶⁰ Nous avons également étudié l'acétylcholine (ACh) (6c) en tant que composé de référence puisque ce composé est le ligand naturel des nAChRs.

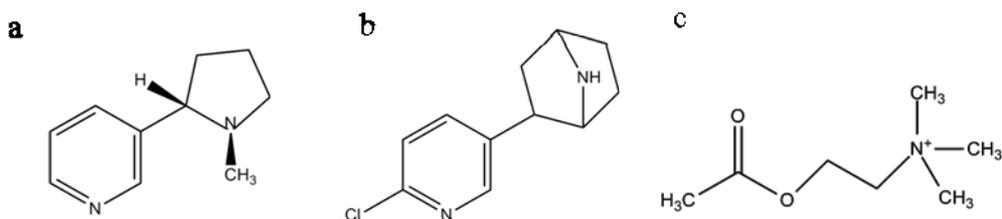


Figure 6- Représentation de la nicotine (a), de l'épipatidine (b) et de l'acétylcholine (c)

Des études précédentes par modélisation moléculaire, menées sur l'AChBP et/ou les nAChRs ont suggéré la présence d'une liaison hydrogène entre les groupements N⁺-H du ligand et carbonyle du squelette peptidique du Trp 143.^{61, 62} La structure chimique de l'acétylcholine ne permettant pas ce type d'interactions, l'implication de CH portés par l'azote d'ammonium quaternaire et polarisés positivement a été évoquée.^{58, 59} De plus, bien que l'épibatidine soit structuralement proche de la nicotine, elle est caractérisée par une constante d'affinité 100 fois supérieure à celle-ci et peut se lier aux nAChRs musculaires et neuronaux alors que la nicotine ne peut se lier qu'aux nAChRs neuronaux.¹⁰ Etant donné que les amines aliphatiques cycliques caractéristiques de la structure chimique des trois agonistes étudiés ici présentent des valeurs de pK_a de l'ordre 8-9 (8,3 pour la nicotine), il est généralement admis que la forme biologiquement active de ces ligands au pH physiologique (de l'ordre de 7,2) est la forme cationique. Nous avons donc sélectionné cette forme pour les études théoriques de chimie quantique réalisées dans le cadre de ce travail.

II.1.2- Analyse conformationnelle

Les propriétés des différents agonistes étant intimement liées à leur structure, nous avons entrepris une étude approfondie de leurs préférences conformationnelles. Dans le cas de l'épibatidine, les données théoriques sur la forme cationique ont pu être confrontées aux observations expérimentales réalisées par spectroscopie IRMPD au CLIO.¹⁹ Des séries de balayages relaxés autour de certains angles dièdres ont été réalisés au niveau MPWB1K/6-31G(d). A partir de la surface d'énergie potentielle obtenue, les points stationnaires correspondant aux minima énergétiques et aux états de transition ont pu être localisés. Les caractéristiques des minima ont été affinées grâce à une optimisation avec une base de fonctions plus étendue (6-31+G(d,p)). Un calcul de fréquence au même niveau a enfin été

réalisé pour confirmer la nature de minimum de ces points ainsi que pour obtenir les énergies électroniques corrigées de l'énergie de vibration du point zéro (notée D_0 par la suite) pour chaque conformère. A partir de D_0 , la population relative P_i des différents conformères a été calculée grâce à la relation de Boltzmann [eq 2.27] :

$$P_i = \frac{e^{-D_{0,i}/RT}}{\sum_j e^{-D_{0,j}/RT}} \quad (2.27)$$

II.1.3- Etude d'un motif structural de l'AChBP

Comme nous l'avons évoqué précédemment dans ce chapitre (II.2.), nous avons souhaité étudier de façon approfondie un motif structural de l'AChBP impliqué dans l'interaction avec les ligands. Notre objectif était d'affiner, grâce à l'utilisation d'une méthode quantique de type DFT, les données structurales en terme de conformation et d'interactions des résidus constituant le site de fixation.¹⁵ Ce modèle de départ était composé, en plus du Trp 143, des résidus Ser 142, Thr144 et Asp 85 (Figure 8).

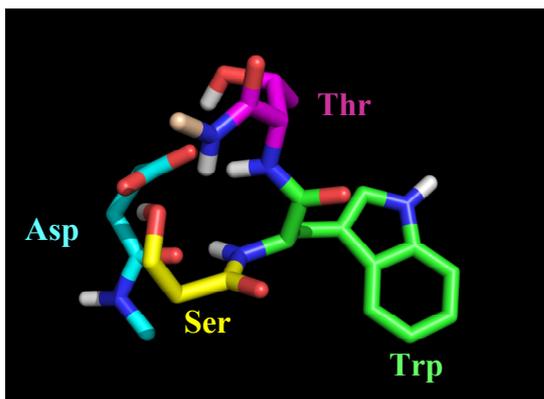


Figure 8- Acides aminés sélectionnés dans la définition du modèle initial.

Une fois la composition chimique du motif établie, la géométrie du système ainsi défini a été totalement optimisée. Guidés par les modifications structurales éventuelles résultant de l'optimisation, certains groupements fonctionnels ne paraissant pas décisifs dans le maintien

de la structure du motif ont été supprimés, l'ensemble étant systématiquement réoptimisé à chaque modification. Cette démarche nous a permis de déterminer le motif permettant de réduire le temps de calcul tout en conservant les caractéristiques structurales (liaisons H, conformation) propres au système.¹⁵

II.2- Définition d'un modèle 3D pour l'étude des interactions agonistes-AChBP.

II.2.1- Mise au point du modèle

Pour définir un modèle tridimensionnel permettant l'étude des interactions des différents agonistes avec l'AChBP, nous avons sélectionné tous les résidus possédant un atome situé dans une sphère d'un rayon de 7 Å centrée sur chaque atome d'un ligand de référence, la nicotine. Notre choix s'est porté sur ce ligand car les complexes avec la nicotine possèdent une meilleure résolution (1UW6 : 2,2 Å) que ceux avec l'épibatidine (2BYQ : 3,4 Å). Un tel rayon constitue un bon compromis pour l'étude des interactions agonistes-AChBP dans la mesure où tous les acides aminés de l'AChBP en interaction directe avec les ligands sont sélectionnés, le ligand étant enchâssé dans une cavité constituée par les résidus des composantes principales et complémentaires du site (Figure 9). Dans des travaux précédents,^{57, 63} une sphère de 10 Å autour des atomes du ligand a été utilisée. Pour des raisons de choix méthodologique (méthode QM/QM') et de temps de calcul associé, une sphère d'un rayon de 7 Å s'est révélée adaptée. Le modèle a été préparé à l'aide du logiciel Pymol.¹⁷

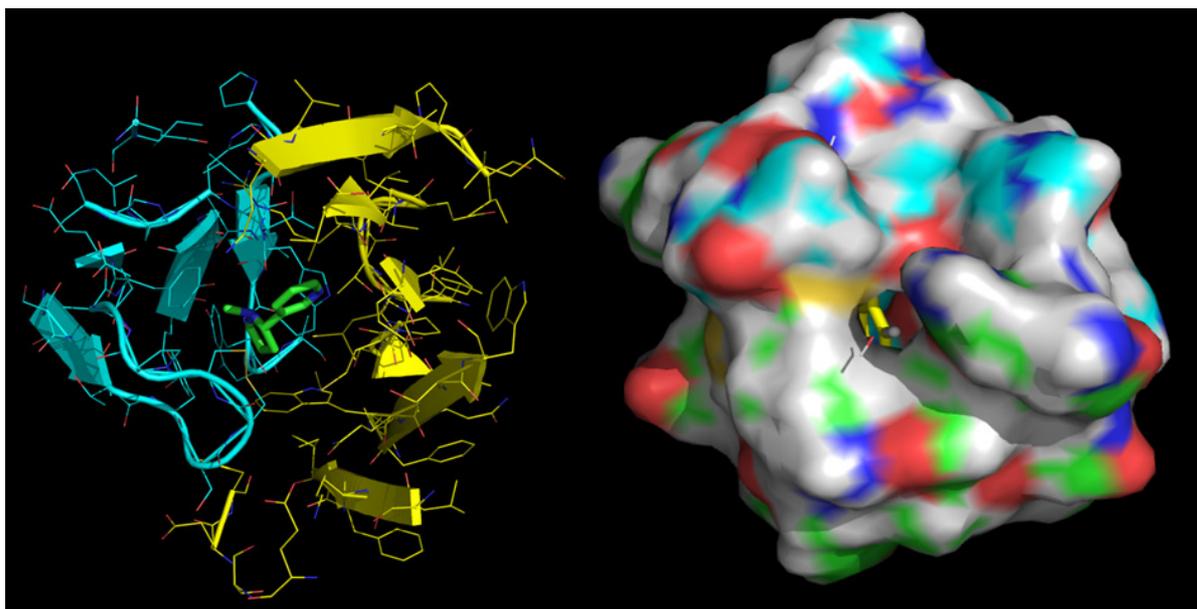


Figure 9- A gauche, représentation des résidus autour de la sphère de 7Å autour de la nicotine (en vert) avec la partie principale du site en bleu et la partie complémentaire en jaune. A droite, représentation de la surface autour de la sphère de 7Å.

Ce protocole de définition du modèle basé sur la présence ou l'absence des acides aminés à l'intérieur de la sphère délimitée se traduit dans la pratique par deux situations principales concernant la séquence peptidique. Ainsi, lorsque deux acides aminés présélectionnés n'étaient séparés que par un résidu non contenu dans la sphère, la chaîne principale du résidu central a également été considérée. Dans tous les autres cas de figure, qu'il s'agisse d'un acide aminé ou d'un bloc constitué par la succession de plusieurs résidus, chaque extrémité (N et C terminale) a été respectivement complétée par des fonctions COCH_3 et NHCH_3 (Figure 10). Cette modification permet de conserver les caractéristiques chimiques et structurales de la liaison peptidique, élément important pour une description correcte du système lors des calculs ultérieurs.

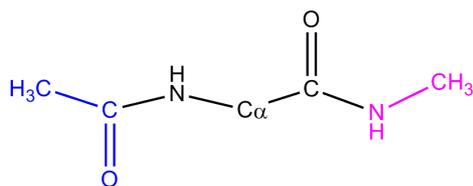


Figure 10- Exemple de terminaison des blocs d'acides aminés

Le modèle ainsi constitué est composé de 30 résidus, Tyr 89, Ser 142, Trp 143, Thr 144, His 145, His 146, Val 183, Thr 184, Tyr 185, Ser 186, Cys 187, Cys 188, Pro 189, Glu 190, Ala 191, Tyr 192 pour la sous-unité principale et Trp 53, Gln 73, Val 74, Ser 75, Pro 100, Gln 101, Leu 102, Ala 103, Arg 104, Leu 112, Tyr 113, Met 114, Pro 115 et Tyr 164 pour la sous-unité complémentaire. Les atomes d'hydrogène ont été rajoutés avec le programme Gaussview.⁶⁴ Sur la base du pH physiologique (7,4), la chaîne latérale de l'Arg 104 a été considérée dans sa forme protonée (pK_a de 12,5). Pour les mêmes raisons, le résidu Glu 190 a été considéré dans sa forme carboxylate ($pK_a = 4,1$). Le modèle tridimensionnel du site de fixation des agonistes étant défini, la position de l'ensemble des atomes d'hydrogène a été optimisée au cours d'une première phase de calculs au niveau MPWB1K/3-21G.

II.2.2- Position des agonistes dans le site de fixation

La position, l'orientation, de même que la conformation des ligands au sein du site de reconnaissance des récepteurs conditionnent leurs interactions. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous n'avons pas cherché à explorer, à travers un programme de docking, la surface d'énergie potentielle d'interaction entre les ligands et le modèle tridimensionnel défini pour le site de reconnaissance. Pour définir la position du ligand dans le site, nous avons donc exploité, lorsqu'elles étaient disponibles, les données expérimentales obtenues

par cristallographie des rayons X. Lorsque ces informations n'étaient pas disponibles nous avons positionné les ligands d'une façon similaire, en considérant les éléments du pharmacophore nicotinique. Pour la nicotine, la structure de départ que nous avons sélectionnée pour le complexe correspond à la conformation observée dans le site de l'AChBP (1UW6),¹⁵ appelée nicotine B. Nous avons également considéré le second isomère de conformation (nicotine A) de la nicotine protonée sur l'azote pyrrolidinique dans cette étude. Cette conformation (Figure 11) se distingue de la première par une rotation de l'ordre de 180° autour de la jonction entre les deux cycles.

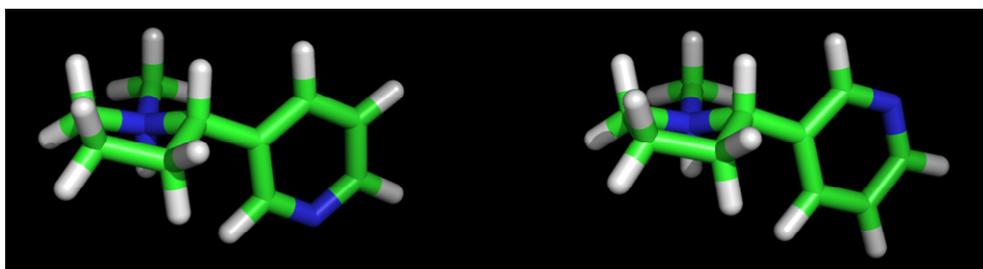


Figure 11- Représentation des deux conformères de la nicotine étudiés (à gauche la nicotine B et à droite la nicotine A).

Dans le cas de l'épibatidine, les données cristallographiques souffrant d'imprécision (2BYQ, résolution 3,40 Å), et montrant des différences significatives selon l'interface entre les sous-unités examinées,⁶⁵ nous avons considéré comme point de départ les trois positions expérimentales observées. Pour l'ACh, aucune structure cristalline avec l'AChBP n'étant disponible, nous l'avons positionné manuellement dans le site. Nous avons considéré trois conformations de ce ligand dans les études de complexation avec le modèle du site de reconnaissance. Ces structures correspondent à celles proposées dans la littérature comme conformations actives pour ce ligand naturel des nAChRs sur la base de résultats obtenus lors d'une étude par RMN bidimensionnelle.⁶⁶ Les caractéristiques chimiques de l'ACh nous

ont par ailleurs conduit à considérer, pour chaque conformation, trois positions différentes. Ces positions initiales ont été définies par rapport aux distances entre, d'une part, les groupes méthyle portés par l'ammonium de l'ACh et le centroïde du cycle benzénique du noyau indole du Trp 143, et, d'autre part, le méthylène en α de l'azote ammonium de l'ACh et l'O de la fonction carbonyle du Trp 143 (Figure 12). Ces paramètres ont été sélectionnés par Cashin et coll.¹⁰ dans une étude comparative de l'interaction de la nicotine, de l'épipatidine et de l'ACh avec le Trp 143.

Pour chacun des ligands sélectionnés, les complexes ont également été étudiés en présence d'une molécule d'eau «relai», cette molécule ayant parfois été intégrée au pharmacophore nicotinique,^{67, 68} sa présence ayant été vérifiée expérimentalement dans le cas de la nicotine (entrée 1UW6 : complexe nicotine-AChBP)

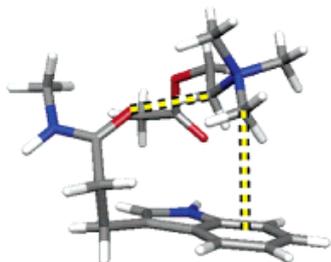


Figure 12- Distances ACh-Trp 143 retenues par Cashin et col. pour l'étude des interactions agonistes-nAChRs.¹⁰

II.2.3- Calculs QM/QM'

Après avoir positionné les ligands dans le site et optimisé la position des atomes d'hydrogène, les deux couches de niveaux de théorie différents pour le calcul ONIOM2 ont été définies. Le Trp 143 et les deux liaisons peptidiques qui l'entourent, le ligand et la molécule d'eau éventuellement présente ont été placés dans la couche de haut niveau (MPWB1K/6-31+G(d,p)), la deuxième couche (MPWB1K/3-21G(d)) contenant le reste du système (Figure 13).

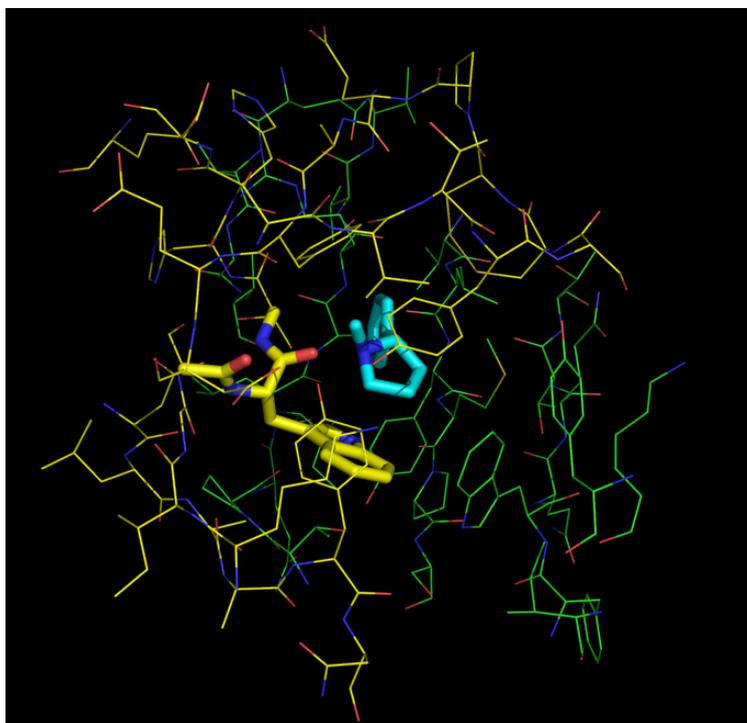


Figure 13 Modèle du site de reconnaissance des agonistes des nAChRs mis au point à partir de l'AChBP pour les calculs ONIOM2 (la couche de haut niveau, sur l'exemple du complexe avec l'ACh, est représentée en tube, le reste, correspondant à la couche de bas niveau, en fil de fer).

Chaque complexe étudié a ensuite été optimisé partiellement, l'ensemble des atomes de la couche la plus externe étant gelés sur la base des positions cristallographiques. Cette stratégie a permis d'optimiser la géométrie du ligand, du résidu Trp 143 et de la molécule d'eau dans l'environnement du récepteur protéique. La partie interne, constituant le «cœur» du système, optimisée avec la méthode MPWB1K/6-31+G(d,p), comprend, selon les ligands, entre 46 et 48 atomes. A l'issue de la convergence des calculs ONIOM2, les différentes composantes de l'énergie d'interaction ont été déterminées. Ainsi, les énergies de fixation (ΔE_{fix}), de relaxation (ΔE_{rel}) et l'énergie de complexation ont été évaluées par les expressions suivantes: [eq 2.28-2.30] :

$$\Delta E_{\text{fix}} = E_{\text{el}}(\text{C}) - E_{\text{el}}(\text{MS})_{\text{L}} - E_{\text{el}}(\text{L})_{\text{L}} \quad (2.28)$$

$$\Delta E_{\text{rel}}(\text{L}) = E_{\text{el}}(\text{L})_{\text{C}} - E_{\text{el}}(\text{L})_{\text{L}} ; \Delta E_{\text{rel}}(\text{MS}) = E_{\text{el}}(\text{MS})_{\text{C}} - E_{\text{el}}(\text{MS})_{\text{L}} \quad (2.29)$$

$$\begin{aligned} \Delta E_{\text{cpx}} &= E_{\text{el}}(\text{C}) - E_{\text{el}}(\text{MS})_{\text{C}} - E_{\text{el}}(\text{L})_{\text{C}} \\ &= \Delta E_{\text{fix}} - \Delta E_{\text{rel}}(\text{MS}) - \Delta E_{\text{rel}}(\text{L}) \end{aligned} \quad (2.30)$$

Avec C le complexe, (MS)_C et (L)_L le modèle du site et le ligand respectivement, à la géométrie du complexe, (MS)_C et (L)_L le modèle du site et le ligand respectivement, à leur géométrie libre. Lorsque la molécule d'eau est incluse au système, elle est intégrée à la partie modèle du récepteur (MR ou MS). Les calculs ont été effectués en considérant l'énergie électronique, c'est-à-dire qu'aucune correction thermique ni de l'énergie vibrationnelle du point zéro n'a été effectuée. Les variations d'énergies de complexation et de fixation ont ensuite été comparées aux valeurs d'affinités expérimentales disponibles pour les agonistes étudiés. La variation d'énergie de relaxation permet d'appréhender la contribution énergétique de la déformation de géométrie du ligand et du Trp 143 à l'ensemble du processus pour chacun des composés étudiés.

III] Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté l'ensemble des outils expérimentaux et théoriques mis en œuvre dans le cadre de cette thèse pour caractériser de façon approfondie la structure et les interactions de différents ligands des nAChRs sous des formes chimiques diversifiées. Les approches expérimentales utilisées sondent des environnements très différents, puisque les études par spectroscopie IRMPD à CLIO sont effectuées en phase

gazeuse sur les formes cationiques des ligands tandis que l'analyse des données structurales repose en grande partie sur des structures de complexes ligands-AChBP résolues par diffraction des rayons X. Enfin, sur un exemple ponctuel, des études par spectrométrie vibrationnelle en solution ont été mises en œuvre pour (i) sonder l'influence des caractéristiques du solvant sur la structure adoptée par les ligands (ii) mesurer le pouvoir accepteur de liaison H de ces composés. Parallèlement aux investigations expérimentales, des études théoriques à différents niveaux ont été réalisées. Ces travaux constituent un complément essentiel aux différentes approches expérimentales dans la mesure où ils permettent d'aboutir à une compréhension fine du comportement des ligands dans différents milieux, des conformations qu'ils adoptent en phase gazeuse, aux interactions qu'ils peuvent établir au sein d'un de leurs récepteurs biologiques. Les chapitres suivants montreront que si ces ligands présentent à priori des caractéristiques semblables, ils possèdent en réalité des différences significatives aussi bien sur un plan structural qu'en terme d'interactions, ce qui justifie le couplage des approches utilisées dans le cadre de ce travail.

Références bibliographiques.

-
- 1) <http://www.rcsb.org/pdb/>.
 - 2) J. Kirchmair, P. Markt, S. Distinto, D. Schuster, G. M. Spitzer, K. R. Liedl, T. Langer and G. Wolber, *J. Med. Chem.*, **51**, 7021-7040 (2008).
 - 3) H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov and P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235-242 (2000).
 - 4) S. Koné, Thèse de doctorat, Université de Cocody-Abidjan/Université de Nantes (2009).
 - 5) <http://www.rcsb.org/pdb/statistics/holdings.do>.
 - 6) <http://swift.cmbi.ru.nl/gv/whatcheck/>.
 - 7) R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss and J. M. Thornton, *J. Appl. Crystallogr.*, **26**, 283-291 (1993).
 - 8) <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>.
 - 9) R. A. Laskowski, *Nucleic Acids Res.*, **29**, 221-222 (2001).
 - 10) A. L. Cashin, E. J. Petersson, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 350-356 (2005).
 - 11) E. Yurtsever, D. Yuret and B. Erman, *J. Phys. Chem. A*, **110**, 13933-13938 (2006).
 - 12) D. G. Watson, *J. Res. Natl. Inst. Stan.*, **101**, 227-229 (1996).
 - 13) I. J. Bruno, J. C. Cole, P. R. Edgington, M. Kessler, C. F. Macrae, P. McCabe, J. Pearson and R. Taylor, *Acta Crystallogr. B.*, **B58**, 389-397 (2002).
 - 14) C. c. d. Cambridge (1995) Vista.
 - 15) P. H. N. Celie, R. V. Klaassen, S. E. van Rossum-Fikkert, R. van Elk, P. van Nierop, A. B. Smit and T. K. Sixma, *J. Biol. Chem.*, **280**, 26457-26466 (2005).
 - 16) C. Ulens, A. Akdemir, A. Jongejan, R. van Elk, S. Bertrand, A. Perrakis, R. Leurs, A. B. Smit, T. K. Sixma, D. Bertrand and I. J. P. de Esch, *J. Med. Chem.*, **52**, 2372-2383 (2009).
 - 17) W. L. Delano (2004) The Pymol Molecular Graphics System, Delano Scientific, San Carlos, CA, USA.

- 18) A. L. Cashin, M. M. Torrice, K. A. McMenimen, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *Biochemistry*, **46**, 630-639 (2007).
- 19) A. P. Atkinson, A. Planchat, J. Graton, E. Renault, G. Gregoire and J.-Y. Le Questel, *PCCP*, **13**, 2272-2277 (2011).
- 20) M. Seydou, G. Gregoire, J. Liquier, J. Lemaire, J. P. Schermann and C. Desfrancois, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4187-4195 (2008).
- 21) L. Sleno and D. A. Volmer, *J. Mass Spectrom.*, **39**, 1091-1112 (2004).
- 22) N. C. Polfer, J. Oomens, D. T. Moore, G. von Helden, G. Meijer and R. C. Dunbar, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 517-525 (2005).
- 23) J.-C. POULLY, Thèse de doctorat, Université Paris XIII (2009).
- 24) N. C. Polfer and J. Oomens, *PCCP*, **9**, 3804-3817 (2007).
- 25) V. Arnaud, *Thèse de doctorat, Université de Nantes* (2005).
- 26) K. O. Hartman, G. L. Carlson, R. E. Witkowski and W. G. Fateley, *Spectrochim. Acta, Part A*, **24**, 157-167 (1968).
- 27) D. Gurka and R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4794-801 (1969).
- 28) R. W. Taft, D. Gurka, L. Joris, P. v. R. Schleyer and J. W. Rakshys, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 4801-8 (1969).
- 29) E. M. Arnett, L. Joris, E. Mitchell, T. S. S. R. Murty, T. M. Gorrie and P. v. R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 2365-77 (1970).
- 30) C. Laurence, K. A. Brameld, J. Graton, J.-Y. Le Questel and E. Renault, *J. Med. Chem.*, **52**, 4073-4086 (2009).
- 31) C. Moller and M. S. Plesset, *Phys. Rev.*, 618 (1934).
- 32) S. Saebo and P. Pulay, *J. Chem. Phys.*, **86**, 914-922 (1987).
- 33) S. Saebo and P. Pulay, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **44**, 213-36 (1993).
- 34) C. Hampel and H.-J. Werner, *J. Chem. Phys.*, **104**, 6286-97 (1996).
- 35) C. Cramer, "Essentials of Computational Chemistry; Theories and Models," Wiley, 2010.
- 36) M. Schuetz, G. Rauhut and H.-J. Werner, *J. Phys. Chem. A*, **102**, 5997-6003 (1998).
- 37) P. J. Stephens, F. J. Devlin, C. F. Chabalowski and M. J. Frisch, *J. Phys. Chem.*, **98**, 11623-7 (1994).

- 38) E. R. Johnson, R. A. Wolkow and G. A. DiLabio, *Chem. Phys. Lett.*, **394**, 334-338 (2004).
- 39) Y. Zhao and D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 6908-6918 (2004).
- 40) C. Adamo and V. Barone, *J. Chem. Phys.*, **108**, 664-675 (1998).
- 41) A. D. Becke, *J. Chem. Phys.*, **104**, 1040-1046 (1996).
- 42) W. J. Hehre, R. Ditchfield and J. A. Pople, *J. Chem. Phys.*, **56**, 2257-61 (1972).
- 43) J. T. H. Dunning, *J. Chem. Phys.*, **90**, 1007-1023 (1989).
- 44) A. Warshel and M. Levitt, *J. Mol. Biol.*, **103**, 227-249 (1976).
- 45) G. Alagona, P. Desmeules, C. Ghio and P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 3623-3632 (1984).
- 46) P. A. Bash, M. J. Field and M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 8092-8094 (1987).
- 47) H. Lin and D. G. Truhlar, *Theor. Chem. Acc.*, **117**, 185-199 (2007).
- 48) S. Ferrer, J. Ruiz-Pernia, S. Marti, V. Moliner, I. Tunon, J. Bertran, J. Andres and C. Christo Chpater 3 - Hybrid Schemes Based on Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Simulations: Goals to Success, Problems, and Perspectives, vol. Volume 85, Academic Press, pp. 81-142.
- 49) M. Svensson, S. p. Humbel, R. D. J. Froese, T. Matsubara, S. Sieber and K. Morokuma, *J. Phys. Chem.*, **100**, 19357-19363 (1996).
- 50) F. Maseras and K. Morokuma, *J. Comput. Chem.*, **16**, 1170-1179 (1995).
- 51) R. D. J. Froese and K. Morokuma, *J. Phys. Chem. A*, **103**, 4580-4586 (1999).
- 52) M. Kuno, S. Hannongbua and K. Morokuma, *Chem. Phys. Lett.*, **380**, 456-463 (2003).
- 53) X. Lu, Q. Yuan and Q. Zhang, *Org. Lett.*, **5**, 3527-3530 (2003).
- 54) S. Humbel, S. Sieber and K. Morokuma, *J. Chem. Phys.*, **105**, 1959-1967 (1996).
- 55) http://www.gaussian.com/g_whitepap/oniom_technote.htm.
- 56) K. Morokuma, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **24**, 797-801 (2003).
- 57) N. H. My, H. Hirao, D. U. Van and K. Morokuma, *J. Chem. Inf. Model.*, **51**, 3226-3234.
- 58) P. H. N. Celie, S. E. Van Rossum-Fikkert, W. J. Van Dijk, K. Brejc, A. B. Smit and T. K. Sixma, *Neuron*, **41**, 907-914 (2004).

- 59) S. B. Hansen, Z. Radic, T. T. Talley, B. E. Molles, T. Deerinck, I. Tsigelny and P. Taylor, *J. Biol. Chem.*, **277**, 41299-41302 (2002).
- 60) M. N. Romanelli, P. Gratteri, L. Guandalini, E. Martini, C. Bonaccini and F. Gualtieri, *ChemMedChem*, **2**, 746-767 (2007).
- 61) M. Schapira, R. Abagyan and M. Totrov, *BMC Struct. Biol.*, **2**, 1-8 (2002).
- 62) N. Le Novere, T. Grutter and J.-P. Changeux, *PNAS*, **99**, 3210-3215 (2002).
- 63) E. Godfrey, C. S. Porro and S. P. de Visser, *J. Phys. Chem. A*, **112**, 2464-2468 (2008).
- 64) R. Dennington, T. Keith and J. M. Millam (2009) GaussView, Version 5. Shawnee Mission KS, Semichem Inc.
- 65) S. B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor and Y. Bourne, *EMBO J*, **24**, 3635-3646 (2005).
- 66) P. T. F. Williamson, J. A. Watts, G. H. Addona, K. W. Miller and A. Watts, *PNAS*, **98**, 2346-2351 (2001).
- 67) R. A. Glennon and M. Dukat, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 1841-1844 (2004).
- 68) A. P. Blum, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *PNAS*, **107**, 13206-13211 (2010).

Chapitre 3

**Caractéristiques structurales et
conformationnelles de quelques
ligands des nAChRs**

Dans ce chapitre, les caractéristiques structurales et conformationnelles des ligands étudiés sont présentées, qu'il s'agisse de données obtenues lors de mesures expérimentales en phase gazeuse, en solution en solvant apolaire à travers la mise en œuvre de différentes techniques (IRTF, RMN) ou de données issues de calculs théoriques à l'état isolé. Ces résultats sont non seulement importants pour appréhender de façon approfondie le comportement de ces composés mais constituent un prérequis utile pour la mise en évidence de l'influence de l'environnement protéique sur leur structure (*cf* Chapitre 5).

I] Nicotine

I.1-Rappels bibliographiques

La nicotine (Figure 1), principal alcaloïde du tabac, possède de nombreuses propriétés biologiques. L'existence de ces multiples effets provient du fait qu'elle interfère avec un grand nombre de processus neurophysiologiques grâce à son action sur les nAChRs. La nicotine naturelle, correspondant à l'énantiomère S, possède une activité biologique cinq à cent fois plus importante, selon l'espèce, que la (R)-nicotine.¹ Dès 1659, Giles Everard, un médecin hollandais, a fait le lien entre consommation de tabac et amélioration de la mémoire.² Près de trois siècles plus tard, la consommation de tabac ayant fortement progressé, seuls les effets néfastes sur la santé de cette molécule retinrent l'attention de la communauté et ses vertus potentielles, qui font actuellement l'objet de débats importants, furent oubliées.^{3,4} En fait, à forte dose, la nicotine se révèle être un puissant poison qui peut provoquer une mort quasi instantanée, notamment par paralysie du système neuromusculaire. Ce dernier effet est à l'origine de son utilisation en tant que pesticide.²

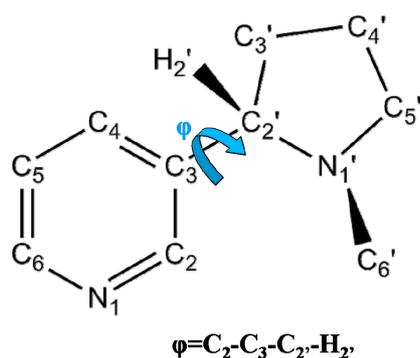


Figure 1- Structure chimique et numérotation de la (S)-nicotine.

La nicotine a fait l'objet de nombreuses études conformationnelles, tant expérimentales que théoriques.⁵⁻⁸ Ces études ont permis d'en déterminer les principales caractéristiques structurales :

- la forme enveloppe du cycle pyrrolidinique, l'atome d'azote sortant du plan formé par les quatre atomes de carbone dans la forme neutre^{9, 10}
- la quasi-perpendicularité entre les cycles pyrrolidinique et pyridinique
- la position *anti* des liaisons N1'-C6' et C3-C2' par rapport au plan du cycle pyrrolidinique
- l'existence de deux isomères de conformation stables, notés A et B par Elmore et Dougherty⁵ avec pour valeurs approchées de l'angle Φ (0° et 180°) respectivement, et possédant tous deux une distance entre leurs deux atomes d'azote notablement différente (4,79 Å et 4,25 Å) respectivement pour les conformères non protonés.
- La déformation notable du cycle pyrrolidine lors d'une protonation de l'N sp^3 , la forme enveloppe étant désormais caractérisée par la position hors du plan du carbone lié au cycle pyridinique.

La Figure 2 montre les structures des principaux conformères pour la forme neutre et protonée sur l'N pyrrolidinique.

I.2-Résultats

Les résultats théoriques antérieurs du laboratoire ayant été obtenus à un niveau de théorie différent (B3LYP/6-31+G(d,p)), les deux conformères principaux de la (S)-nicotine protonée ont été optimisés au niveau MPWB1K/6-31+G(d,p) puis un calcul de fréquence a été réalisé. Nos résultats confirment les tendances mises en évidence précédemment à des niveaux de théorie comparables,^{6, 7, 11} les populations respectives des conformères A et B étant quasi-équivalentes à l'état isolé, (49,9 et 50,1% respectivement).

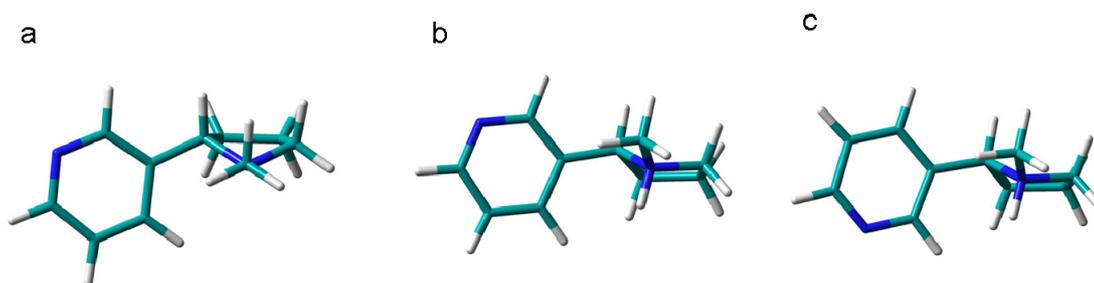


Figure 2- Représentations de la (S)-nicotine A neutre (a) et des (S)-nicotines A (b) et B (c) protonées

II] Epibatidine

I.1-Rappels bibliographiques

Isolée à partir d'extraits de peau d'une grenouille vénéneuse équatorienne (*Epipedobates tricolor*) par Daly et coll. en 1992, l'épibatidine (Figure 3) suscita rapidement un très grand intérêt parmi la communauté scientifique du fait de son activité puissante d'agoniste des nAChRs et de son grand pouvoir analgésique. Sa grande toxicité et l'importance des effets secondaires indésirables consécutifs à son administration (hypertension, bradycardie, paralysie partielle) ont empêché son utilisation en tant qu'agent thérapeutique tout en fournissant cependant un chef de file précieux pour la conception de nouveaux ligands

sélectifs de sous-types des nAChRs. En 1994, l'énantiomère naturel de l'épibatidine, ((1R, 2R, 4S)- ou (+)-épibatidine) a été identifié par Fletcher et coll.¹² L'importance de ce composé s'est traduite par plusieurs investigations structurales.¹³⁻¹⁵

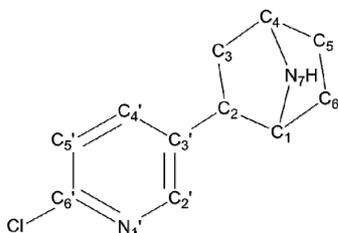


Figure 3. Structure chimique de l'épibatidine.

I.2-Résultats

Caractéristiques structurales

La structure bicyclique du fragment saturé de l'épibatidine se traduit par le fait que le principal degré de liberté de la molécule se résume à l'angle de torsion entre les deux cycles. Dans une première étape, des balayages systématiques autour de la liaison C3'-C2 (angle dièdre C2-C3-C2'-C3', Figure 3) ont été effectués au niveau HF/6-31G(d,p) pour les deux formes monoprotonées (sur l'Nsp³ ou l'Nsp²). La géométrie des minima identifiés sur les profils énergétiques obtenus a dans un deuxième temps été optimisée avec la fonctionnelle B3PW91 et la base de fonction 6-311++G(d,p). Ce choix de fonctionnel s'explique par le fait qu'elle a été utilisée avec succès pour des analyses de résultats IRMPD d'autres ligands nicotiques.⁷ Dans une ultime étape, des calculs LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p) ont été réalisés sur les différents conformères de façon à obtenir des énergies relatives plus fiables. En effet la méthode LMP2 permet de réduire la BSSE.¹⁶ Les populations de chaque conformère ont été estimées en utilisant la loi de distribution de Boltzmann à partir des enthalpies libres relatives calculées. Trois minima ont été identifiés pour l'épibatidine protonée sur l'Nsp³ (Nsp³⁺) et cinq pour l'épibatidine protonée sur l'Nsp² (Nsp²⁺) (Figure

4). Comme pour la nicotine, deux catégories distinctes de conformation sont possibles. Ces conformations se distinguent par l'orientation relative des deux atomes d'azotes par rapport à la liaison intercyclique. Quand les deux atomes d'azote sont du même côté, la conformation est notée A, et B quand ils sont du côté opposé. Un second degré de liberté apparaît quand l'azote pyridinique est protoné. Il s'agit de l'orientation de la liaison NH de l'azote pyrrolidinique par rapport au cycle pyridinique. Ces conformères sont appelés *syn* ou *anti*, selon que le NH est dirigé vers le cycle pyridinique, ou à l'opposé, respectivement. Le Tableau I rassemble les enthalpies libres relatives et les populations des différents conformères de l'épibatidine calculées aux niveaux B3PW91/6-311++G(d,p). et LMP2/cc-pVTZ //B3PW91/6-311++G(d,p).

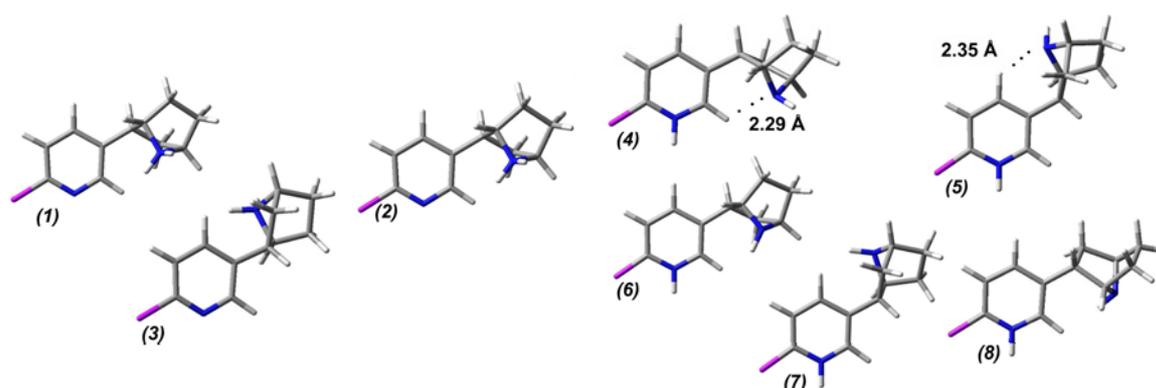


Figure 4- Géométries des trois minima énergétiques de l'épibatidine protonée sur l'Nsp³ (1-3) et des cinq minima énergétiques de l'épibatidine protonée sur l'Nsp² (4-8) optimisées au niveau B3PW91/6-311++G(d,p).

Tableau I- Energies relatives (kJ mol⁻¹) en phase gazeuse et angle dièdre inter-cycle (en degrés) pour les différentes formes monoprotonées de l'épibatidine.

| Conformères | $\Phi^{[c]}$ | B3PW91 ^[a] | | LMP2//B3PW91 ^[b] | |
|-------------------------|--------------|-----------------------|-----------|-----------------------------|-----------|
| | | ΔG | $P_i(\%)$ | ΔG | $P_i(\%)$ |
| (1) Nsp ³ +A | 273 | 3,51 | 15,6 | 0,00 | 57,4 |
| (2) Nsp ³ +A | 350 | 6,41 | 4,8 | 2,02 | 25,5 |
| (3) Nsp ³ +B | 86 | 7,19 | 3,5 | 8,79 | 1,7 |

| | | | | | |
|-------------------------|-----|-------|------|-------|------|
| (4) Nsp ² +A | 308 | 0,00 | 64,0 | 3,91 | 11,8 |
| (5) Nsp ² +A | 124 | 4,12 | 12,1 | 6,87 | 3,6 |
| (6) Nsp ² +A | 276 | 29,77 | 0,0 | 33,96 | 0,0 |
| (7) Nsp ² +A | 101 | 29,22 | 0,0 | 34,46 | 0,0 |
| (8) Nsp ² +A | 351 | 33,14 | 0,0 | 35,59 | 0,0 |

^[a] B3PW91/6-311++G(d,p). ^[b] LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p). ^[c] $\Phi=C2-C3-C2'-C3'$.

En ce qui concerne la protonation pyrrolidinique, les enthalpies libres calculées pour les trois conformères de Nsp³+ évoluent dans un intervalle étroit compris entre 4 et 9 kJ mol⁻¹, respectivement pour les niveaux B3PW91 et LMP2//B3PW91. Cette faible différence suggère qu'en phase gazeuse, l'épibatidine protonée sur l'N sp³ doit exister sous la forme d'un mélange de ces trois minima. Le conformère Nsp³+A présentant un angle Φ de 270° est le plus stable aux deux niveaux de théorie utilisés.

Les géométries optimisées de la forme Nsp²+ peuvent être distinguées par leurs formes *anti* et *syn*, correspondant respectivement aux structures **4-5** et **6-7-8** représentées sur la Figure 4. Le Tableau I montre que les isomères *trans* sont énergétiquement plus favorables, les isomères *syn* étant déstabilisés d'environ 30 à 36 kJ mol⁻¹ selon le niveau de théorie. Nous attribuons cette préférence conformationnelle à l'existence d'une liaison hydrogène intramoléculaire CH...Nsp³ (Figure 4). En effet, pour les conformations *anti*, la paire libre de l'Nsp³ est dirigée favorablement pour créer une interaction stabilisante. Le conformère **4** *anti* possède une liaison CH...Nsp³ (2,29 Å) légèrement plus courte que celle du conformère **5** *anti* (2,35 Å). Cette interaction plus forte pour **4** contribue à l'existence d'une population plus importante pour ce conformère par rapport à **5**.

Forme chimique prépondérante en phase gazeuse

La proportion entre les deux formes monoprotonées Nsp^{2+} et Nsp^{3+} à l'état gazeux peut être estimée à partir des valeurs d'enthalpie libre rassemblées dans le Tableau I. L'examen de ces valeurs montre que les deux niveaux de calcul conduisent à des résultats très différents. En effet, au niveau B3PW91, les résultats indiquent une large prépondérance de la forme Nsp^{2+} (avec une population totale d'environ 76%), les calculs LMP2//B3PW91 privilégiant la forme Nsp^{3+} (population d'environ 85%). Ces divergences reflètent les déficiences de la DFT dans le cas de systèmes moléculaires stabilisés par des interactions par liaison H intramoléculaire du fait de l'erreur de superposition des bases (BSSE) inhérente. Ainsi les conformères **4** et **5** présentant l'interaction $\text{CH}\cdots\text{N}$ sont artificiellement stabilisés en B3PW91. Des travaux de la littérature ont montré que les calculs LMP2 corrigent ce défaut,¹⁷⁻²¹ nous observons effectivement une plus grande stabilité aux conformères Nsp^3 avec la mise en œuvre de cette méthode.

Spectres IRMPD

Les spectres théoriques obtenus pour l'ensemble des trois conformères de Nsp^{3+} montrent des caractéristiques très proches. De même, les spectres calculés pour l'ensemble des minima de Nsp^{2+} présentent de grandes similitudes. La Figure 5 compare le spectre IRMPD expérimental (5a) aux spectres théoriques correspondant à chacune des deux conformations principales des formes Nsp^{3+} (**1**) et Nsp^{2+} (**4**) (Figures 5b et 5c, respectivement). Expérimentalement, quatre bandes sont observées, positionnées à 1121, 1151, 1457 et 1579 cm^{-1} . Ces bandes sont reproduites de façon satisfaisante dans les spectres calculés des trois conformères Nsp^{3+} . Les deux premières, localisées dans le domaine des basses fréquences, peuvent respectivement être attribuées aux modes fortement couplés

d'élongation de la liaison C-Cl et de déformation dans le plan du groupe C-C-H. La bande à 1457 cm^{-1} peut être attribuée sans ambiguïté à la vibration dans le plan des groupes méthylène du cycle 7-azabicyclo[2.2.1]heptane. Le massif à 1579 cm^{-1} correspond aux vibrations de déformation dans le plan du groupement NH_2^+ du cycle azabicyclo[2.2.1]heptane de la forme Nsp^{3+} et aux vibrations d'élongation des liaisons du cycle pyridine. Une nouvelle absorption à 1523 cm^{-1} , absente dans le spectre calculé des isomères Nsp^{3+} , devient apparente quand l'axe vertical du spectre expérimental est étiré (haut de la Fig. 5a). Cette absorption est attribuable au couplage des vibrations d'élongation des liaisons du cycle pyridine avec les vibrations de déformation dans le plan des CH aromatiques spécifiques à la forme Nsp^{2+} (Fig. 5c). Cette bande suggère donc que la forme Nsp^{2+} est également présente en phase gazeuse. Il est à noter que les bandes apparaissant entre 1200 et 1400 cm^{-1} dans les spectres calculés des conformères principaux de Nsp^{3+} et de Nsp^{2+} (Figures 5b et 5c, respectivement) ne sont pas visibles sur le spectre expérimental (Figure 5a).

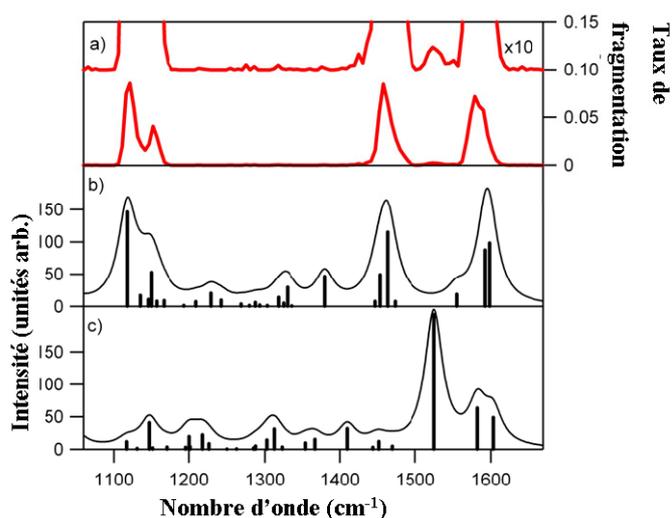


Figure 5- Comparaison entre (a) le spectre expérimental IRMPD de l'épibatidine protonée et les spectres simulés correspondants aux deux conformations de plus basses énergies: (b) Nsp^{3+} conformère (1) et (c) Nsp^{2+} conformère (4) calculés au niveau B3PW91/6-311++G(d,p).

Afin de confirmer la présence des deux formes Nsp^{3+} et Nsp^{2+} , un spectre pondéré prenant en compte la population de chaque minimum énergétique de l'épibatidine selon une distribution de Boltzmann basée sur les enthalpies libres obtenues au niveau LMP2//B3PW91 a été simulé. Le bon accord entre le spectre pondéré et le spectre expérimental IRPMD confirme donc que les deux formes protonées se trouvent à l'état gazeux et que le conformère Nsp^{3+} est majoritaire.

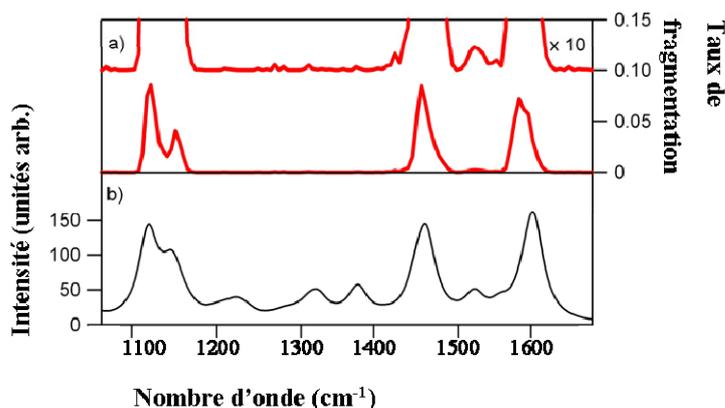


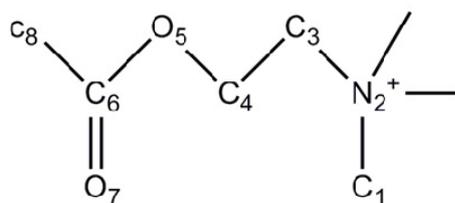
Figure 6- Comparaison entre a) le spectre expérimental IRPMD et b) le spectre simulé correspondant à la moyenne des spectres des minima de l'épibatidine pondéré grâce à une distribution de Boltzmann basée sur les enthalpies libres au niveau LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p).

III] Acétylcholine

I.1-Rappels bibliographiques

L'acétylcholine (ACh) (Figure 7) est un neurotransmetteur clé aussi bien pour le système nerveux central que pour le système nerveux périphérique. Il s'agit du premier neurotransmetteur à avoir été isolé (1914) par Henry Hallett Dale, dont l'ensemble des travaux dans le domaine « de la transmission chimique des impulsions nerveuses » lui vaudront le prix Nobel de Médecine en 1936, qu'il partagera avec Otto Loewi. Malgré sa

petite taille, l'ACh se caractérise par une grande flexibilité structurale, et la présence de groupements polaires et apolaires.²² L'importance biologique de l'ACh et ses caractéristiques chimiques ont suscité de nombreuses études, tant expérimentales que théoriques, destinées à appréhender son comportement conformationnel.^{7, 22-27} Une étude théorique par dynamique moléculaire menée par Vistoli et coll.²³ dans différents environnements (à l'état isolé et dans deux solvants de polarité très différente, le chloroforme et l'eau) a montré que quel que soit le milieu, les angles τ_1 et τ_4 évoluaient dans une faible gamme de valeurs ($\tau_1 = 60^\circ \pm 20^\circ$ et $\tau_4 = 0^\circ \pm 20^\circ$), les principaux degrés de liberté conformationnels de l'ACh étant donc représentés par les angles dièdres τ_2 et τ_3 . Ces études ont permis de déterminer l'existence de sept conformations de basse énergie de l'ACh notées +gt, +g+g, t-g, tt, t+g, -g-g, -gt. Dans cette notation +g, -g et t correspondent à des valeurs des angles de torsion τ_2 et τ_3 situées dans des gammes respectives de $30-90^\circ$, $270-330^\circ$ et $150-210^\circ$ (Figure 8), g et t faisant respectivement référence à des conformations de type gauche et trans.



$$\tau_1 = \text{C1-N2-C3-C4}$$

$$\tau_2 = \text{N2-C3-C4-O5}$$

$$\tau_3 = \text{C3-C4-O5-C6}$$

$$\tau_4 = \text{C4-O5-C6-O7}$$

Figure 7- Structure chimique, numérotation et principaux angles de torsion de l'ACh.-

Williamson et coll. ont montré par une étude de RMN bidimensionnelle que l'ACh passait d'une conformation étendue (tt) à des conformations repliées t-g et t+g lors de son

interaction avec les nAChRs.²⁸ Plus récemment, une étude par RMN à l'état solide sur un récepteur nicotinique complet enfoui dans son environnement membranaire a montré que l'ACh adopte deux familles de conformations repliées reliées par symétrie.²⁹ La première est caractérisée par des valeurs des angles τ_2 et τ_3 de -128 et $+62^\circ$, la seconde par des valeurs de $+128$ et -62° . Ces conformations sont caractérisées par des valeurs de distances entre l'azote ammonium et l'atome d'oxygène du carbonyle de l'ordre de $5,1 \text{ \AA}$.

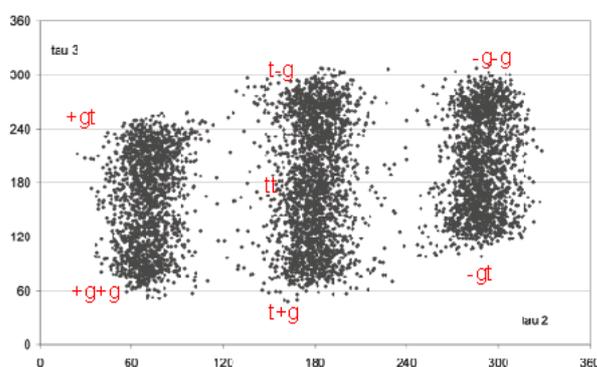


Figure 8- Comportement conformationnel de l'ACh dans l'eau en fonction de τ_2 et τ_3 (la localisation des sept conformères de basse énergie est indiquée en rouge²²).

I.2-Résultats

Dans le cadre de ce travail de thèse, seuls les conformères de l'ACh ayant été suggérés et/ou mis en évidence par des investigations expérimentales ou théoriques dans des formes complexées avec les nAChRs ont été considérés. Selon la notation précédente, il s'agit, pour les angles τ_2 et τ_3 , des conformères tt, t-g et t+g (Figure 9), les angles τ_1 et τ_4 ayant des valeurs de l'ordre de 60° et 0° . Le Tableau II rassemble les données énergétiques, les valeurs des angles de torsion τ_2 et τ_3 et les distances entre l'atome d'azote ammonium et l'oxygène de la fonction carbonyle obtenues après optimisation pour ces trois conformations, leur structure étant représentée sur la Figure 9. Nos résultats montrent qu'à l'état isolé, les formes repliées t+g et t-g sont clairement majoritaires et équitablement représentées, la forme étirée (tt) ayant une probabilité d'existence négligeable. Les deux conformations

principales apparaissent toutefois situées à environ 18 kJ mol^{-1} des minima énergétiques prévus *in vacuo* dans des travaux antérieurs,^{22, 30} ce qui confirme le caractère flexible de la molécule, plusieurs minima énergétiques significativement différents en terme de structure étant obtenus dans un faible intervalle énergétique.

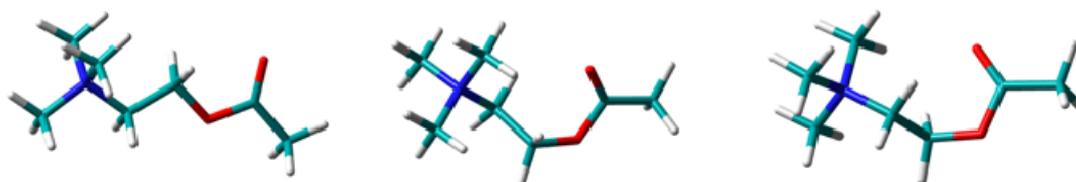


Figure 9- Géométries optimisées (MPWB1K/6-31+G(d,p)) des trois conformères (de gauche à droite : tt, t+g et t-g) étudiés de l'ACh.

Tableau II-Valeur des angles τ_2 , τ_3 , des énergies relatives (ΔD_0) des distances entre l'atome d'azote ammonium et l'atome d'oxygène du carbonyle et des populations respectives des trois conformères (tt, t+g et t-g) de l'ACh étudiés.

| | t+g | tt | t-g |
|-----------------------------------|-------|-------|-------|
| τ_2 (en degré) | 211,2 | 180,0 | 148,8 |
| τ_3 (en degré) | 77,3 | 180,0 | 282,7 |
| $d(\text{N}_2 \cdots \text{O}_7)$ | 3,59 | 5,02 | 3,59 |
| $\Delta D_0(\text{kJ mol}^{-1})$ | 0,00 | 11,44 | 0,00 |
| $P_i(\%)$ | 49,7 | 0,5 | 49,7 |

IV] Galanthamine et codéine

I.1-Rappels bibliographiques

Alcaloïde extrait du bulbe du perce-neige (*Galanthus nivaliis*), la galanthamine (GAL) a suscité à de nombreuses reprises l'intérêt de la communauté scientifique pour des applications en chimie médicinale. Dans les années 50, l'attention de pharmacologues Bulgares (Paskov D. S. et Nastev G) a ainsi été attirée par l'utilisation de feuilles de perce-

neige dans la pharmacopée traditionnelle pour traiter les douleurs nerveuses.³¹⁻³³ Isolée en 1952, la GAL est commercialisée en Bulgarie à la fin des années 50 sous le nom de Nivalin® du fait de ses propriétés sur le système nerveux central. C'est au début des années 60 que l'activité anticholinestérasique de la GAL est découverte et que sa capacité à franchir la barrière sang-cerveau est mise en évidence. Les essais précliniques de la GAL contre la MA ont commencé dans les années 80, pour se poursuivre par des essais cliniques dans les années 90, ces étapes ayant conduit à sa mise sur le marché de certain pays européens (Islande, Irlande, Suède, Royaume-Uni)³⁴ en 2000. Aujourd'hui, la GAL est commercialisée en France sous le nom de Reminyl®.

La codéine (COD) fait partie de la famille des opiacés et est présente dans le pavot somnifère (*Papaver somniferum*). Utilisée dans de nombreux pays, son application principale est le traitement de la douleur, souvent en combinaison avec d'autres molécules comme l'aspirine et le paracétamol. Elle est également employée comme antitussif.³⁵ La COD est majoritairement métabolisée au niveau hépatique, dont environ 10% en morphine, par l'intermédiaire d'un cytochrome P450 (CYP450-2D6).³⁶

La Figure 10 montre que la GAL et la COD présentent de grandes similitudes chimiques et structurales. Malgré ces analogies, les deux molécules possèdent des activités biologiques significativement différentes. En effet, alors qu'elles sont toutes les deux des modulateurs allostériques des nAChRs, seule la galanthamine est inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme hydrolysant l'ACh en choline et en acide acétique. Cette dualité d'action de la galanthamine lui a valu d'accéder à un statut de chef de file pour le développement de nouveaux médicaments contre la MA.

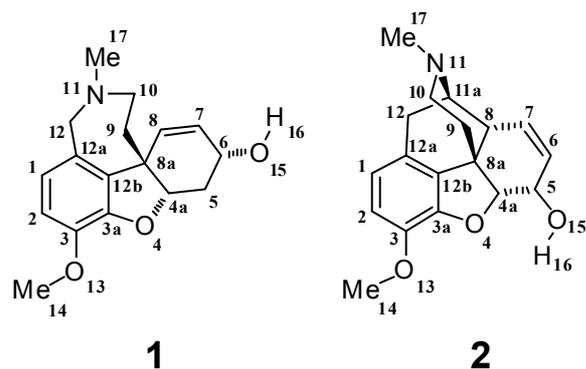


Figure 10- Représentations numérotées de la galanthamine (1) et de la codéine (2).

Dans le but d'appréhender de façon approfondie le comportement structural et en termes d'interactions moléculaires de ces deux ligands, nous avons entrepris une étude mettant en œuvre des mesures expérimentales en solution (IRTF et RMN), des observations à travers les bases de données structurales cristallographiques et des calculs quantiques à l'état isolé.

I.2-Résultats

Structure de la galanthamine et de la codéine

Données expérimentales par IRTF et RMN

Dans un premier temps, des spectres infrarouge de solutions de galanthamine et de codéine dans la région d'élongation du groupement hydroxyle $\nu(\text{OH})$ ont été enregistrés. La Figure 11 montre les spectres obtenus dans le cas de la galanthamine en solution dans différents solvants, classés par ordre de polarité décroissante : CCl_4 , C_2Cl_4 , et $c\text{-C}_6\text{H}_{12}$. Ces données montrent que la bande $\nu(\text{OH})$ est typique d'une structure possédant une liaison H intramoléculaire $\text{O}_{15}-\text{H}_{16}\cdots\text{O}_4$, conformément aux observations de Carroll et coll..³⁷ En effet, il s'agit d'une bande fine ($\Delta\nu_{1/2} = 27 \text{ cm}^{-1}$) localisée à 3570 cm^{-1} , significativement décalée de la vibration correspondante du cyclohexanol, située à 3618 cm^{-1} , dans laquelle aucune liaison H intramoléculaire n'est possible, la faible concentration utilisée (environ $4.10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) éliminant toute possibilité de liaison H intermoléculaire. L'enregistrement des spectres

de la galanthamine à différentes températures (de -5°C à 100°C) dans CCl_4 et C_2Cl_4 n'a révélé aucune évolution significative du massif $\nu(\text{OH})$, (Figure 11) suggérant la persistance de la liaison $\text{H O}_{15} - \text{H}_{16} \cdots \text{O}_4$ dans cet intervalle de température.

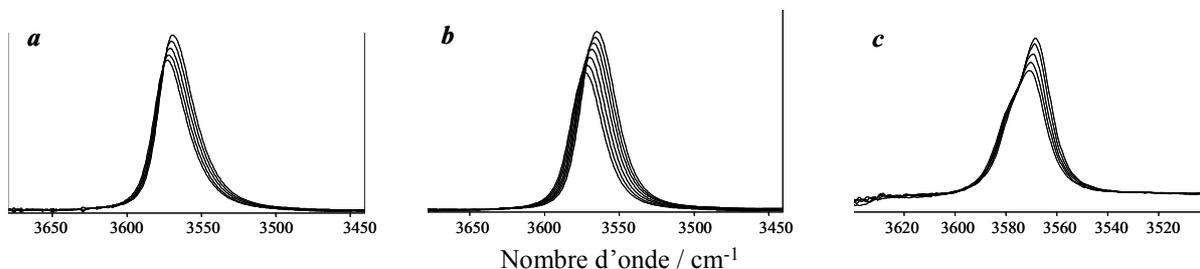


Figure 11—Région d'absorption de la bande de l'hydroxyle $\nu(\text{OH})$ de la galanthamine ($4 \cdot 10^{-3}$ M) en solution dans CCl_4 (a), C_2Cl_4 (b), $c\text{-C}_6\text{H}_{12}$ (c).

La Figure 12 montre que les mêmes caractéristiques structurales de la codéine apparaissent plus sensibles à la nature du solvant. En effet, si le spectre de la région $\nu(\text{OH})$ est quasi-identique à celui obtenu dans le cas de la galanthamine dans C_2Cl_4 , la vibration $\nu(\text{OH})$ étant située aux environs de 3570 cm^{-1} , une bande supplémentaire d'absorption apparaît aux hautes fréquences, autour de 3620 cm^{-1} dans CCl_4 , son intensité augmentant avec l'élévation de la température. Cette vibration ayant pratiquement le même nombre d'onde que la vibration d'élongation $\nu(\text{OH})$ du cyclohexénol, cette observation indique qu'une partie des groupements hydroxyles de la codéine sont déchélatés dans CCl_4 . Dans le cyclohexane, la galanthamine (Figure 11c) et la codéine (Figure 12c) restent toutes les deux entièrement chélatées. Néanmoins, un épaulement favorisé par une augmentation la température est observé au niveau du massif $\nu(\text{OH} \cdots \text{O})$ du côté des hautes fréquences. Dans la mesure où aucune interaction spécifique solvant-soluté n'est envisageable avec le cyclohexane, nous attribuons cet épaulement à une modification de l'environnement autour de $\text{O}_{15}\text{H}_{16} \cdots \text{O}_4$. Une telle modification pourrait être liée à une rotation autour de la liaison $\text{C}_{\text{ar}}-\text{O}_{13}$, à l'origine d'un

rapprochement du groupe méthoxy de la fonction hydroxyle, induisant une modification du massif d'absorption.

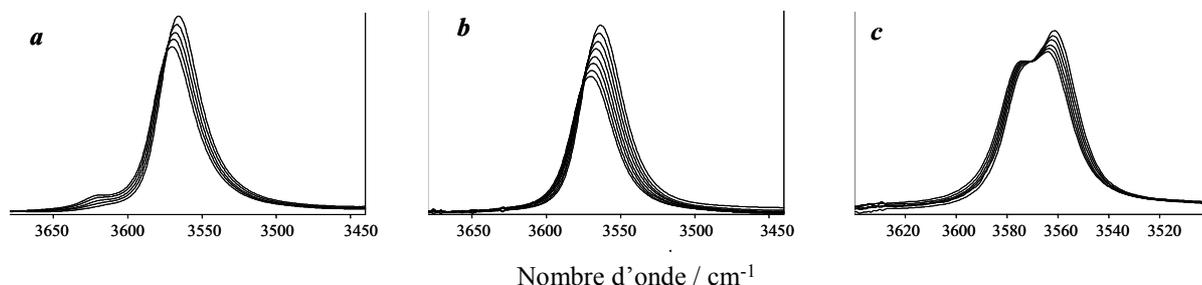


Figure 12- Région d'absorption de la bande de l'hydroxyle $\nu(\text{OH})$ de la codéine (4.10^{-3} M) en solution dans CCl_4 (a), C_2Cl_4 (b), $c\text{-C}_6\text{H}_{12}$ (c) à diverses températures.

Avec un solvant accepteur de liaison H tel que l'acétonitrile, la codéine et la galanthamine présentent un comportement significativement différent. En effet, dans les mélanges ternaires codéine/ CCl_4 / CH_3CN avec des proportions croissantes en CH_3CN , le massif caractéristique de la chélation intramoléculaire $\text{O}_{15}\text{H}_{16}\cdots\text{O}_4$ décroît en faveur d'une nouvelle bande, plus large, apparaissant aux basses fréquences (Figure 13b). Cette nouvelle bande est attribuable à la formation de complexes de liaison H intermoléculaires de type $\text{O}_{15}\text{H}_{16}\cdots\text{N}\equiv\text{C}$. Ainsi, dans l'acétonitrile pur, le spectre de la codéine indique que le groupe OH de la molécule est pratiquement totalement déchélaté sur le plan des interactions intramoléculaires, s'associant de façon privilégiée avec le solvant. Au contraire, les spectres obtenus dans le cas de la galanthamine témoignent de la contribution toujours significative de la chélation intramoléculaire dans l'acétonitrile pur (Figure 13a), le décalage vers le rouge du massif $\text{O}_{15}\text{H}_{16}\cdots\text{O}_4$ étant lié à l'effet de solvant. La figure 13c représente le spectre de la codéine et de la galanthamine dans un mélange de CCl_4 et d'hexaméthylphosphoramide (HMPA) dans la région hydroxyle. L'HMPA qui est un meilleur accepteur de liaison hydrogène que l'acétonitrile permet, même en faible concentration dans CCl_4 , la rupture

d'une proportion significative de la liaison H intramoléculaire, remplacée par une liaison H intermoléculaire $O_{15}H \cdots O=P(NMe_2)_3$ pour les deux composés. Comme pour l'acétonitrile, il semble que la galanthamine possède une chélation plus robuste, comme l'illustre la proportion relativement plus faible de la bande de complexe intermoléculaire ($\sim 3350 \text{ cm}^{-1}$) par rapport à la bande de complexe intramoléculaire ($\sim 3570 \text{ cm}^{-1}$) en comparaison avec la codéine. Ceci est encore plus évident quand on compare le déplacement de fréquence de la bande OH lors de la chélation intermoléculaire qui est significativement plus grand pour la codéine que pour la galanthamine ($263 \text{ vs. } 224 \text{ cm}^{-1}$). Cela suggère que le groupement hydroxyle de la codéine serait un meilleur donneur de liaison H que celui de la galanthamine en conformation déchélatée.

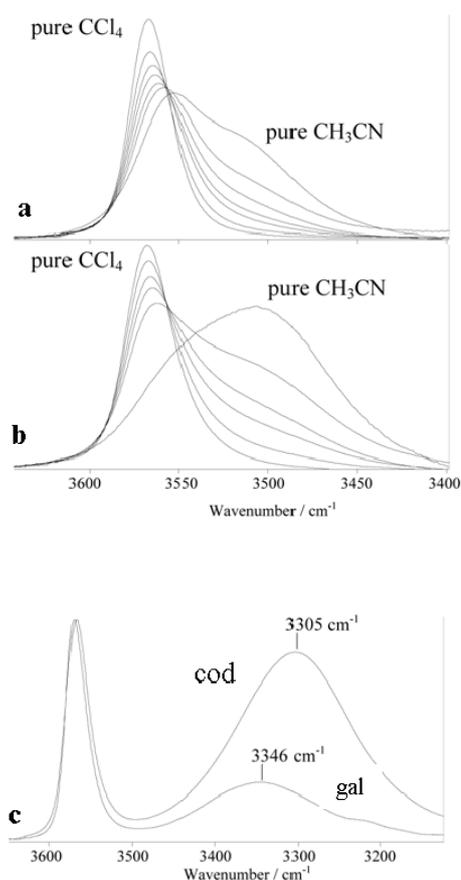


Figure 13-Région d'absorption de l'hydroxyle $\nu(\text{OH})$ de la galanthamine (4.10^{-3} M , *a*), de la codéine (4.10^{-3} M , *b*) dissoutes dans divers mélanges $\text{CCl}_4 / \text{CH}_3\text{CN}$, de la codéine et de la galanthamine dans un mélange de $\text{CCl}_4 / \text{HMPA}$ (*c*).

Dans l'ensemble, cette étude comparative de la région $\nu(\text{OH})$ de la galanthamine et de la codéine dans différents solvants montrent que la liaison H intramoléculaire $\text{O}_{15}\text{H}_{16}\cdots\text{O}_4$ apparaît plus forte dans le cas de la galanthamine.

Des études par RMN dans différents solvants (DMSO- d_6 , CD_3CN , CD_2Cl_2 , CCl_4 (avec 5% CD_2Cl_2) et $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$) ont également été réalisées pour compléter les mesures IRTF. Des mesures d'effets Overhauser nucléaires (NOE) 1D nous ont ainsi permis de sonder l'existence d'interactions intramoléculaires secondaires de type $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ dans les deux ligands en fonction de la polarité des solvants. Le Tableau III rassemble les résultats obtenus en suivant les interactions dipolaires entre les atomes d'hydrogène du groupe méthoxy et l'hydrogène H_2 le plus proche appartenant au phényl (Figure 10). Les valeurs du Tableau III sont significativement différentes selon le solvant, avec des tendances très similaires pour les deux ligands. Une décroissance claire de l'effet NOE 1D est observée, du DMSO au $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$. Cette observation suggère que dans les solvants polaires, le méthoxy est principalement situé dans l'environnement des atomes d'hydrogène du phényle. Au contraire, de faibles valeurs d'effet NOE sont observées dans les solvants apolaires, témoignant de l'augmentation de la distance entre les atomes d'H du groupement méthoxy et H_2 du phényl, qui pourrait favoriser l'apparition d'une interaction stabilisante $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ entre la fonction méthoxy et l'oxygène furanique. On peut par ailleurs noter que l'existence d'une interaction stabilisante pourrait également être à l'origine de la présence, sur le spectre IR du cyclohexane (Figure 11c et 12c), de l'épaule observé au niveau du massif $\nu(\text{OH})$ de la galanthamine et de la codéine. Ces observations expérimentales constituent donc une preuve

supplémentaire en faveur de l'hypothèse selon laquelle la bande chélatée $\nu(\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4)$ serait perturbée par le groupement méthoxy.

Tableau III- Evolution du couplage dipolaire entre le groupement méthoxy et l'atome d'hydrogène le plus proche appartenant au phényle (H_2) de la galanthamine et de la codéine lors de l'irradiation du méthyle Me_{14} dans différents solvants, du DMSO au $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$ ^[a].

| Solvant | Galanthamine | Codeine |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $\text{H}_2 \eta$ (%) | $\text{H}_2 \eta$ (%) |
| DMSO- d_6 | 16 | 16 |
| CD_3CN | 13 | 11 |
| CD_2Cl_2 | 10 | 13 |
| CCl_4 ^[b] | 9 | 7 |
| $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$ | 7 | 6 |

^[a] l'effet NOE a été mesuré sur un pic tandis que l'autre était saturé. ^[b] avec 5% de CD_2Cl_2 .

Calculs de chimie quantique

Des calculs théoriques ont également été réalisés pour rationaliser et compléter les études expérimentales. Dans un travail antérieur de l'équipe, les caractéristiques structurales de la galanthamine ont été étudiées à l'état isolé en utilisant des méthodes HF, post HF et DFT.³⁸ Cette étude a démontré que les principaux éléments structuraux de la galanthamine sont (i) une forte préférence pour le conformère possédant une chélation intramoléculaire $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$, (ii) une conformation chaise du cycle tétrahydroazépine, (iii) une légère préférence pour l'orientation axiale du groupement *N*-méthyle (iv) la prédilection d'une orientation *trans* du groupe méthoxy par rapport au cycle dihydrofurane. Les nouvelles données expérimentales obtenues par spectrométrie IRTF et RMN exposées plus haut nous ont amené à reconsidérer au niveau de théorie sélectionné pour ce travail de thèse, l'étude conformationnelle de la galanthamine et de la codéine, en particulier en ce qui concerne

l'éventualité de la présence d'interactions $C_{14}H \cdots O_4$. Le Tableau IV montre les stabilités relatives des différents conformères de la galanthamine calculées au niveau LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)//MPWB1K/6-31+G(d,p). La position axiale du substituant *N*-méthyle apparaît privilégiée, la population relative des isomères *gauches* du groupement méthoxy représentant plus de la moitié de la population totale. Les calculs à l'état isolé favorisent donc clairement la présence d'une interaction stabilisante entre le méthoxy et l'oxygène furanique, une tendance en accord avec les observations expérimentales dans les solvants apolaires.

Tableau IV- Enthalpies libres relatives, ΔG° , et populations, P_i , des conformères de la galanthamine avec leurs caractéristiques structurales.

| orientation du OH | conformation du cycle azoté | position du <i>N</i> -méthyle | orientation du MeO | ΔG° [a] | P_i [b] |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------|-----------|
| Chélaté | Chaise | Axiale | <i>Trans</i> | 0,0 | 28,6 |
| | | | <i>Gauche 1</i> | 0,9 | 19,6 |
| | | | <i>Gauche 2</i> | 1,8 | 13,7 |
| | | Equatoriale | <i>Trans</i> | 1,8 | 14,0 |
| | | | <i>Gauche 1</i> | 1,1 | 18,1 |
| | | | <i>Gauche 2</i> | 3,9 | 6,0 |
| Ouvret | Chaise | Axiale | <i>Gauche 1</i> | 17,2 | 0,0 |
| | | | <i>Gauche 2</i> | 18,6 | 0,0 |

[a] en kJ mol^{-1} au niveau LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)//MPWB1K/6-31+G(d,p). [b] population des conformères en %.

En utilisant une stratégie similaire, nous avons étudié la structure de la codéine en considérant les degrés de liberté suivants : (i) l'orientation du groupement hydroxyle (ii) la conformation du cycle pipéridine (iii) la position du substituant *N*-méthyle, et (iv) l'orientation *gauche* – *trans* du méthoxy par rapport à l'oxygène furanique. Nos résultats

indiquent que seules deux structures coexistent en proportion significative à l'état isolé (Tableau V). Ces deux isomères présentent une fonction hydroxyle chélatée et une conformation chaise du cycle pipéridine, le groupement *N*-méthyle étant situé en position équatoriale. Ils ne diffèrent donc que par l'orientation *gauche* ou *trans* de leur groupement méthoxy (Figure 14). On peut noter que contrairement à la galanthamine, l'équilibre axial – équatorial du groupement *N*-méthyle de la codéine est définitivement en faveur de l'isomère équatorial. La conformation bateau est grandement déstabilisée (de 31 à 54 kJ mol⁻¹), tout comme les formes avec l'hydroxyle déchélaté (de 18 à 32 kJ mol⁻¹). L'orientation du méthoxy, et par conséquent l'interaction potentielle des CH avec l'oxygène furanique, apparaît donc comme le degré de liberté principal de la codéine à l'état isolé.

Tableau V- Enthalpies libres relatives, ΔG° , et populations, P_i , des conformères de la galanthamine avec leurs différents éléments structuraux.

| orientation du OH | conformation du cycle azoté | position du <i>N</i> -méthyle | orientation du MeO | ΔG° [a] | P_i [b] |
|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------|-----------|
| Chélaté | Chaise | Equatoriale | <i>Gauche</i> | 0,0 | 63,3 |
| | | | <i>Trans</i> | 1,4 | 36,3 |
| | | Axiale | <i>Trans</i> | 13,4 | 0,3 |
| | | | <i>Gauche</i> | 15,3 | 0,1 |
| | Bateau | Equatoriale | <i>Trans</i> | 31,3 | 0,0 |
| | | Axiale | <i>Trans</i> | 54,0 | 0,0 |
| Ouvert | Chaise | Equatoriale | <i>Trans</i> | 20,4 | 0,0 |
| | | | <i>Gauche</i> | 18,3 | 0,0 |
| | | Axiale | <i>Trans</i> | 32,6 | 0,0 |
| | | | <i>Gauche</i> | 32,4 | 0,0 |

[a] en kJ mol⁻¹ au niveau LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)//MPWB1K/6-31+G(d,p). [b] population des conformères en %.

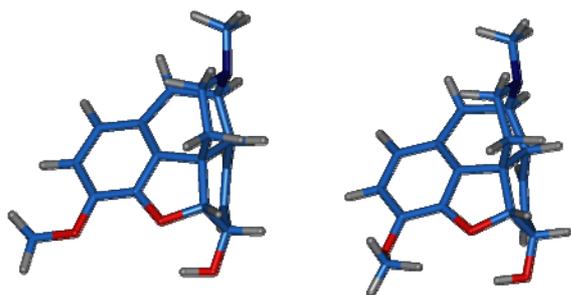


Figure 14- Structures optimisées de la codéine avec le groupement hydroxyle chélaté, la conformation chaise du cycle pipéridine avec le substituant *N*-méthyle en position équatoriale et le groupe méthoxy en *trans* (a) et *gauche* (b) par rapport au cycle dihydrofurannique.

Malgré les similitudes chimiques des deux ligands, leurs caractéristiques conformationnelles apparaissent donc nettement différentes puisque, de façon contrastée, les positions des groupes méthoxy et *N*-méthyle conduisent à six minima différents s'étalant sur un domaine énergétique de l'ordre de 4 kJ mol^{-1} dans le cas de la galanthamine.

Les éléments structuraux de la codéine obtenus dans ce travail, en solution et à l'état isolé, sont en accord avec les données observées à l'état cristallin. Ainsi, les structures de codéine neutre^{39, 40} montrent sans ambiguïté la présence d'une interaction intramoléculaire $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ ($d(\text{H}\cdots\text{O}_4)=2,140$ et $2,147 \text{ \AA}$, respectivement) de même que la structure de l'iodure *N*-méthyle codéinium,⁴¹ malgré l'interaction intermoléculaire $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{I}$ mentionnée par les auteurs. Une orientation *trans* du groupe méthoxy est observée dans les deux structures cristallines de la codéine neutre alors qu'il adopte une orientation *gauche* dans l'iodure de *N*-méthyle codéinium, avec une interaction $\text{C}_{14}\cdots\text{O}_4$.

Au niveau de calcul sélectionné dans le cadre de la thèse, les conformères *gauche-trans* du groupe méthoxy de la codéine apparaissent avec un rapport de population de 63:37. Dans le cas de la galanthamine, la proportion relative des isomères *gauche* par rapport à la population totale est légèrement plus faible (57 %). L'énergie d'hyperconjugaison entre les électrons des doublets non-liants de l'O furannique n_{O} et l'orbitale antiliante du groupe méthoxy $\sigma^*_{(\text{C-H})}$ calculée à partir d'une analyse NBO est en accord avec cette tendance, la

valeur calculée pour le conformère *gauche* de la codéine ($E_{n \rightarrow \sigma^*} = 3,8 \text{ kJ mol}^{-1}$) étant très légèrement supérieure (de l'ordre de 1 kJ mol^{-1}) à celle calculée pour la galanthamine ($E_{n \rightarrow \sigma^*} = 4,8 \text{ kJ mol}^{-1}$). L'interaction stabilisante intramoléculaire de type $C_{14}H \cdots O_4$ apparaît donc effective dans les deux ligands à l'état isolé et semble plus forte dans le cas de la codéine. Une conséquence directe de l'existence de cette interaction est que l'environnement du groupe hydroxyle et de l'O furanique dans la codéine devrait être plus sensible, donc plus perturbé, par le groupe méthoxy. Ces tendances théoriques sont cohérentes avec les spectres IR enregistrés dans le cyclohexane (Figures 11c et 12c), qui suggèrent la présence de deux conformères *gauche* et *trans*. Dans la région d'élongation $\nu(OH)$, un épaulement plus important du côté des hautes fréquences est observé dans le cas de la codéine par rapport à la galanthamine. Le déplacement vers les hautes fréquences mesuré entre l'épaulement et la bande principale est également légèrement plus important dans le cas de la codéine par rapport à la galanthamine (de l'ordre de 10 cm^{-1} par rapport à 7 cm^{-1}). Le déplacement théorique prédit pour la codéine (15 cm^{-1}) est en accord raisonnable avec la valeur expérimentale, la valeur correspondante estimée pour la galanthamine étant beaucoup plus faible (2 cm^{-1}).

Les études par spectroscopie IRTF et les calculs théoriques précédents semblent indiquer une interaction $O_{15}H \cdots O_4$ plus robuste dans la galanthamine que dans la codéine, donc plus difficile à rompre pour former une interaction intermoléculaire avec un accepteur de liaison hydrogène (Figure 13). Les valeurs d'enthalpies libres relatives de $17,2$ et de $18,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, (Tableaux IV et V), obtenues respectivement pour les conformères *gauches* sans liaison H intramoléculaire de la galanthamine et de la codéine par rapport aux conformères les plus stables avec interaction $O_{15}H \cdots O_4$ sont comparables à l'énergie de stabilisation calculée pour l'interaction par liaison H intramoléculaire entre l'hydroxyle phénolique et le méthoxy dans

le guaiacol^{42, 43} (environ 18 kJ mol⁻¹). Par comparaison avec la codéine, une légère déstabilisation (de l'ordre de 10%) du conformère déchélaté de la galanthamine confirme une plus grande force de l'interaction intramoléculaire O₁₅H...O₄. Ce comportement est vérifié à travers le calcul de descripteurs théoriques tels que les potentiels électrostatiques $V_{\alpha}(r)$, V_{\min} et les énergies des interactions de transfert de charge $E_{n \rightarrow \sigma^*}$ issues d'une analyse NBO (Tableau VI). La galanthamine présente ainsi une plus forte interaction entre les paires libres $n_{(O)}$ de l'oxygène furanique et l'orbitale antiliante $\sigma^*_{(O-H)}$. Dans les conformères chélatés, l'analyse de la valeur du minimum du potentiel électrostatique V_{\min} calculée aux alentours de l'oxygène de l'hydroxyle est également instructive. En effet, le V_{\min} calculé pour la galanthamine est significativement plus négatif (-241,6 kJ mol⁻¹) que celui de la codéine (-227,6 kJ mol⁻¹), suggérant l'existence d'un transfert de charge plus fort de l'oxygène furanique vers l'hydroxyle dans la galanthamine, ce qui se traduit par une densité électronique plus importante des paires libres de l'oxygène hydroxyle. L'existence de cette interaction par liaison H intramoléculaire plus forte, explique la plus faible disponibilité de l'hydroxyle de la galanthamine observée par spectroscopie infrarouge dans une solution ternaire en présence d'un accepteur de liaison H tel que l'acétonitrile. Pour la codéine, la valeur légèrement plus grande du potentiel électrostatique $V_{\alpha}(r)$ (851,7/849,6 kJ mol⁻¹), calculée autour de l'hydrogène de l'hydroxyle pour les conformères non chélatés, semble indiquer qu'il doit être un donneur de liaison H plus fort que celui de la galanthamine (Tableau VI).

Tableau VI- Comparaison de descripteurs théoriques pondérés caractérisant les fragments hydroxyles de la galanthamine et de la codéine : énergies d'interactions $E_{n \rightarrow \sigma^*}$, valeurs du potentiel électrostatique V_{\min} et $V_{\alpha}(r)$ (en kJ mol^{-1}).

| Conformères | Galanthamine | Codéine |
|--|--------------|---------|
| Chélatés | | |
| $E_{n(\text{O}_{\text{fur}}) \rightarrow \sigma^*_{\text{O-H}}}$ | 18,6 | 16,2 |
| $V_{\min}(\text{O}_{15})$ | -241,6 | -227,6 |
| Ouverts | | |
| $V_{\alpha}(r)(\text{H}_{16})$ | 849,6 | 851,7 |

Sites accepteurs de liaison H de la galanthamine et de la codéine

Avec un azote cyclique, un groupement méthoxy, un oxygène furanique et un oxygène d'hydroxyle, la galanthamine et la codéine ne présentent pas moins de quatre sites potentiellement accepteurs de liaison H. De plus, l'existence de plusieurs conformères complique l'évaluation du potentiel d'interaction par liaison H de chacun de ces sites, cette propriété étant très sensible à l'environnement immédiat du site d'interaction. Une première simplification est toutefois possible en raison du comportement de l'atome d'oxygène du cycle dihydrofurane dans la mesure où en solution dans CCl_4 et C_2Cl_4 , les deux ligands apparaissent en majorité sous une forme chélatée par liaison H intramoléculaire dans laquelle cet atome n'est donc pas disponible. En effet, le potentiel électrostatique calculé à la surface moléculaire de la codéine (Figure 15) montre l'absence d'une zone riche en électrons au niveau de cet atome. Ainsi, dans le cas du conformère *trans*, la Figure 15a montre une seule zone riche en électrons, correspondant à la fois aux doublets non-liants des atomes d'O du groupe méthoxy et furanique, tandis que dans la forme *gauche*, aucune zone nucléophile n'est apparente dans l'environnement de l'O furanique. De ce point de vue, la codéine se comporte donc comme la galanthamine.

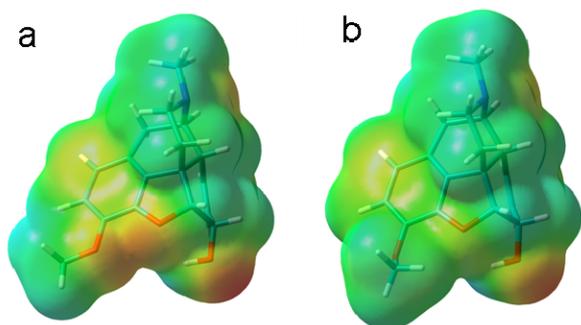


Figure 15- Potentiels électrostatiques calculés à la surface moléculaire des conformères *trans* (**a**) et *gauche* (**b**) de la codéine.

Une caractérisation qualitative des sites accepteurs de liaison hydrogène des deux composés peut être effectuée en considérant leur comportement respectif en présence de plusieurs donneurs de liaison H. Nous avons utilisé le *p*-fluorophénol (*p*FP), donneur de liaison H de référence pour la détermination du pK_{BHX} , le méthanol, classiquement sélectionné pour les mesures de déplacements de fréquence $\Delta\nu(\text{OH})$ de la bande hydroxyle, le 2,2,2-trifluoroéthanol et l'éthanol qui possèdent une acidité et/ou une basicité intermédiaire de liaison H. Les différents spectres IRTF obtenus, présentés sur la Figure 16, permettent de dégager les tendances suivantes. Quand l'acidité de liaison hydrogène du donneur décroît ($p\text{FP} > \text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH} > \text{EtOH} \sim \text{MeOH}$),⁴⁴ on observe un déplacement de fréquence $\Delta\nu(\text{OH})$ plus faible pour les bandes **1** et **2** (Figure 16). D'après les valeurs $\Delta\nu(\text{OH})$ rassemblées dans le Tableau VII, les complexes correspondants ne peuvent être attribués qu'à l'association du donneur de liaison H sur l'atome d'azote du cycle saturé et sur l'oxygène chélaté de l'hydroxyle, respectivement. Avec le méthanol, les valeurs $\Delta\nu(\text{OH})$ supérieures à 375 cm^{-1} peuvent en effet indiquer une association avec des amines, des oxydes d'amine, des amidines ou des anions.⁴⁵ Le complexe **1** sur la Figure 16d correspond donc sans équivoque à l'association sur l'azote cyclique ($\Delta\nu(\text{OH}) = 379$ et 381 cm^{-1} pour la codéine et la galanthamine, respectivement).

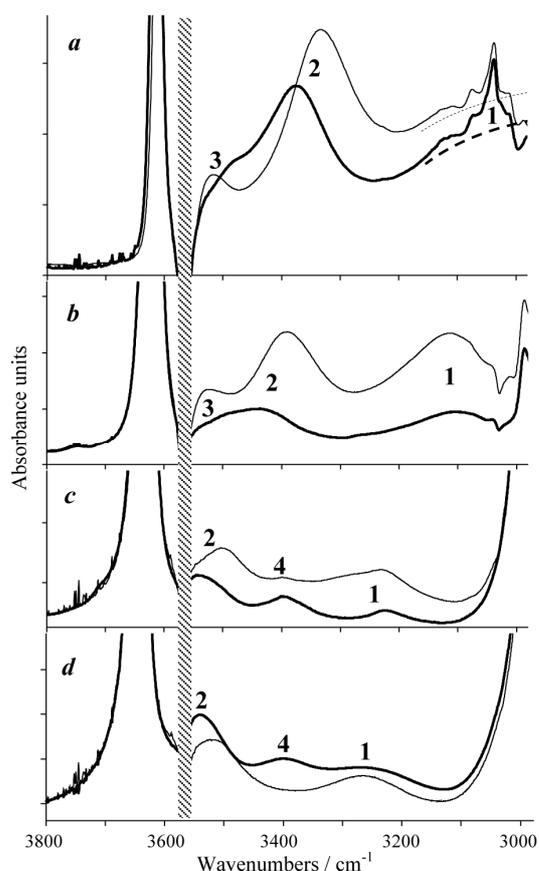


Figure 16- Spectre d'absorption de l'hydroxyle $\nu(\text{OH})$ du (a) *p*FP, (b) $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, (c) EtOH (d) MeOH en solution dans CCl_4 et en présence d'une faible quantité de galanthamine (—) ou de codéine (---)

Tableau VII- Déplacements de fréquence expérimentaux $\Delta\nu(\text{OH})$ (cm^{-1}) mesurés pour plusieurs donneurs de liaison H lors de leur complexation sur l'azote et l'oxygène de la fonction hydroxyle de la codéine et la galanthamine.

| HBD \ HBA | Site azoté | | Site hydroxyle | |
|------------------------|------------|--------------|----------------|--------------|
| | Codéine | Galanthamine | Codéine | Galanthamine |
| <i>p</i> -fluorophénol | ~800 | ~800 | 241 | 279 |
| 2,2,2-trifluoroéthanol | 517 | 508 | 179 | 229 |
| éthanol | 411 | 405 | 95 | 135 |
| méthanol | 379 | 381 | 104 | 124 |

Dans la famille des éthers aromatiques, en utilisant le *p*FP comme donneur de liaison H, la plus grande valeur de $\Delta\nu(\text{OH})$ jamais mesurée (219 cm^{-1} pour le 2,6-dimethylanisole)⁴⁵ est significativement plus faible que le déplacement de fréquence du complexe **2** ($\Delta\nu(\text{OH}) =$

241 et 279 cm^{-1} pour la codéine et la galanthamine, respectivement (Figure 16a)). Avec leurs deux atomes d'oxygènes vicinaux sur le fragment aromatique, sur la base des effets de proximité connus pour moduler le pouvoir accepteur de liaison H, on prévoit que la galanthamine et la codéine présentent un site accepteur de liaison H fort plutôt que deux sites d'éthers aromatiques faibles. En effet, les complexes à trois centres sont les interactions les plus stables trouvées dans des structures telles que le 1,2-diméthoxybenzène avec des donneurs de liaison H, comme il a été montré par exemple avec l'eau.^{46, 47} Cet effet est illustré précisément dans l'échelle pK_{BHX} à travers la différence significative observée entre l'anisole et le 1,2-diméthoxybenzène (pK_{BHX} de -0,07 et 1,16, respectivement). Malgré cette augmentation de basicité, le déplacement de fréquence de la bande $\nu(\text{OH})$ du *pFP* complexé avec le 1,2-diméthoxybenzène reste relativement faible (149 cm^{-1}) même plus faible que celui mesuré pour le complexe à deux centres avec l'anisole (168 cm^{-1}).⁴⁵ Ces observations permettent d'en déduire que le complexe **2** observé dans les spectres de la galanthamine et de la codéine ne peut pas être attribué à l'association du donneur de liaison H sur l'éther aromatique mais plutôt sur l'hydroxyle. Ces valeurs ($\Delta\nu(\text{OH}) = 241$ and 279 cm^{-1}) sont en effet comparables à la valeur trouvée (324 cm^{-1}) pour le β -*N,N*-diméthylamino-1-phénylpropanol, qui possède un groupement hydroxyle chélaté par liaison H intramoléculaire et qui montre la plus grande basicité de liaison H jamais mesurée dans la famille des alcools.⁴⁸

Un troisième complexe (**3**), qui apparaît sur le site de l'éther aromatique, est détecté pour les plus forts donneurs de liaison H utilisés, le *pFP* et le 2,2,2-trifluoroéthanol, mais n'est plus visible avec l'éthanol et le méthanol du fait de la perte d'énergie due à l'absorption de la bande d'élongation $\nu(\text{OH})$ de la codéine et de la galanthamine. A l'état isolé, l'optimisation de la géométrie des complexes de stoechiométrie 1 :1 entre le *pFP* et la

galanthamine ou la codéine sur les différents sites accepteurs de liaison H des deux ligands a été réalisée dans le but d'obtenir des déplacements de fréquence théoriques de la vibration d'élongation $\nu(\text{OH})$ du *p*FP lors de la complexation. Cette approche conduit à des valeurs de $\Delta\nu(\text{OH})$ de l'ordre de 600, 280 et 160 cm^{-1} respectivement, pour les complexes sur l'azote, l'hydroxyle et le méthoxy, en accord avec les attributions expérimentales.

Finalement, un quatrième complexe (**4**), localisé vers 3400 cm^{-1} , apparaît en présence d'éthanol et de méthanol, principalement dans le cas de la codéine (Figures 16*c* and 16*d*). En fait, ces deux donneurs de liaison H possèdent des atomes d'oxygène d'hydroxyle avec une basicité de liaison H ($\text{p}K_{\text{BHX}} = 1,02$ et $0,82$, respectivement),⁴⁹ du même ordre de grandeur que celle de l'acétonitrile ($\text{p}K_{\text{BHX}} = 0,91$).⁵⁰ Nous attribuons cette quatrième bande à un complexe de liaison H où l'éthanol (méthanol) ne joue plus le rôle de donneur mais au contraire d'accepteur de liaison H, et le groupement hydroxyle déchélaté de la codéine étant le site donneur de liaison H. Comme pour CH_3CN , la proportion relative de complexe **4** est significativement moins importante dans la solution de galanthamine témoignant à nouveau de la plus grande chélation du groupe hydroxyle dans ce ligand.

Basicité de liaison H de la galanthamine et de la codéine

Pour compléter de façon quantitative cette étude, nous avons déterminé la basicité de liaison H, $\text{p}K_{\text{BHX}}$, de ces deux molécules sur chaque site précédemment identifié. La galanthamine étant trop peu soluble dans le CCl_4 nous avons mesuré les constantes d'équilibre dans le C_2Cl_4 , des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ayant montré que les valeurs déterminées dans ces deux solvants sont comparables.⁵¹ Malgré de fortes similitudes structurales entre la galanthamine et la codéine, leurs constantes d'équilibre totales sont

significativement différentes, $K_t = 88,4$ and $50,8 \text{ L mol}^{-1}$, respectivement. La galanthamine gagne donc près de 75% de basicité de liaison H par rapport à la codéine. Il convient de garder à l'esprit que la constante K_t correspond à une constante d'équilibre globale, c'est à dire à la somme des constantes individuelles sur chaque site. Quoi qu'il en soit, comprendre l'origine de cette exaltation de basicité de liaison H apparaît utile pour appréhender le comportement des deux ligands dans des processus de reconnaissance moléculaire.

Dans les situations idéales, la constante apparente globale peut être expérimentalement séparée en constantes d'équilibre individuelles, à condition que chaque site accepteur de liaison H possède une sonde spectroscopique significativement perturbée par la complexation par liaison H. Malheureusement, aucun des sites accepteurs de la galanthamine ou de la codéine ne possède une telle sonde, leurs constantes individuelles n'étant donc pas accessibles directement. Toutefois, nous avons montré précédemment que l'élongation $\nu(\text{OH})$ du donneur de liaison H est significativement déplacée vers les basses fréquences lors de la complexation. De plus, il est bien établi que ce déplacement de fréquence est bien corrélé à la basicité de liaison H à condition que la relation $\text{p}K_{\text{BHX}}/\Delta\nu(\text{OH})$ soit considérée à l'intérieur d'un échantillon chimique homogène (défini comme un ensemble de bases possédant le même accepteur de liaison H à l'intérieur des mêmes fonctions et sous-fonctions chimiques d'encombrement stérique comparable).^{49, 50, 52-}

⁵⁴ Ainsi, une augmentation de basicité de liaison H se traduit par une augmentation du déplacement de fréquence pour des sites accepteurs équivalents. La comparaison des déplacements de fréquence (Figure 16 et Tableau VII) montre que quelque soit le donneur de liaison H utilisé, le site hydroxyle (complexe **2**) de la codéine apparaît significativement moins basique que celui de la galanthamine. Les sites amino de la galanthamine et de la

codéine (complexe **1**) semblent par contre présenter des basicités de liaison H équivalentes. Cependant, les amines tertiaires sont très sensibles aux effets stériques, ce qui conduit à une diminution significative de leur basicité de liaison H malgré un important déplacement de fréquence dans les amines encombrées.⁵⁵ Pour cette raison, les sites amino de la galanthamine et de la codéine doivent être comparés avec prudence sur la base des valeurs de déplacements de fréquence, dans la mesure où le substituant méthyle peut être en position axiale ou équatoriale, modifiant significativement l'accessibilité du site azoté. En raison de la perte d'énergie importante autour de 3570 cm^{-1} , la position du complexe **3** se formant sur le groupe méthoxy est difficile à estimer avec une précision suffisante.

Les calculs de chimie quantique peuvent permettre de rationaliser ces tendances expérimentales et d'établir des relations prédictives entre les valeurs de descripteurs théoriques et grandeurs mesurées. Pour estimer les constantes individuelles qui n'ont pas pu être déterminées expérimentalement, les valeurs V_{\min} des sites accepteurs de liaison H (azote cyclique, les sites hydroxyles et méthoxy) de chaque conformère significatif de la galanthamine et de la codéine ont été calculées (Tableau VIII). Les constantes d'équilibre correspondantes, calculées en utilisant l'équation de calibration [Eq. 3.1] sont également rapportées dans ce tableau.

$$\begin{aligned} \text{p}K_{\text{BHX}} &= 1,95 (V_{\min}/100) - 3,14 \\ n &= 45, r = 0,982, s = 0,15 \end{aligned} \quad (3.1)$$

L'examen des valeurs du Tableau VIII montre que l'oxygène du groupe méthoxy reste un faible accepteur de liaison H quelque soit le conformère *gauche* ou *trans* considéré. Conformément à l'intuition chimique, l'oxygène hydroxylique est significativement influencé par l'existence de l'interaction secondaire $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ dans la conformation *gauche*. En effet, cette liaison H intramoléculaire induit un affaiblissement de la densité électronique

sur les paires libres de l'oxygène de l'hydroxyle, conduisant à une diminution d'un facteur proche de deux de la constante d'équilibre correspondante comparée à celle prédite pour la conformation *trans*. Pour la galanthamine, on peut noter que l'azote est un accepteur de liaison H significativement plus fort pour la conformation équatoriale comparée à celle de la conformation axiale.

Tableau VIII- Minima des potentiels électrostatiques (V_{\min} , kJ mol⁻¹) calculés au niveau MPWB1K/6-31+G(d,p) et constantes d'équilibre prédites (K_{calc} , dm³ mol⁻¹) sur les sites accepteurs de liaison H de la galanthamine et de la codéine.

| Structure | Site azoté N ₁₄ | | Site hydroxyle O ₄ | | Site méthoxy O ₁₃ | |
|-------------------------|----------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|------------------------------|------------------|
| | V_{\min} | \bar{K}_{calc} | V_{\min} | \bar{K}_{calc} | V_{\min} | \bar{K}_{calc} |
| Gal-ax- <i>trans</i> | -233,6 | 26,4 | -247,8 | 50,0 | -179,4 [a] | 2,3 |
| Gal-ax- <i>gauche</i> 1 | -227,0 | 19,6 | -239,0 | 33,6 | -180,3 [b] | 2,4 |
| Gal-ax- <i>gauche</i> 2 | -229,7 | 22,2 | -229,0 | 21,5 | -173,3 [b] | 1,8 |
| Gal-eq- <i>trans</i> | -252,6 | 61,9 | -250,9 | 57,4 | -182,7 [a] | 2,7 |
| Gal-eq- <i>gauche</i> 1 | -245,7 | 45,5 | -241,0 | 36,8 | -183,1 [b] | 2,7 |
| Gal-eq- <i>gauche</i> 2 | -248,2 | 50,9 | -232,0 | 24,6 | -175,9 [b] | 2,0 |
| Cod-eq- <i>gauche</i> | -227,9 | 20,4 | -223,5 | 16,8 | -181,8 [b] | 2,6 |
| Cod-eq- <i>trans</i> | -234,4 | 27,3 | -234,7 | 27,8 | -176,8 [a] | 2,1 |

[a] Valeur de V_{\min} localisée entre les oxygène furanique et méthoxy. [b] Valeur de V_{\min} localisée sur l'oxygène méthoxy.

Dans le Tableau IX, les valeurs moyennes de constantes d'équilibre \bar{K}_{calc} sur chaque site ont été calculées en prenant en compte la proportion relative des différents conformères, la constante totale étant calculée à partir de la somme des différentes constantes individuelles ainsi estimées (cf chapitre 2, II.1).

Comparaison des interactions de la galanthamine et de la codéine dans l'environnement de l'AChE et des nAChRs

Pour sonder les différences d'interactions entre les deux alcaloïdes et leurs cibles biologiques, nous nous sommes basés sur des structures cristallographiques de complexes de la galanthamine avec l'AChBP et l'AChE dans la mesure où aucune structure expérimentale n'est disponible dans la PDB dans le cas de la codéine. La Figure 17 montre la superposition de la galanthamine et de la codéine dans le site de l'AChE (entrée 1QTI de la PDB) sur les éléments du pharmacophore (atomes d'oxygène O₄, O₁₃ et O₁₅ et atome d'azote N₁₁). Les interactions de la codéine avec l'AChE apparaissent très similaires à celles de la galanthamine. Quelques interactions spécifiques avec des résidus de l'AChE semblent préservées à travers cette première approche de même que sont conservées les interactions par liaison H faisant intervenir des molécules d'eau jouant le rôle de relai.⁵⁶ Le groupe hydroxyle de la codéine est ainsi proche du carboxylate du Glu 199 et de la molécule d'eau W1 (Figure 17) elle-même impliquée dans un réseau d'interactions caractéristique faisant intervenir la Ser 200 et les groupes NH du squelette peptidique des résidus du trou oxyanionique (Gly 118 et 119).

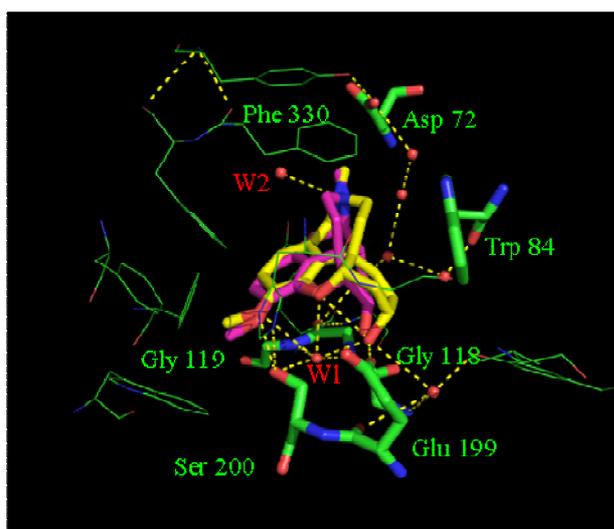


Figure 17- Représentation de la codéine et de la galanthamine dans le site de fixation de l'AChE (entrée 1QTI de la PDB).

Il est remarquable d'observer que comme pour la galanthamine, les atomes d'oxygène du groupe méthoxy (O₁₃) et du cycle furanique (O₄) sont bien positionnés pour participer à des

interactions par liaison H avec la même molécule d'eau. Cependant, un examen plus approfondi de l'environnement des deux alcaloïdes au voisinage de l'atome d'azote du cycle saturé semble mettre en évidence des différences significatives. Tout d'abord, contrairement à la galanthamine, l'azote de la codéine n'est pas correctement orienté pour l'interaction par liaison H avec la molécule d'eau (W2 sur la Figure 17) engagée dans une liaison H forte avec l'azote de la galanthamine ($d(N\cdots O) = 3,3 \text{ \AA}$).^{56, 57} Cette observation doit cependant être considérée avec précaution du fait de la mobilité des molécules d'eau dans les structures cristallographiques de protéines. Une autre différence, encore plus significative, concerne les atomes de C du cycle saturé de la codéine, puisqu'aucun d'entre eux n'apparaît proche du cycle pyrrole de l'indole du Trp84 (Figure 18). Cette observation est particulièrement remarquable dans la mesure où le Trp84 constitue la composante principale du sous-site "anionique" du site catalytique (CAS) de l'AChE,⁵⁸ du fait de son rôle dans la fixation des ligands (ACh, inhibiteurs) à travers des interactions de type cation- π entre le groupe ammonium quaternaire des ligands⁵⁹⁻⁶¹ et le noyau indole. De plus, la double liaison du cycle cyclohexène est trop éloignée (distance entre les centroïdes $\sim 5,8 \text{ \AA}$) pour être impliquée dans une interaction d'empilement π - π avec le Trp84, contrairement à ce qui est observé avec la galanthamine (distance entre les centroïdes $\sim 4,4 \text{ \AA}$). Par contre, aucune différence significative n'est à noter en ce qui concerne les distances entre les centroïdes des cycles saturés de la galanthamine ou de la codéine et le noyau aromatique de la Phe330, autre résidu important du CAS.

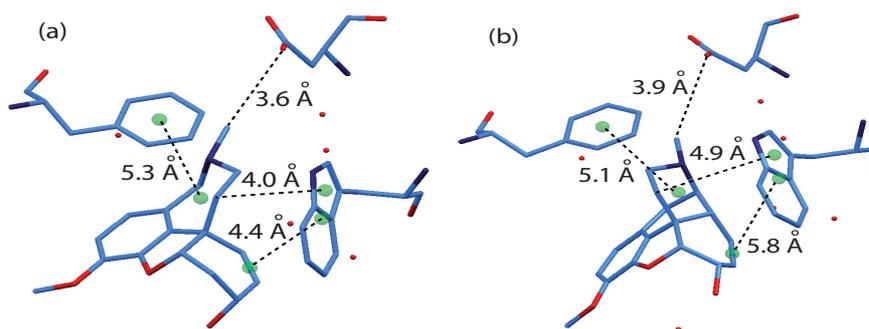


Figure 18- Interactions clés entre (a) la galanthamine, (b) la codéine avec des résidus sélectionnés du site de fixation de l'AChE (1QTI). Les distances entre les cycles sont indiquées par rapport à leurs centroïdes (sphères vertes sur la figure).

En utilisant la même méthode que précédemment, nous avons superposé la galanthamine et la codéine dans le site de fixation des agonistes de l'AChBP (Figure 19). *A contrario* des observations précédentes avec l'AChE, toutes les interactions avec l'environnement de la protéine apparaissent conservées pour les deux ligands, aussi bien pour les atomes d'oxygène que pour les atomes des cycles azotés saturés. Ainsi, l'hydroxyle phénolique de la Tyr188 est proche des oxygènes O₄, O₁₃ et O₁₅ et pourrait donc permettre

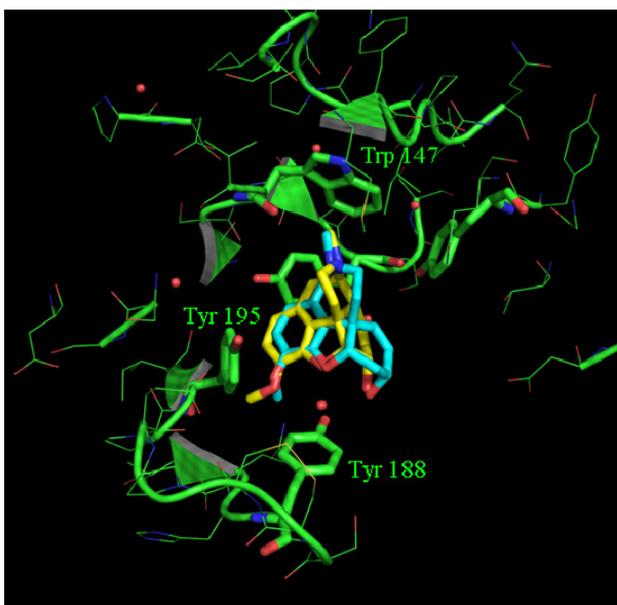


Figure 19- Représentation de la codéine et de la galanthamine dans le site de fixation de l'AChBP (entrée 2PH9 de la PDB).

des interactions par liaison H. Sur la Figure 20, qui compare les interactions clés entre les deux ligands et les résidus de l'AChBP, on peut remarquer qu'aucun des atomes d'azote des deux alcaloïdes n'est correctement positionné pour permettre la formation d'interactions par

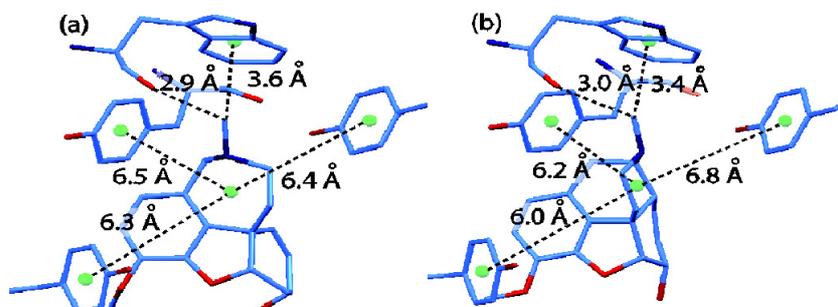


Figure 20- Interactions clés entre (a) la galanthamine, (b) la codéine avec des résidus sélectionnés du site de fixation de l'AChBP (2PH9). Les distances entre les cycles sont indiquées par rapport à leurs centroïdes (sphères vertes sur la figure).

liaison H avec le carbonyle du Trp 147. Cependant, cette interaction peut être remplacée pour chacun des ligands par une autre dans laquelle un groupe méthyle polarisé positivement joue ce rôle ($d(C_{19} \cdots O_{Trp147})$ de 2,87 et 2,99 Å, respectivement, pour la galanthamine et la codéine). De plus, le même groupement peut également être impliqué dans des interactions avec le nuage électronique du Trp 147 ($d(C_{19} \cdots Ce) = 3,62$ et 3,43 Å, respectivement pour la galanthamine et la codéine), l'existence de ces contacts remplissant la condition d'interaction cation- π indispensable pour la liaison des agonistes avec les nAChRs. Enfin, les distances entre les centroïdes des cycles azotés saturés de la galanthamine ou de la codéine avec le centroïde de la Tyr195 sont du même ordre de grandeur (valeurs respectives de 6,5 et de 6,2 Å).

Dans l'ensemble, cette analyse nous a permis de mettre en évidence des différences significatives en terme d'interactions de la galanthamine et de la codéine avec l'AChE, ces divergences pouvant en partie expliquer les disparités d'activité biologique des deux alcaloïdes vis-à-vis de cette enzyme. En ce qui concerne les interactions des deux ligands avec l'AChBP, notre étude structurale préliminaire n'indique pas de changements importants dans les interactions clés établies avec l'AChBP, une observation qui pourrait être à l'origine de l'activité de modulateur allostérique des deux composés.

V] Conclusion

Grâce à une approche conjuguant l'analyse et/ou la mise en œuvre de différentes méthodes expérimentales (spectroscopies IRTF et IRMPD, RMN, cristallographie des rayons X) dans différents environnements (phase gazeuse, solutions diluées, sites actifs de récepteurs biologiques) et la réalisation de calculs quantiques, les caractéristiques structurales et conformationnelles de même que des propriétés physicochimiques (sites de protonation, interactions par liaisons H) d'agonistes et de modulateurs allostériques des nAChRs ont été étudiées. Dans le cas de l'épibatidine, nous avons montré la coexistence des deux espèces protonées en phase gazeuse, l'espèce majoritaire correspondant à la forme protonée sur l'N sp^3 . Par ailleurs, l'influence d'interactions par liaison H intramoléculaire de type C-H...N sp^3 dans la prédilection de certaines conformations a été clairement démontrée. Dans le cas de l'ACh, nos travaux ont confirmé le caractère flexible de la molécule, des conformères significativement différents coexistant dans un faible domaine énergétique. Enfin, une étude originale approfondie basée sur la confrontation de résultats expérimentaux provenant de la mise en œuvre de différentes techniques et de données issues de calculs quantiques a mis en évidence les différences significatives en terme de propriétés

d'interactions par liaisons H de la galanthamine et de la codéine, deux ligands d'intérêt biologique présentant d'importantes similitudes.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que des approches physicochimiques expérimentales et théoriques permettent d'appréhender de façon très fine le comportement de ligands d'intérêt biologique, en apportant des informations quantitatives pertinentes pour rationaliser leur comportement biologique.

Références bibliographiques.

-
- 1) P. Jacob, N. L. Benowitz, J. R. Copeland, M. E. Risner and E. J. Cone, *J. Pharm. Sci.*, **77**, 396-400 (1988).
 - 2) V. Arnaud, *Thèse de doctorat, Université de Nantes* (2005).
 - 3) P. E. McBride, *Med. Clin. North Am.*, **76**, 333-53 (1992).
 - 4) I. P. Stolerman and M. J. Jarvis, *Psychopharmacology (Berlin)*, **117**, 2-10 (1995).
 - 5) D. E. Elmore and D. A. Dougherty, *J. Org. Chem.*, **65**, 742-747 (2000).
 - 6) J. Graton, M. Berthelot, J.-F. Gal, S. Girard, C. Laurence, J. Lebreton, J.-Y. Le Questel, P.-C. Maria and P. Naus, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10552-10562 (2002).
 - 7) M. Seydou, G. Gregoire, J. Liquier, J. Lemaire, J. P. Schermann and C. Desfrancois, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 4187-4195 (2008).
 - 8) M.-P. Gageot, A. Cimas, M. Seydou, J.-Y. Kim, S. Lee and J.-P. Schermann, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 18067-18077.
 - 9) J. F. Whidby and J. I. Seeman, *J. Org. Chem.*, **41**, 1585-90 (1976).
 - 10) T. P. Pitner, W. B. Edwards, III, R. L. Bassfield and J. F. Whidby, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 246-51 (1978).
 - 11) V. Arnaud, M. Berthelot, M. Evain, J. Graton and J.-Y. Le Questel, *Chem. Eur. J.*, **13**, 1499-1510 (2007).
 - 12) S. R. Fletcher, R. Baker, M. S. Chambers, R. H. Herbert, S. C. Hobbs, S. R. Thomas, H. M. Verrier, A. P. Watt and R. G. Ball, *J. Org. Chem.*, **59**, 1771-1778 (1994).
 - 13) N. Campillo, J. Antonio Paez, I. Alkorta and P. Goya, *J. Chem. Soc. [Perkin. 2]*, 2665-2670 (1998).
 - 14) Z. L. Wei, Y. X. Xiao, C. George, K. J. Kellar and A. P. Kozikowski, *Org. Biomol. Chem.*, **1**, 3878-3881 (2003).
 - 15) Z. L. Wei, C. George and A. P. Kozikowski, *Tetrahedron Lett.*, **44**, 3847-3850 (2003).

- 16) C. Hampel and H.-J. Werner, *J. Chem. Phys.*, **104**, 6286-97 (1996).
- 17) M. Schuetz, G. Rauhut and H.-J. Werner, *J. Phys. Chem. A*, **102**, 5997-6003 (1998).
- 18) J. M. Pedulla, F. Vila and K. D. Jordan, *J. Chem. Phys.*, **105**, 11091-11099 (1996).
- 19) F. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, **6**, 100-106 (2009).
- 20) A. Reyes, L. Fomina, L. Rumsh and S. Fomine, *Int. J. Quantum Chem.*, **104**, 335-341 (2005).
- 21) R. M. Balabin, *J. Chem. Phys.*, **132**, 231101-4.
- 22) G. Vistoli, A. Pedretti, L. Villa and B. Testa, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 7472-7480 (2002).
- 23) G. Vistoli, A. Pedretti, L. Villa and B. Testa, *J. Med. Chem.*, **48**, 1759-1767 (2004).
- 24) C. Munoz-Caro, A. Nino, M. Mora, S. Reyes, F. J. Melendez and M. E. Castro, *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, **726**, 115-124 (2005).
- 25) J. Song, M. S. Gordon, C. A. Deakyne and W. Zheng, *J. Phys. Chem. A*, **108**, 11419-11432 (2004).
- 26) V. Mahajan and R. L. Sass, *J. Chem. Crystallogr.*, **4**, 15-21 (1974).
- 27) J.-P. Behr and J.-M. Lehn, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1573-1579 (1972).
- 28) P. T. F. Williamson, J. A. Watts, G. H. Addona, K. W. Miller and A. Watts, *PNAS*, **98**, 2346-2351 (2001).
- 29) P. T. F. Williamson, A. Verhoeven, K. W. Miller, B. H. Meier and A. Watts, *PNAS*, **104**, 18031-18036 (2007).
- 30) M. D. Segall, M. C. Payne and R. N. Boyes, *Mol. Phys.*, **93**, 365-370 (1998).
- 31) A. Plaitakis and R. C. Duvoisin, *Clin. Neuropharmacol.*, **6** (1983).
- 32) D. S. Paskov, "In Handbook of experimental pharmacology," 1986.
- 33) V. M. Venturi, P. G. L. and T. I., *Boll. Soc. Biol. Sper.*, **41**, 593-597 (1965).

- 34) M. Heinrich and H. Lee Teoh, *Journal of Ethnopharmacology*, **92**, 147-162 (2004).
- 35) K. H. Le Quan Sang, M. Levacher and J. C. Thalabard, *Science & Sports*, **20**, 218-221 (2005).
- 36) J. Frost, A. Helland, I. S. Nordrum and L. Slirdal, *Forensic Science International*.
- 37) P. Carroll, G. T. Furst, S. Y. Han and M. Joullie, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 769-80 (1990).
- 38) S. Kone, N. Galland, J. Graton, B. Illien, C. Laurence, C. Guillou and J.-Y. Le Questel, *Chem. Phys.*, **328**, 307-317 (2006).
- 39) D. V. Canfield, J. Barrick and B. C. Giessen, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **C43**, 977-9 (1987).
- 40) S. Scheins, M. Messerschmidt, W. Morgenroth, C. Paulmann and P. Luger, *J. Phys. Chem. A*, **111**, 5499-5508 (2007).
- 41) R. W. Seidel, B. R. Bakalska, T. Kolev, D. Vassilev, H. Mayer-Figge, M. Spiteller, W. S. Sheldrick and B. B. Koleva, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **73**, 61-66 (2009).
- 42) C. Agache and V. I. Popa, *Monatsh. Chem.*, **137**, 55-68 (2006).
- 43) S. Jalili and M. Akhavan, *Theor. Chem. Acc.*, **118**, 947-957 (2007).
- 44) M. H. Abraham, P. L. Grellier, D. V. Prior, P. P. Duce, J. J. Morris and P. J. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 699-711 (1989).
- 45) C. Laurence, K. A. Brameld, J. Graton, J.-Y. Le Questel and E. Renault, *J. Med. Chem.*, **52**, 4073-4086 (2009).
- 46) J. B. Cross, D. C. Thompson, B. K. Rai, J. C. Baber, K. Y. Fan, Y. Hu and C. Humblet, *J. Chem. Inf. Model.*, **49**, 1455-1474 (2009).
- 47) J. T. Yi, J. W. Ribblett and D. W. Pratt, *J. Phys. Chem. A*, **109**, 9456-9464 (2005).
- 48) A. Locati, M. Berthelot, M. Evain, J. Lebreton, J.-Y. Le Questel, M. Mathe-Allainmat, A. Planchat, E. Renault and J. Graton, *J. Phys. Chem. A*, **111**, 6397-6405 (2007).
- 49) C. Laurence, M. Berthelot, M. Helbert and K. Sraidi, *J. Phys. Chem.*, **93**, 3799-802 (1989).

- 50) M. Berthelot, M. Helbert, C. Laurence and J. Y. Le Questel, *J. Phys. Org. Chem.*, **6**, 302-6 (1993).
- 51) J. Graton, M. Berthelot and C. Laurence, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2130-2135 (2001).
- 52) E. D. Raczynska, C. Laurence and M. Berthelot, *Can. J. Chem.*, **70**, 2203-8 (1992).
- 53) F. Besseau, C. Laurence and M. Berthelot, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **133**, 381-387 (1996).
- 54) M. Berthelot, C. Laurence, M. Safar and F. Besseau, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 283-290 (1998).
- 55) J. Graton, F. Besseau, M. Berthelot, E. D. Raczynska and C. Laurence, *Can. J. Chem.*, **80**, 1375-1385 (2002).
- 56) S. Kone, N. Galland, E.-H. S. Bamba and J.-Y. Le Questel, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **B64**, 338-347 (2008).
- 57) C. Bartolucci, E. Perola, C. Pilger, G. Fels and D. Lamba, *Proteins: Struct., Funct., Genet.*, **42**, 182-191 (2001).
- 58) I. Silman and J. L. Sussman, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **5**, 293-302 (2005).
- 59) J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker and I. Silman, *Science (New York, N.Y.)*, **253**, 872-9 (1991).
- 60) M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. H. Axelsen, I. Silman and J. L. Sussman, *PNAS*, **90**, 9031-5 (1993).
- 61) J.-P. Colletier, D. Fournier, M. Greenblatt Harry, J. Stojan, L. Sussman Joel, G. Zaccai, I. Silman and M. Weik, *The EMBO journal*, **25**, 2746-56 (2006).

Chapitre 4

Analyse structurale d'un motif caractéristique du site de fixation des ligands de l'AChBP

I] Analyse des structures cristallographiques d'AChBP contenues dans la PDB

I.1-Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, le Trp 143 de l'AChBP (sur la base de la numérotation de l'AChBP de *Lymnaea stagnalis*) est considéré comme jouant un rôle primordial dans l'interaction entre les nAChRs et les agonistes, notamment grâce à une interaction entre le groupe N-H⁺ de la nicotine et le carbonyle du Trp 143 suggérée par plusieurs études. De façon à appréhender les caractéristiques conformationnelles du site de fixation des agonistes, nous avons étudié, dans les formes libres et complexées de l'AChBP, la flexibilité conformationnelle d'acides aminés essentiels du site de fixation, comme le Trp 143. Nous avons également étudié en détail un réseau d'interactions par liaisons H jouant un rôle clé dans le processus de reconnaissance, ce réseau impliquant un résidu aspartate (Asp 85) apparaissant comme strictement conservé dans la famille des LGIC. Dans ce but, nous avons recensé les structures d'AChBP disponibles dans la PDB puis analysé les caractéristiques structurales d'une séquence d'acides aminés du site de fixation des agonistes impliquant le Trp 143 et l'Asp 85. En juillet 2012, la PDB contenait 65 structures d'AChBP, caractérisées par un facteur de résolution allant de 1,75 Å à 4,20 Å. Ces structures correspondent à des formes libres et complexées avec différents types de ligands de l'AChBP. Pour disposer d'un échantillon suffisamment grand et de données précises, seules les entrées possédant une résolution inférieure ou égale à 2,2 Å ont été sélectionnées.

Nous avons considéré trois sous-ensembles de structures selon la forme (libre ou complexée) et le type de ligand (agonistes/antagonistes compétitifs ou antagonistes non

compétitifs) cocrystallisés avec l'AChBP. En plus du Trp 143, ce modèle de départ se compose des résidus Ser 142, Thr144, His145 et Asp 85.

I.2-Conformation du tryptophane

L'application des critères de recherche évoqués plus haut s'est traduite par la considération d'un ensemble de 15 entrées issues de la PDB pour l'étude conformationnelle du tryptophane. Ces entrées ont un facteur de résolution allant de 1,75 à 2,2 Å. Onze d'entre elles correspondent à des AChBPs complexées à des agonistes ou des antagonistes compétitifs, trois à des formes libres, la dernière correspondant à un complexe avec un antagoniste non compétitif. L'ensemble de ces entrées, leur nom de code, le ligand éventuellement fixé et la résolution sont indiquées dans le Tableau I. Les valeurs de RMSD ont été calculées pour chaque entrée en considérant les 13 paires atomiques définies précédemment (cf. chapitre 2), en prenant comme structure de référence le site AB du pentamère ABCDE de la structure 2Y7Y. Pour le calcul, les cinq sites du pentamère ABCDE de chaque entrée ont été considérées, la valeur de RMSD présentée dans le tableau correspondant donc à la moyenne de cinq valeurs.

Tableau I- Liste des 15 entrées considérées pour l'analyse structurale avec leur code de référence et leur résolution. Le nom des ligands éventuellement fixé est également précisé. Les valeurs moyennes des RMSD sont également indiquées (voir texte).

| refcode | Résolution (Å) | ligand | Rôle | RMSD moyen |
|----------------|--------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|
| 1UW6 | 2,2 | nicotine | agoniste | 0,223 |
| 1UX2 | 2,2 | site libre | | 0,226 |
| | | hepes | | 0,244 |
| 2BJ0 | 2,2 | Site libre | | 0,169 |
| | | Acide 3-Cyclohexyl-1-Propylsulfonique | | 0,180 |
| 2BYS | 2,05 | lobeline | agoniste | 0,109 |
| 2PGZ | 1,76 | site libre | | 0,054 |
| | | <i>cocaïne</i> et tétraéthylène glycol | antagoniste compétitif | 0,056 |
| 3C84 | 1,94 | thiacloprid | agoniste | 0,139 |
| | | site libre | | 0,096 |
| 2WN9 | 1,75 | DMXBA | agoniste | 0,058 |
| 2WNC | 2,2 | tropisetron | agoniste | 0,119 |
| 2WNJ | 1,8 | DMXBA | agoniste | 0,088 |
| 2XYS | 1,91 | <i>strychnine</i> | antagoniste compétitif | 0,097 |
| | | sites libres | | 0,067 |
| 2XYT | 2,05 | <i>tubocurarine</i> | antagoniste compétitif | 0,074 |
| 2BYN | 2,02 | | | 0,094 |
| 2Y7Y | 1,89 | | | 0,072 |
| 2W8E | 1,89 | | | 0,068 |
| 2BYP | 2,07 | α -conotoxine | antagoniste non compétitif | 0,108 |

Les mesures des angles de torsion φ , ψ , χ_1 , χ_2 , ω_0 et ω_1 (Figure 2 et Tableau II) montrent que ces derniers possèdent des valeurs restant toujours dans les mêmes gammes. Le Tableau II regroupe les mesures de ces six angles ainsi que leurs écarts types en fonction des trois formes d'AChBP (apos, liées avec des agonistes/antagonistes non compétitifs ou liées avec des antagonistes) puis pour chaque forme, sur les sites liés, libres ou tous les sites. Pour φ et ψ , angles qui influent sur la conformation de la chaîne principale du Trp, les valeurs moyennes types oscillent entre 36° - 40° et 74° - 79° respectivement pour les formes apos et les formes liées avec des agonistes/antagonistes compétitifs quel que soit l'état des sites (occupés ou libres). Les faibles écarts types de ces mesures témoignent du peu de variation de conformation de la chaîne principale. Une légère déformation de la structure 2BYP est observée, avec des valeurs φ et ψ légèrement différentes des deux formes précédentes et égales à -33° et -85° respectivement. Dans un travail publié en 2006, Yurtsever et coll. ont étudié à l'aide de calculs quantiques les différentes conformations du tryptophane à l'état isolé et dans l'eau avec un modèle de type continuum, ainsi que les valeurs privilégiées des angles φ et ψ de cet acide aminé dans les protéines sur la base de l'analyse de données cristallographiques¹ (Figure 1). Les valeurs issues de notre travail pour les angles correspondants du Trp 143 dans l'AChBP apparaissent d'après la Figure 1 proches de conformations en hélices α . Cependant, cette observation peut être totalement fortuite et doit donc être considérée avec précaution dans la mesure où le Trp 143 appartient à une boucle, dont les caractéristiques structurales sont par définition variables.

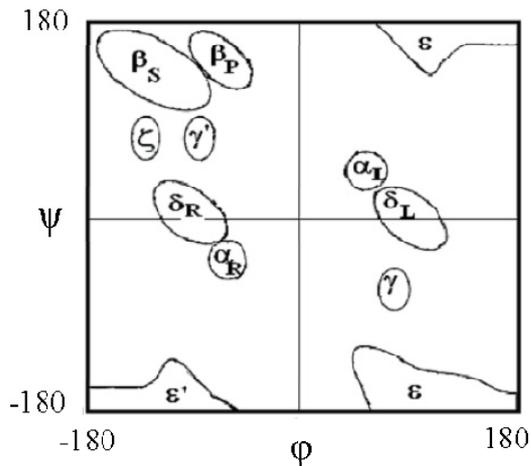


Figure 1- Diagramme de Ramachandran indiquant les 11 conformations des acides aminés couramment observées dans les protéines.^{1,2}

Les angles de torsion ω_0 et ω_1 décrivent la conformation des liaisons peptidiques de part et d'autre du Trp. Pour l'ensemble des formes d'ACHBP considérées, les valeurs sont comprises, ici aussi, dans de faibles intervalles (de l'ordre de 176° pour ω_0 , entre -174° et -169° pour ω_1) et proches de la valeur théorique de 180° pour ce type de liaison. La conformation de la chaîne latérale, caractérisée par χ_1 et χ_2 , apparaît peu influencée par la présence d'un ligand dans le site, les valeurs correspondantes se situant dans une gamme de 165 à 168° pour les formes apo et complexées avec des agonistes ou des antagonistes compétitifs. Par contre, pour la structure liée avec un antagoniste non compétitif, la valeur moyenne de χ_1 est légèrement plus faible, de 160° , sans que ce résultat soit significatif. En ce qui concerne l'angle χ_2 , les valeurs mesurées pour toutes les formes sont très proches, autour de 110° - 111° .

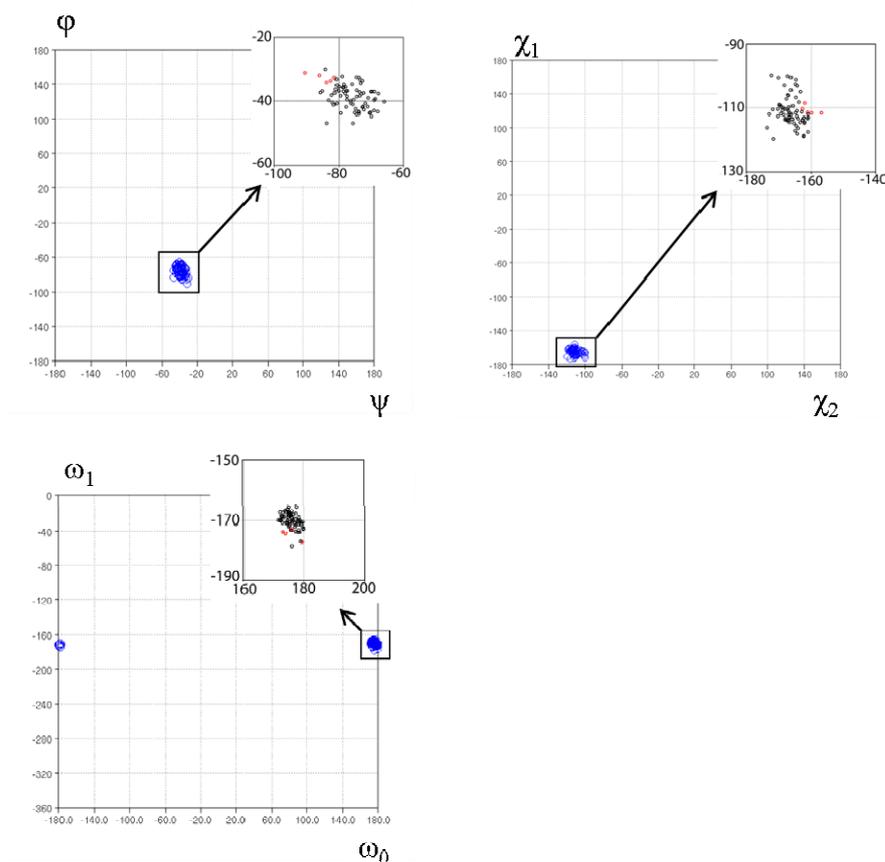


Figure 2- Distribution des angles de torsion (φ , ψ), (χ_1 , χ_2) et (ω_0 , ω_1) du Trp143 dans l'ensemble des structures d'AChBP analysées (avec en rouge les positions correspondant aux valeurs des angles de l'entrée 2BYP).

Tableau II- Valeurs des angles dièdres φ , ψ , χ_1 , χ_2 , ω_0 et ω_1 (en °) du Trp 143 pour les différentes formes d'AChBP. Les écarts type correspondants sont indiqués entre parenthèses.

| | φ | ψ | ω_0 | ω_1 | χ_1 | χ_2 |
|---|-----------|--------|------------|------------|----------|----------|
| AChBP liées à des agonistes ou des antagonistes compétitifs. | | | | | | |
| Sites libres | -37(2) | -75(4) | 176(3) | -170(2) | -165(3) | -111(3) |
| Sites occupés | -40(4) | -74(4) | 176(3) | -173(6) | -166(3) | -111(5) |
| Tous les sites | -39(4) | -75(4) | 176(3) | -172(6) | -166(3) | -111(5) |
| AChBP apo. | | | | | | |
| Tous les sites | -38(4) | -80(4) | 176(2) | -169(2) | -168(2) | -110(2) |
| AChBP liée à un antagoniste non compétitif. | | | | | | |
| Tous les sites | -33(1) | -85(4) | 176(2) | -174(2) | -160(2) | -111(1) |

On montre qu'une très faible variation conformationnelle est possible autour du Trp 143 pour toute forme d'AChBP.

I.3-Structure et interactions au niveau du site de fixation des agonistes et antagonistes compétitifs

Les études structurales par diffraction des rayons X et les approches issues de la mise en œuvre de méthodes chimiques et biologiques développées dans le groupe de Dougherty déjà évoquées dans les chapitres 1 et 2 ont montré que le résidu Trp 143 est situé au cœur d'un ensemble d'interactions impliquant en particulier un résidu aspartate (Asp 85).³ Les travaux de Cashin et coll. ont révélé que le groupe COO⁻ de la chaîne latérale de cet aspartate est impliqué dans un réseau de liaisons H qui « préorganiserait » le site de fixation des ligands en orientant le Trp 143 dans une conformation particulière.³ Quatre interactions, (Figure 3) respectivement numérotées de **1** à **4** dans le texte qui suit, et analysées par les distance entre atomes lourds correspondants d_1 à d_4 , ont ainsi été mises en évidence entre :

- le NH du squelette peptidique de la Thr 144 et l'oxygène 2 du carboxylate de l'Asp85 (**1**)
- le NH du squelette peptidique du Trp 143 et l'oxygène 2 du carboxylate de l'Asp85 (**2**)
- le OH de la chaîne latérale de la Ser 142 et l'oxygène 1 du carboxylate de l'Asp85 (**3**)
- le OH de la chaîne latérale de la Thr 144 et l'oxygène 1 du carboxylate de l'Asp85 (**4**).

Les travaux de Cashin et coll. ont montré que parmi ces interactions, seules **1** et **3** semblent importantes à la fonction biologique des nAChRs.³ En effet, certains nAChRs présentent un résidu valine à la place de la Thr 144, cette variation chimique se traduisant par la suppression de la liaison H **4** correspondante.

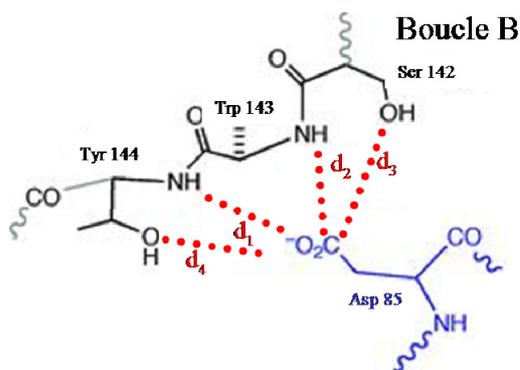


Figure 3- Représentation du réseau de liaisons H entre l'asp 85, appartenant à la boucle A (en bleu) et la séquence comprenant le Trp 143, provenant de la boucle B (en noir) de l'AChBP (d'après Cashin et coll.).³

Grâce à notre analyse structurale, nous avons réussi à mettre en évidence deux nouvelles liaisons H supplémentaires à l'intérieur de ce motif, numérotées **5** et **6** et respectivement caractérisées par les distances d_5 et d_6 . La première (**5**) correspond à une interaction entre le NH du squelette peptidique de l'His 145 et le groupe hydroxyle de la Ser 142. La seconde (**6**) implique l'oxygène de la fonction carbonyle de la chaîne peptidique de l'Asp 85 et le NH peptidique du Trp 143. La Figure 4a montre que la première interaction interviendrait en assurant la « fermeture » d'un motif structural présentant des caractéristiques proches d'un coude β , le groupe OH de la chaîne latérale de la Ser 142 jouant le rôle d'accepteur de liaison H au lieu du carbonyle peptidique comme dans les coudes classiques. La caractéristique commune à l'ensemble des coudes β (il en existe quatre types désignés par I, II, III et IV) est en effet la présence d'une liaison H impliquant le carbonyle du résidu i et le NH du squelette peptidique du résidu $i+3$, le motif résultant formant un cycle à 10 chaînons (Figure 4b). La majorité des coudes a été révélée par une analyse conformationnelle théorique menée par Venkatachalam en 1968.⁴ La distinction entre les coudes I, II et III repose sur la valeur des angles de torsion ϕ et ψ des résidus centraux ($i+1$ et $i+2$). Une discussion détaillée des caractéristiques conformationnelles des

coudes β dépassant le cadre de ce travail, nous comparerons simplement quelques paramètres de l'arrangement structural que nous avons mis en évidence à ceux propres aux coudes. Tout d'abord, le motif formé dans l'AChBP implique également quatre résidus au total, le groupe hydroxyle de la Ser 142 jouant le rôle d'accepteur à la place du groupe carbonyle. De plus, la participation de la chaîne latérale à la place du carbonyle de la chaîne principale se traduit par une augmentation du nombre de chaînons du motif formé (12 au lieu de 10). Il est important de préciser ici que la possibilité d'un tel motif, en particulier du rôle d'accepteur, et non de donneur, joué par l'hydroxyle 142, est liée à l'inambiguïté de l'implication du OH en tant que donneur de liaison H avec le carboxylate de l'Asp 85.

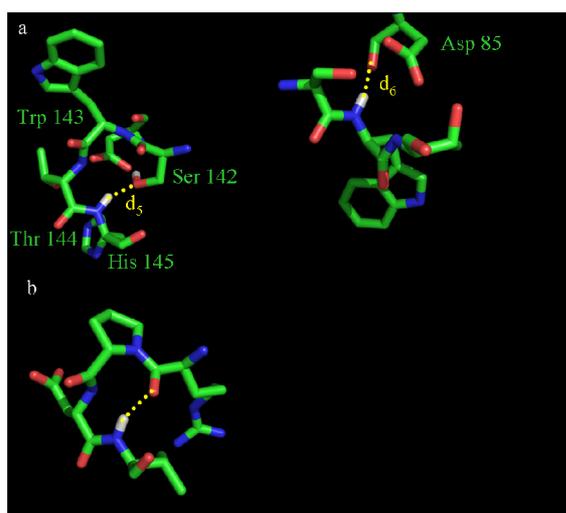


Figure 4- Nouvelles interactions mises en évidence dans le réseau de liaisons H (a) et exemple de coude β (b).

De nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'implication de groupes potentiellement donneurs et accepteurs de liaison H des chaînes latérales des acides aminés dans la formation de motifs pouvant apparaître importants dans la structure et la fonction des protéines.⁵⁻⁷ Ces études ont effectivement mis en évidence le rôle significatif pouvant être joué par des chaînes latérales d'acides aminés telles que l'acide aspartique ou l'asparagine dans la formation de motifs assurant la stabilisation locale de l'architecture.⁸ Dans ce

contexte, la participation des chaînes latérales des acides aminés hydroxylés comme la sérine et la thréonine ont également été mises en évidence.⁵ Cependant, le motif le plus fréquent rencontré avec les résidus Ser et Thr correspond à l'implication de la fonction OH de leur chaîne latérale en tant que donneur de liaison H, l'accepteur correspondant à un groupe carbonyle du squelette peptidique. Par ailleurs, une consultation de la base de données « pdbemotif » accessible sur la plateforme web de l'EBI (European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-site/pdbemotif/>)) montre que le cycle à 12 atomes est systématiquement présent dans les différentes structures d'AChBP. Ce motif impliquant la chaîne latérale de la sérine en tant qu'accepteur de liaison H, n'est pas représenté dans la galerie des motifs figurant sur le site. Enfin, l'utilisation de la base de données pdbsum (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum>)⁹ développée par le groupe de Thorton, indique une structure secondaire de type coude β pour la séquence Ser142-Trp143-Thr144-His145. Ces éléments montrent que l'arrangement que nous avons mis en évidence lors de notre analyse structurale constituerait un motif particulier propre à l'AChBP. Des analyses structurales complémentaires seraient utiles pour vérifier l'existence de ce motif dans les nAChRs et étudier le degré de conservation des acides aminés impliqués dans cet enchaînement. Nous verrons plus loin que l'existence de l'interaction NH(His145)⋯OH(Ser142) propre à l'arrangement établi joue un rôle significatif dans la cohésion de l'ensemble du réseau complexe de liaisons H existant dans l'AChBP.

La seconde liaison H suggérée par notre analyse (Figure 5) montre que le carbonyle de la chaîne principale de l'Asp 85 utilise également son potentiel accepteur dans ce réseau complexe de liaisons H.

Le Tableau III rassemble les distances entre atomes lourds impliqués dans les six interactions (1 à 6) précédentes ainsi que la distance entre le carbone β de la chaîne latérale

de l'Asp 85 et le C_α du Trp 143 (7, d₇). L'évolution de ce paramètre, sélectionné par Cashin et coll. a été étudiée lors de simulations de dynamique moléculaire sur les nAChRs.³

L'examen du Tableau III montre que d₃ est significativement et de façon systématique la distance la plus courte, de l'ordre de 2,6 Å, ce qui est cohérent avec l'importance de cette interaction dans le motif suggéré par Cashin et coll. Cependant, une telle considération peut être trompeuse dans la mesure où l'interaction 4, pourtant parfois inexistante dans certains nAChRs du fait du remplacement de la thréonine par une valine, apparaît d'après nos résultats comme la plus courte après l'interaction 3 avec une valeur de 2,7 Å. Quand elle est présente, cette interaction apparaît donc jouer un rôle dans une stabilisation plus importante du motif. L'interaction 5 que nous avons mise en évidence apparaît sur la base de ce critère également notable, dans la mesure où elle est inférieure à 3,0 Å, de l'ordre de 2,9 Å. Par ailleurs, l'interaction 1, considérée comme la plus importante avec 3 par Cashin et coll., présente une valeur de 3,1 Å. La seconde interaction que nous avons notée (6) possède quant à elle une valeur supérieure, de l'ordre de 3,3 Å. Enfin, nos résultats montrent que la distance d₇ retenue par Cashin et coll. possède une valeur située autour de 4,3-4,4 Å. Il est remarquable de noter que l'ensemble de ces paramètres géométriques reste centré autour des mêmes valeurs, quelque soit la forme, libre ou complexée de l'AChBP. Pourtant, une variation significative du paramètre d₇ a été observée lors de simulations de dynamique moléculaire par Cashin et coll., cette distance augmentant de 4,3 à 5,1 Å de la forme apo à la forme complexée à la carbamylcholine.³ Cette contradiction, manifeste sur d₇, peut paraître surprenante et les résultats de notre analyse « statique » sont donc à considérer avec précaution et doivent être confirmés par d'autres approches.

Tableau III- Valeurs moyennes des distances $d_{1,7}$ (en Å) ainsi que de leurs écarts types pour les différentes formes d'AChBP

| | d_1 | d_2 | d_3 | d_4 | d_5 | d_6 | d_7 |
|---|---------|---------|---------|----------|----------|---------|---------|
| AChBP liées à des agonistes ou des antagonistes compétitifs. | | | | | | | |
| Sites libres | 3,0 (1) | 3,0 (3) | 2,6 (1) | 2,59 (1) | 2,83 (5) | 3,3 (1) | 4,4 (1) |
| Sites occupés | 3,0 (1) | 3,0 (2) | 2,6 (1) | 2,71 (8) | 2,87 (3) | 3,3 (1) | 4,5 (1) |
| Tous les sites | 3,0 (1) | 3,1 (3) | 2,6 (1) | 2,69 (9) | 2,84 (5) | 3,3 (1) | 4,5 (1) |
| AChBP apo | | | | | | | |
| Tous les sites | 3,0 (1) | 2,9 (1) | 2,6 (1) | | 2,87 (7) | 3,2 (2) | 4,4 (1) |
| AChBP liée à un antagoniste non compétitif. | | | | | | | |
| Tous les sites | 3,1 (1) | 2,9 (1) | 2,6 (1) | | 2,94 (5) | 3,4 (2) | 4,3 (1) |

II] Calculs de chimie quantique

II.1-Modèles successifs considérés

Pour affiner les paramètres géométriques correspondant aux différentes interactions mesurées dans les structures cristallographiques étudiées précédemment et pour mettre en évidence leurs importances relatives dans l'architecture du motif, nous avons « extrait » l'ensemble des cinq acides aminés de l'environnement du récepteur et étudié des systèmes modèles de complexité croissante. Pour des raisons de temps de calcul, du fait du niveau de théorie sélectionné (MPWB1K/6-31+G(d,p)), nous avons procédé à quelques simplifications chimiques de certains résidus. Ainsi, pour l'ensemble des systèmes considérés, l'Asp 85

modélisé comprend la chaîne latérale et l'extrémité CO terminale complétée par un groupe NHMe. De la même façon, pour les autres résidus, seul le fragment impliqué dans les interactions du motif a été considéré. Ainsi, pour la Ser 142, l'extrémité N-terminale, n'a pas été intégrée. Pour les mêmes raisons, la chaîne latérale de la Thr 144 n'a pas été incluse dans tous les modèles. De même, pour l'His 145, seule l'extrémité N-terminale, complétée par le C α , a été considérée. Au total, cinq modèles comprenant deux à cinq résidus ont été étudiés.

Pour chacun d'entre eux, la coupure entre deux acides aminés a été complétée par une fonction N-acétyl afin de restituer les caractéristiques structurales et électroniques de la fonction amide. Ces cinq modèles sont représentés Figure 5.

Le modèle le plus simple considéré (**A**), constitué de deux résidus ne comprend que l'Asp 85 et le Trp 143. Le modèle **B** comporte trois résidus, puisqu'il possède en plus, le fragment Thr 144. Le modèle **C** correspond au modèle **A** auquel la Ser 142 a été ajoutée. Le quatrième, qui compte cinq résidus, (**D**) est constitué de **A**, du fragment de la Ser 142, de la chaîne principale de la Thr 144 et enfin de l'extrémité N-terminale de l'His 145. Le dernier modèle (**E**) correspond à **D** auquel la chaîne latérale de Thr 144 a été additionnée.

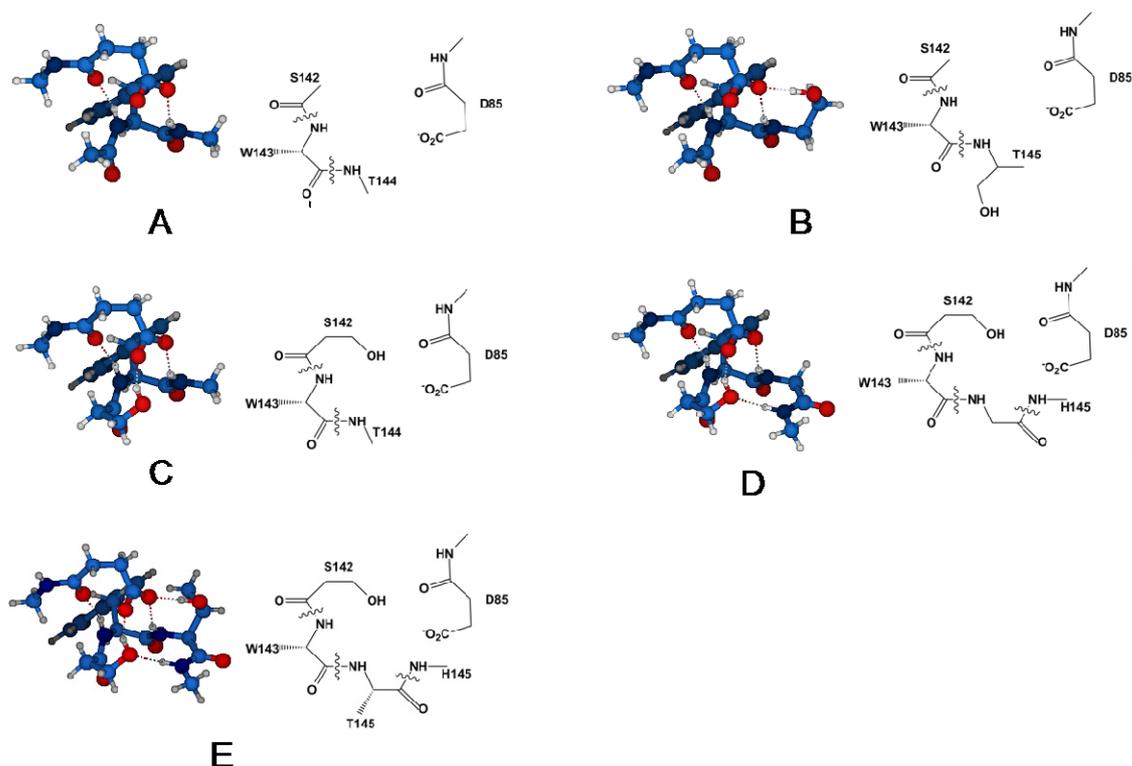


Figure 5- Représentation des cinq modèles successifs du motif structural analysé.

II.2-Résultats/discussion

La composition chimique des différents modèles établie, leur géométrie a été totalement optimisée (MPWB1K/6-31+G(d,p)) et comparée à travers des superpositions au motif « extrait » d'une structure cristalline de référence (2Y7Y). Ces superpositions ont été effectuées en considérant un nombre de paires atomiques croissant, schématisées sur la Figure 6. Dans une première étape, seuls les atomes de la chaîne principale ont été utilisés (9 paires atomiques, RMSD1). Dans la seconde, les atomes de la chaîne latérale du Trp 143 ont été additionnés (19 paires atomiques, RMSD2). Dans la dernière, le fragment Asp 85 a été intégré à l'ensemble (26 paires atomiques, RMSD3). Le Tableau IV rassemble les valeurs de RMSD obtenues lors de ces différentes étapes pour l'ensemble des modèles.

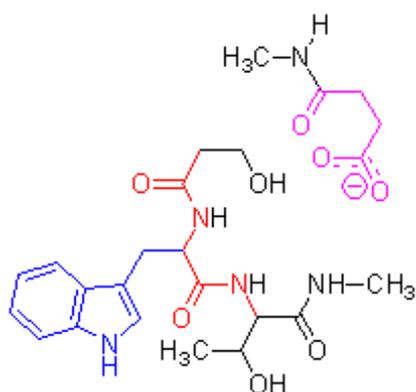


Figure 6- Définition des atomes intégrés pour le calcul des RMSD relatifs aux trois étapes de superpositions moléculaires (— RMSD1, —+— RMSD2, —+—+— RMSD3).

Tableau IV-Valeurs des RMSD obtenues lors des différentes étapes de superpositions des cinq modèles (Figure 6).

| Modèle | RMSD 1 | RMSD 2 | RMSD 3 |
|--------|--------|--------|--------|
| A | 0,1 | 1,4 | 1,7 |
| B | 0,2 | 1,2 | 1,6 |
| C | 0,2 | 0,4 | 0,6 |
| D | 0,05 | 0,3 | 0,5 |
| E | 0,05 | 1,4 | 1,5 |

Le nombre de liaisons H caractéristiques de chaque modèle après l'optimisation de géométrie a ensuite été comparé à celui observé dans la structure cristalline de référence en ne considérant que les atomes homologues. En effet lors du processus d'optimisation de géométrie, des réorganisations structurales significatives peuvent s'opérer, induisant la modification du nombre d'interactions initiales. Le Tableau V rassemble ces données et la Figure 7 montre la structure des cinq modèles, superposés sur la structure cristalline de référence.

Tableau V- Evolution du nombre de liaisons H dans les différents modèles lors de l'optimisation de géométrie (O interaction conservée, x: interactions non présentes et x interactions absentes de la structure optimisée alors que présente dans la structures cristalline équivalente)

| Liaison H | A | B | C | D | E |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|
| OH _{Ser} ...CO _{Asp} | x | x | O | O | O |
| NH _{Trp} ...CO _{Asp} | O | O | O | O | O |
| NH _{Thr} ...CO _{Asp} | O | O | O | O | O |
| OH _{Thr} ...CO _{Asp} | x | O | x | x | O |
| NH _{His} ...OH _{Ser} | x | x | x | O | O |
| NH _{Trp} ...CO _{Asp} | x | x | O | O | O |
| N_f/N_{exp}^a | 2/3 | 3/4 | 4/4 | 5/5 | 6/6 |

^a: Rapport entre le nombre de liaisons H final (N_f), après optimisation de géométrie sur le nombre de liaisons H observées dans la structure cristallographique en considérant les atomes homologues (N_{exp}).

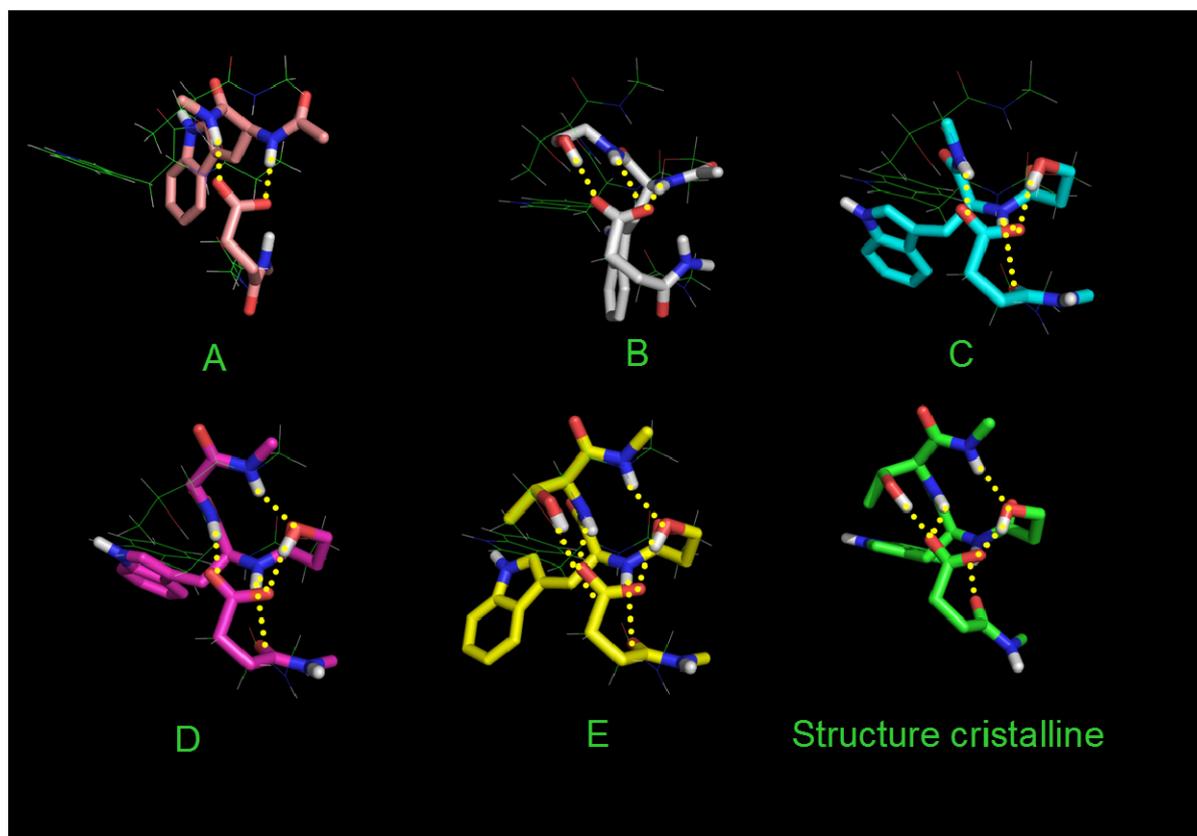


Figure 7-Représentation de la structure cristalline et des cinq modèles optimisés superposés avec la structure cristalline (en vert et fil de fer).

Dans une dernière phase, les distances interatomiques d_1 - d_7 définies et étudiées précédemment pour le meilleur modèle obtenu (**D**) ont été comparées au motif expérimental de référence. Pour cette analyse, seules les valeurs de d_1 - d_7 des formes apo d'AChBP ont été considérées. Le Tableau VI rassemble ces données.

Tableau VI- Valeurs des distances $d_{1,3}$ et $d_{5,7}$ du modèle théorique **D** et de la structure expérimentale 2Y7Y.

| Distance (Å) | d_1 | d_2 | d_3 | d_5 | d_6 | d_7 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Théorie | 2,8 | 3,3 | 2,7 | 2,9 | 3,2 | 4,1 |
| Expérience | 3,0 | 2,9 | 2,6 | 2,8 | 3,3 | 4,4 |

L'analyse des différents RMSD du Tableau IV montre tout d'abord, de façon attendue, une augmentation régulière des valeurs avec l'augmentation du nombre de paires atomiques superposées. Les très faibles valeurs de RMSD1 montrent que la conformation de la chaîne principale n'est pratiquement pas modifiée lors de l'optimisation à l'état isolé et ceci pour l'ensemble des modèles. La prise en compte de la chaîne latérale du Trp lors du calcul du RMSD2 se traduit par des différences significatives en fonction des modèles. Ainsi, seuls **C** et **D** conservent une conformation proche de la structure expérimentale, la Figure 7 montrant une rotation notable du noyau indole dans les modèles **A**, **B** et **E**. Les mêmes tendances sont observées avec le calcul prenant en compte l'ensemble des paires atomiques (RMSD3). A notre surprise, le modèle **D** s'avère donc celui qui reste le plus proche du motif expérimental, bien qu'une liaison H ait été supprimée.

En cohérence avec ces évolutions, l'examen du Tableau V et de la Figure 7 montrent que les modèles **A** et **B** « perdent » une des liaisons H, les autres modèles les conservant toutes. En fait, une rotation de l'extrémité C terminale de l'Asp 85 dans les modèles **A** et **B** est à l'origine de la rupture de la liaison H dans laquelle le groupe carbonyle est engagé initialement avec le NH du Trp (Figure 7).

Bien que le modèle **D** ne possède pas la chaîne latérale du résidu 144, il conduit à la structure finale la plus proche de la structure expérimentale. Ces résultats sont à considérer avec précaution au vu des changements significatifs d'environnement et des simplifications effectuées mais semblent cohérents avec la moindre importance de cette interaction (4) dans le motif, comme l'ont suggéré Cashin et coll.³ et la conservation plus faible de ce résidu (la Thr est parfois remplacée par une valine).

Enfin, la comparaison des distances d_1 - d_7 mesurées dans la structure optimisée et la structure cristallographique de référence (Tableau VI) montre une tendance dans l'ensemble cohérente avec les données précédentes. Ainsi, les interactions qualifiées d'« essentielles » par Dougherty, caractérisées par les distances d_1 et d_3 , ont été respectivement raccourcies (de 0,2 Å) et rallongées mais de façon peu significative (de 0,1 Å) lors de l'optimisation de géométrie. De façon concomitante, la distance d_2 apparaissant comme secondaire montre sur la base de nos calculs une tendance à l'allongement (0,4 Å), en cohérence avec une moindre importance. Par ailleurs, la distance d_5 , propre à l'arrangement que nous avons mis en évidence, bien que rallongée (0,1 Å) reste l'une des plus courtes de l'ensemble, ce qui paraît indiquer un rôle notable dans le maintien du motif. Toutefois, la distance d_6 , raccourcie lors de l'optimisation, demeure également l'une des plus faibles du réseau, une observation en faveur d'une contribution secondaire de cette interaction. Enfin, on peut noter que la distance

d_7 évolue également de façon notable, puisqu'elle est raccourcie de 0,3 Å lors de la relaxation géométrique.

II.3-Influence de l'interaction $\text{NH}_{\text{his}} \cdots \text{OH}_{\text{ser}}$

La liaison H présente plusieurs propriétés intrinsèques expliquant en partie l'absence de données quantitatives faisant encore défaut aujourd'hui et la difficulté de la mise au point d'approches prédictives applicables à l'ensemble des situations, environnements dans lesquelles l'interaction peut être rencontrée. Dans un environnement condensé tel qu'une solution ou la poche de fixation d'un récepteur biologique, les groupes en contact sont souvent engagés dans des interactions multicentriques (le plus souvent à 3 centres) et/ou multiples. Ces propriétés sont à l'origine des effets de coopérativité et de non-additivité propres à l'interaction.¹⁰⁻¹⁴ Leur influence sur la structure et l'énergie des différentes interactions considérées individuellement peut être très importante. Le motif considéré dans ce travail constitue un exemple de ce type de situations. En effet, l'existence de l'interaction $\text{NH}_{\text{His145}} \cdots \text{OH}_{\text{Ser142}}$ (5) que nous avons mise en évidence dans l'analyse des données cristallographiques décrite précédemment doit présenter des répercussions sur l'interaction $\text{OH}_{\text{Ser142}} \cdots \text{OOC}_{\text{Asp 85}}$ (3) considérée comme l'une des plus importantes du réseau formé. Dans ce paragraphe, nous présentons la démarche que nous avons utilisée pour mettre en évidence cet effet coopératif et les résultats obtenus.

Afin d'étudier l'influence de la présence de l'interaction $\text{NH}(\text{His 145}) \cdots \text{OH}(\text{Ser 142})$ sur le pouvoir donneur de liaison H du groupe hydroxyle de la Ser, nous avons mis en œuvre des calculs théoriques au même niveau que précédemment (MPWB1K/6-31+G(d,p)) sur des structures modifiées du modèle **D**. Ces structures ont été obtenues en supprimant l'aspartate

et en remplaçant certaines fonctions peptidiques par des fonctions esters dans le but de supprimer le potentiel donneur de liaison H des NH peptidiques. Nous avons sélectionné cette approche sur la base des travaux de Dougherty, qui utilise, à travers des techniques de biologie moléculaire, ce type de modifications chimiques au niveau des nAChRs, pour sonder l'importance structurale et fonctionnelle de certains acides aminés.¹⁵⁻¹⁷ Nous avons sélectionné trois types de systèmes modèles pour nos simulations dans le contexte de cette étude. Pour l'ensemble d'entre eux, qui découlent du modèle **D** précédent, le fragment aspartate a été supprimé. Le premier, nommé **D'**, correspond simplement à **D** sans l'aspartate. En ce qui concerne le deuxième, **D'O**, la liaison amide entre l'His 145 et la Thr 144 a été remplacée par une liaison ester. Dans le troisième, **D'OO**, la liaison peptidique entre les résidus Trp 143 et Thr 144 a en plus été substituée par une liaison ester (Figure 8). Une série de calculs avec et sans optimisation de géométrie a été effectuée sur ces trois systèmes. Dans une deuxième phase, nous avons utilisé le potentiel électrostatique calculé à la surface moléculaire, définie par une surface de densité électronique de $0,001 \text{ e/Bohr}^3$, pour étudier l'éventuelle influence de l'effet coopératif sur le pouvoir donneur de liaison H de l'hydroxyle. Ce descripteur paraît particulièrement adapté pour ce type d'études, de nombreux travaux ayant montré son intérêt pour rationaliser et prédire le pouvoir accepteur et/ou donneur de liaison H de composés organiques.¹⁸⁻²¹ Nous avons suivi, pour les différents modèles, l'évolution de la valeur maximale du potentiel électrostatique ($V_{s,\max}$) au voisinage de l'atome d'H de l'hydroxyle, cette grandeur ayant été utilisée avec succès pour caractériser le potentiel donneur de liaison H de différentes fonctionnalités organiques.^{20, 21}

Les optimisations de géométrie se sont traduites par un réarrangement du réseau de liaisons H dans les trois systèmes. Ainsi pour **D'**, l'interaction $\text{NH}_{\text{his}} \cdots \text{O}_{\text{ser}}$ est perdue au profit d'une interaction du NH_{his} avec le carbonyle de la Ser. Cependant, dans la structure

obtenue, le potentiel accepteur de liaison H de la fonction hydroxyle de la sérine reste exploité, mais dans une interaction par liaison H avec le NH du squelette peptidique de la thréonine 144. (Figure 8). Pour le second modèle (**D'O**), le remplacement de la liaison amide entre les résidus His et Thr par une liaison ester empêche l'interaction $\text{NH}_{\text{his}} \cdots \text{OH}_{\text{ser}}$ mais, comme pour le modèle précédent, le NH de la Thr se lie avec l'hydroxyle de la Ser dans la structure optimisée. Enfin, pour **D'OO**, la substitution des deux liaisons peptidiques par des liaisons esters entre les résidus Trp et Thr d'une part, et Thr et His, d'autre part, ne voit l'apparition d'aucune nouvelle interaction (Figure 8).

Ces calculs montrent donc tout d'abord le rôle majeur exercé par le groupe carboxylate de l'Asp 85 dans la structuration du motif, de profondes réorganisations se produisant lors de la suppression de ce fragment. L'analyse des valeurs de $V_{s,\text{max}}$ sur les structures optimisées montre des évolutions significatives mais s'avère délicate à interpréter au vu des changements importants de géométrie. Il est toutefois remarquable de constater que malgré ces changements, le potentiel accepteur de liaison H de l'hydroxyle demeure exploité dans deux des structures. En fait, la seule structure dans laquelle l'hydroxyle ne se comporte pas en tant qu'accepteur correspond au modèle (**D'OO**), pour lequel aucun donneur de liaison H n'est suffisamment proche pour permettre une telle interaction. La comparaison des valeurs de $V_{s,\text{max}}$ au niveau de l'H de l'hydroxyle entre les modèles (**D'O**) et (**D'OO**) montre bien une diminution significative de l'ordre de 20 kJ mol^{-1} (valeurs respectives de $267,1$ et $247,4 \text{ kJ mol}^{-1}$), attestant de l'augmentation du potentiel donneur de liaison du OH lorsqu'il participe déjà à une interaction en tant qu'accepteur. Cette évolution constitue donc une manifestation de l'effet coopératif. La comparaison des structures optimisées **D'** et **D'O** ne permet pas de dégager une telle tendance du fait (i) de l'implication du OH en tant qu'accepteur dans les deux structures (ii) de l'orientation vers une zone riche

en électrons du OH, qui explique la valeur faible de $V_{s,max}$ (213,1 kJ mol⁻¹) obtenue. Sur la base des distances de liaison H impliquant l'hydroxyle de la sérine dans ces deux structures: NH(Thr 144)···O(H)Ser 142 et NH(His 145)···O(H)Ser 142), de 2,16 et 2,02 Å, l'interaction initiale avec le NH de l'histidine semble plus forte.

L'analyse des résultats obtenus sur les structures non optimisées révèle également des tendances intéressantes. Ainsi, on observe une diminution significative, de l'ordre de 40 kJ mol⁻¹, de la valeur de $V_{s,max}$ sur l'hydroxyle consécutive à la suppression de la liaison H NH(His145)···O(H)Ser 142 en passant de **D'** à **D'O** (valeurs respectives de 289,4 et 246,9 kJ mol⁻¹), attribuable à l'effet coopératif. Toutefois, une évolution significative est de nouveau observée (abaissement de $V_{s,max}$ de l'ordre de 30 kJ mol⁻¹) lors de la substitution du NH peptidique entre les résidus Thr et His, la valeur obtenue pour **D'OO** étant de 216,6 kJ mol⁻¹, sans que cet effet puisse être attribué à l'existence d'une interaction (distance NH(Thr)···O(H)Ser142 de 3,17 Å. Si cette dernière observation montre une sensibilité importante de $V_{s,max}$ à l'environnement chimique et électronique, nos résultats théoriques témoignent indiscutablement, de façon qualitative, de l'effet coopératif exercé par la présence d'une interaction par liaison H sur le potentiel donneur de l'hydroxyle 142.

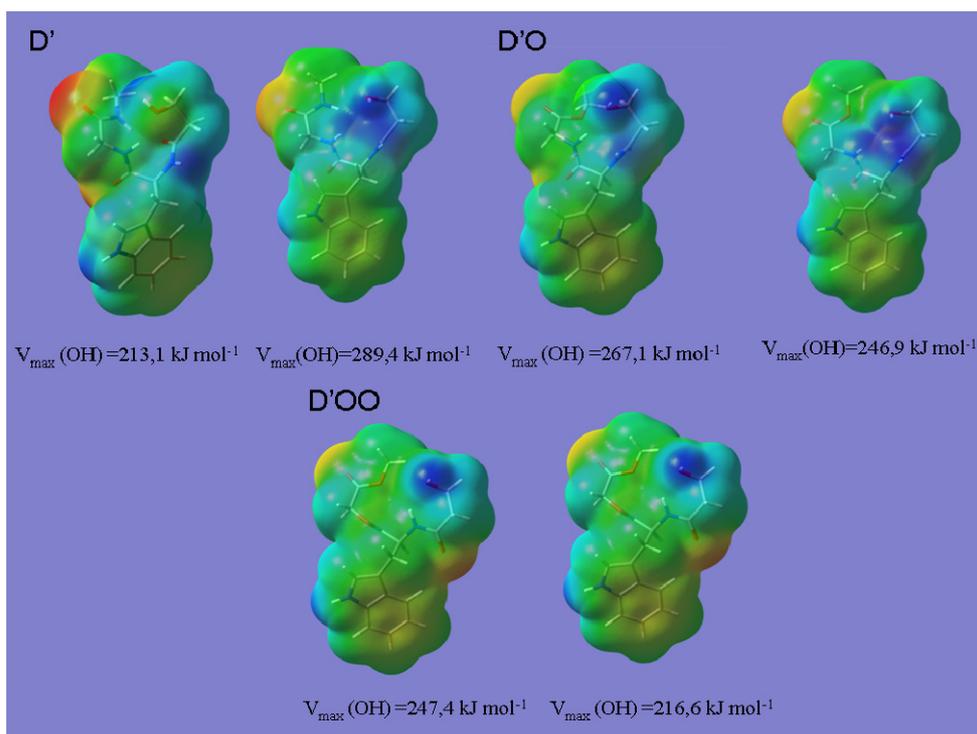


Figure 8- Carte de potentiels électrostatiques calculés à la surface moléculaire (MPWB1K/6-31+G(d,p)) indiquant les valeurs de $V_{s,\max}$ sur l'hydrogène hydroxyle de la Ser 142 (une des zones les plus déficientes en électrons, représentées en bleu) pour les modèles (D'), (D'O) et (D'OO). Pour chaque modèle, les structures de gauche et de droite correspondent aux géométries optimisées et non optimisées, respectivement.

III] Conclusion

L'approche conjointe mise en œuvre dans le cadre de ce chapitre, fondée d'une part sur l'analyse structurale de données cristallographiques et d'autre part, sur l'exploitation de calculs de chimie quantique, a révélé de nouvelles informations sur l'arrangement tridimensionnel et les interactions par liaison H établies au niveau d'un motif impliqué dans le site actif de l'AChBP.

Tout d'abord, ces données ont mis en évidence la grande conservation de la conformation du Trp 143, quelle que soit la forme, libre ou complexée, de l'AChBP. Ce comportement paraît également suivi quelle que soit la nature du ligand (agoniste,

antagoniste compétitif et non compétitif). Dans ce dernier cas, cette tendance est toutefois à prendre avec précaution, une seule entrée ayant été recensée lors de notre étude.

En second lieu, ces études nous ont conduit à démontrer l'implication de deux liaisons H supplémentaires dans le réseau complexe de liaison H impliqué dans l'architecture du site de fixation des agonistes mis au jour par Dougherty. L'une d'entre elles paraît particulièrement notable, puisqu'elle induit la formation d'un motif original de caractéristiques structurales proches d'un coude β faisant intervenir en tant qu'accepteur de liaison H un groupe hydroxyle de la chaîne latérale d'une sérine.

Enfin, la confrontation des résultats issus des différentes approches a mis en lumière l'influence significative d'un effet coopératif se traduisant par l'augmentation du pouvoir donneur de liaison H de la chaîne latérale de la sérine, puisque le même groupe OH est engagé dans une liaison H en tant que donneur avec le groupe carboxylate de l'Asp 85.

Dans l'ensemble, les résultats présentés dans ce chapitre nous paraissent démontrer l'intérêt de l'utilisation conjointe des approches mises en œuvre pour mettre évidence, au niveau atomique, des informations pertinentes pour une caractérisation approfondie de propriétés de l'AChBP, et par extension des nAChRs, et donc une meilleure appréhension de leur comportement. Cependant, des études complémentaires doivent être poursuivies pour vérifier ces tendances au niveau des nAChRs.

Références bibliographiques.

-
- 1) E. Yurtsever, D. Yuret and B. Erman, *J. Phys. Chem. A*, **110**, 13933-13938 (2006).
 - 2) L. Stryer, "Biochemistry," W. H. Freeman and company, New York, ed. third edition, 1988.
 - 3) A. L. Cashin, M. M. Torrice, K. A. McMenimen, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *Biochemistry*, **46**, 630-639 (2007).
 - 4) C. M. Venkatachalam, *Biopolymers*, **6**, 1425-1436 (1968).
 - 5) N. Eswar and C. Ramakrishnan, *Protein Eng.*, **12**, 447-455 (1999).
 - 6) J. S. Richardson and J. T. E. a. F. M. R. C.B. Anfinsen (1981) *The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure*, vol. Volume 34, Academic Press, pp. 167-339.
 - 7) J. S. Richardson and D. C. Richardson, "Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation," Plenum Press, New York, 1989.
 - 8) D. C. Rees, M. Lewis and W. N. Lipscomb, *J. Mol. Biol.*, **168**, 367-387 (1983).
 - 9) R. A. Laskowski, E. G. Hutchinson, A. D. Michie, A. C. Wallace, M. L. Jones and J. M. Thornton, *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 488-490 (1997).
 - 10) T. Steiner, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 48-76 (2002).
 - 11) T. Steiner and G. R. Desiraju, *Chem. Commun. (Cambridge)* 891-892 (1998).
 - 12) C. A. Hunter, N. Ihekweba, M. C. Misuraca, M. D. Segarra-Maset and S. M. Turega, *Chem. Commun.*, 3964-3966 (2009).
 - 13) B. K. Saha and A. Nangia, *Cryst. Growth Des.*, **7**, 393-401 (2007).
 - 14) M. A. Varfolomeev, D. I. Abaidullina, A. Z. Gainutdinova and B. N. Solomonov, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, **77**, 965-972.
 - 15) A. P. Blum, K. R. Gleitsman, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *J. Biol. Chem.*, **286**, 32251-32258 (2011).

- 16) N. L. Puskar, X. Xiu, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *J. Biol. Chem.*, **286**, 29442-29442.
- 17) A. L. Cashin, E. J. Petersson, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 350-356 (2005).
- 18) H. Hagelin, J. S. Murray, T. Brinck, M. Berthelot and P. Politzer, *Can. J. Chem.*, **73**, 483-8 (1995).
- 19) T. Brinck, *Comp. Theor. Chem.*, **5**, 51-93 (1998).
- 20) P. W. Kenny, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 199-202 (1994).
- 21) P. W. Kenny, *J. Chem. Inf. Model.*, **49**, 1234-1244 (2009).

Chapitre 5

**Etude des interactions de
quelques agonistes des nAChRs
dans l'environnement
du site actif de l'AChBP**

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats théoriques obtenus à partir de la mise en oeuvre de calculs ONIOM2 (MPWB1K/6-31+G(d,p) : MPWB1K/3-21G). Cette étude porte sur la complexation de trois agonistes des nAChRs (acétylcholine, nicotine et épibatidine) avec le modèle du site actif de l'AChBP constitué selon la démarche présentée au chapitre 2. Dans une première partie, l'influence de la conformation et de l'orientation des ligands, de même que de la présence d'une molécule d'eau dans le site de reconnaissance de l'AChBP, est exposée. Puis, dans un deuxième temps, les complexes les plus stables issus des études théoriques pour les trois ligands sélectionnés sont comparés, aussi bien sur un plan structural qu'énergétique.

I] Structure de quelques complexes agonistes-AChBP

I.1- Complexe nicotine-AChBP

Rappelons que les deux conformères principaux, A et B, de la nicotine protonée (Figure 1) ont été considérés pour cette étude. Comme nous l'avons évoqué précédemment (chapitre 3.I), ces isomères de conformation ne diffèrent que par une rotation de l'ordre de 180° autour de la liaison intercycle. Dans la structure cristallographique du complexe, seul le conformère B de la nicotine est présent. L'influence de la conformation du cycle pyridinique sur la structure et l'énergie du complexe a été considérée en générant manuellement le conformère A dans le site à partir de la position de départ de la nicotine B dans la structure expérimentale grâce à une rotation de 180° autour de la liaison intercycle. La molécule d'eau présente dans la structure 1UW6,¹ a été laissée à sa position cristallographique, au départ de l'optimisation de géométrie de ces deux complexes. Les Figures 2 et 3 montrent les résultats

obtenus pour ces deux structures et les Tableaux I et II rassemblent les données énergétiques et structurales correspondantes, respectivement.

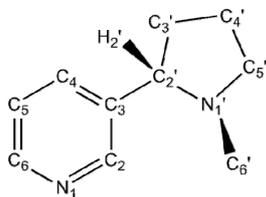


Figure 1- Structure chimique et numérotation de la (S)-nicotine.

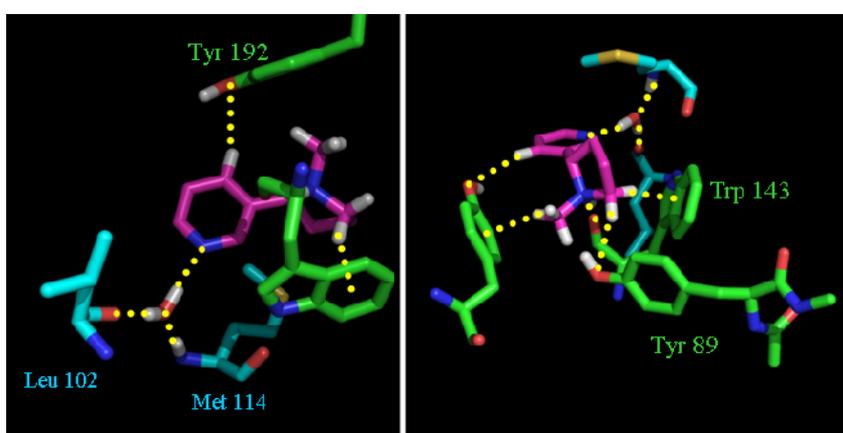


Figure 2- Structure optimisée du modèle du complexe de l'AChBP avec la nicotine B (en vert et bleu : parties principale et complémentaire du site, et en violet la nicotine; les liaisons H sont représentées par des pointillés).

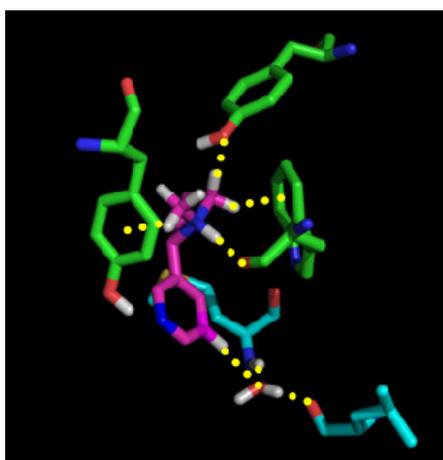


Figure 3- Structure optimisée du modèle du complexe de l'AChBP avec la nicotine A (en vert et bleu : parties principale et complémentaire du site, la partie et en violet la nicotine ; les liaisons H sont représentées par des pointillés).

Tableau I- Variation des énergies (en kJ mol^{-1}) de complexation (ΔE_{cpx}), de fixation (ΔE_{fix}) et de relaxation du ligand ΔE_{rel} (L) et du modèle de site ΔE_{rel} (MS) pour les différents complexes optimisés avec la nicotine.

| Système | ΔE_{cpx} | ΔE_{fix} | ΔE_{rel} (L) | ΔE_{rel} (MS) |
|-------------------------------|---|---|---|--|
| Nicotine A | -287,8 | -275,3 | 7,0 | 5,4 |
| Nicotine B | -288,1 | -274,5 | 8,1 | 5,5 |
| Nicotine A + H ₂ O | -292,9 | -277,3 | 7,8 | 7,7 |
| Nicotine B + H ₂ O | -312,4 | -284,3 | 8,4 | 19,7 |

L'examen du Tableau I montre tout d'abord des valeurs élevées d'énergies de complexation (ΔE_{cpx}) et de fixation (ΔE_{fix}). Les premières se situent en effet dans une gamme d'environ -290 à -310 kJ mol^{-1} , les secondes variant de -275 à -285 kJ mol^{-1} . Ces valeurs paraissent en fait compatibles avec la nature du système étudié. En effet, celui-ci comprend un cation moléculaire (le ligand protoné) en interaction avec un site neutre du point des vues des charges électriques. La sphère de 7 Å définie autour du ligand contient en effet un résidu glutamate (Glu 190) chargé négativement et un résidu arginine (Arg 104) chargé positivement. Par comparaison, à titre d'exemple, la complexation d'un cation moléculaire tel que la galanthamine protonée par des molécules de benzène, d'eau et par un anion chlorure conduit respectivement à des énergies de l'ordre de -42 kJ mol^{-1} , -54 kJ mol^{-1} et -463 kJ mol^{-1} .² Les valeurs importantes obtenues à travers nos calculs pour le système étudié pourraient être liées à l'intervention de contributions multiples dans l'interaction de la nicotine protonée avec le modèle de l'AChBP.

Par ailleurs, les énergies de complexation (ΔE_{cpx}) et de fixation (ΔE_{fix}) calculées pour les deux complexes possédant une molécule d'eau sont de façon cohérente systématiquement inférieures aux complexes correspondants sans molécule d'eau. Ainsi, les complexes

présentant le plus d'interactions, y compris relayées par une molécule d'eau, sont caractérisés par une plus grande stabilisation énergétique. Plus précisément, la contribution de l'eau à l'interaction nicotine-AChBP est de l'ordre de -2 et -10 kJ mol⁻¹, respectivement, pour les conformères A et B.

L'analyse de l'évolution de l'énergie de relaxation (ΔE_{rel}) pour les différents partenaires révèle également des informations intéressantes. Le Tableau I montre de façon attendue que la variation d'énergie de relaxation est plus prononcée pour les modèles du site actif comprenant la molécule d'eau que ceux pour lesquels elle est exclue. La faible différence entre les termes de relaxation pour le ligand et le modèle du site s'explique par le fait que pour ce dernier, seul le résidu Trp 143 et l'eau ne sont pas maintenus rigides lors du calcul. Une augmentation significative est toutefois notée dans le cas de la nicotine B (autour de 20 kJ mol⁻¹) au lieu de 5 à 7 kJ mol⁻¹ pour les autres complexes. Nous attribuons ce comportement à une réorientation significative de la molécule d'eau visant à optimiser les contacts avec le ligand par rapport à la position de départ. Cette explication est cohérente avec les résultats obtenus pour la nicotine A : dans la mesure où aucune interaction avec le ligand n'est possible pour cette conformation, la position de la molécule d'eau n'est pratiquement pas modifiée, le terme de relaxation étant peu affecté.

Les Figures 2 et 3 permettent de visualiser les interactions nicotine-AChBP dans les différents complexes et le Tableau II en rassemble les principales distances interatomiques. Pour les deux conformères A et B de la nicotine, plusieurs interactions sont ainsi observées entre le fragment N-méthyle pyrrolidinium et des acides aminés de la composante principale du site. Une liaison H entre le N₁H⁺ du cycle pyrrolidine et le carbonyle de la liaison peptidique du Trp 143 est en premier lieu obtenue. Par ailleurs, des interactions mettant en

Le jeu des groupes CH au voisinage de la charge positive du groupe du cycle pyrrolidine sont également visibles. Elles concernent les méthylènes C₅H et C₆H directement liés à l'N₁ portant la charge positive. Ces groupements interagissent ainsi avec le cycle à six du noyau indole du Trp 143 et un groupe hydroxyle de la chaîne latérale de la Tyr 89 pour le premier et avec le cycle benzénique de la Tyr 192 pour le second. Dans le cas de la nicotine, des interactions sont également obtenues à l'issue de l'optimisation de géométrie entre le cycle pyridine et des acides aminés de la composante complémentaire du site actif de l'AChBP. Une de ces interactions est en fait relayée par une molécule d'eau formant une liaison H avec l'N₁ sp² du cycle, la molécule d'eau étant « fixée » par deux liaisons H avec le carbonyle et le NH peptidique des résidus Leu 102 et Met 114, respectivement. Une seconde implique en tant que donneur de liaison H un CH aromatique (C₄H) du cycle pyridine et le groupe hydroxyle de la chaîne latérale de la Tyr 192.

Ces deux interactions contribuent à stabiliser le complexe de la nicotine B par rapport à celui de la nicotine A et expliquent la différence de 7,0 kJ mol⁻¹ de la variation d'énergie de fixation (ΔE_{fix}) en faveur du second complexe.

Le Tableau II représente les distances interatomiques des différentes interactions évoquées ci-dessus dans les différents complexes. La distance entre le carbone C₂ du noyau pyridine de la nicotine et le carbonyle de la liaison peptidique du Trp 143 a également été notée. Ce paramètre, sélectionné par Dougherty,² permet de situer la position relative du cycle pyridinique de la nicotine par rapport au Trp 143.

Tableau II- Distances (Å) des principales interactions pour les différents complexes obtenus avec la nicotine et pour le premier site de la structure cristalline (1uw6).

| | Structure exp | Nicotine A | Nicotine A + H₂O | Nicotine B | Nicotine B + H₂O |
|--|--------------------------|-------------------|--|-------------------|--|
| $d_{\text{NH}^+\cdots\text{CO}(\text{Trp}143)}$ | 1,81 | 1,82 | 1,84 | 1,77 | 1,75 |
| $d_{\text{C}_5\cdots\text{Ce}(\text{Trp}143)^a}$ | 2,52 | 2,37 | 2,38 | 2,40 | 2,41 |
| $d_{\text{NH}(\text{met}114)\cdots\text{OH}_2}$ | 1,93 | | 2,00 | | 1,66 |
| $d_{\text{NH}(\text{Leu}102)\cdots\text{OH}_2}$ | 2,92 | | 2,63 | | 2,74 |
| $d_{\text{C}_5\cdots\text{OH}_2}$ | | | 3,76 | | |
| $d_{\text{N}_1\cdots\text{OH}_2}$ | 2,84 | | | | 2,94 |
| $d_{\text{C}_5\cdots\text{OH}(\text{Tyr}89)}$ | 2,38 | 2,52 | 2,53 | 2,42 | 2,63 |
| $d_{\text{C}_6\cdots\text{Ce}(\text{Tyr}192)^b}$ | 2,78 | | | 2,66 | 2,54 |

^a: Ce(Trp 143) correspond au centroïde du cycle à 6 du Trp 143; ^b: Ce(tyr 192) correspond au centroïde du cycle à 6 de la Tyr 192.

L'examen du Tableau II montre globalement des valeurs très proches des distances relatives aux différentes interactions pour les deux conformères, les deux seules exceptions notables concernant les interactions mettant en jeu la molécule d'eau. Pour le conformère B, un raccourcissement significatif est en effet visible pour la distance entre le NH peptidique de la Met 114 et la molécule d'eau. Par contre, la comparaison avec les valeurs expérimentales révèle des tendances contradictoires. Ainsi, la distance $\text{N}_1\text{H}^+\cdots\text{OC}$ (Trp 143) est en accord remarquable avec les données cristallographiques. Pour un autre groupe de paramètres, un raccourcissement significatif est opéré lors des optimisations de géométrie. Ce comportement s'applique à l'ensemble des distances établies avec la molécule d'eau et pourrait refléter l'incertitude du positionnement de cette molécule dans la structure cristallographique. Cette tendance est également observée pour deux distances relatives à des interactions cation- π :

$C_5\cdot H\cdots Ce$ (Trp 143) et $C_6\cdot H\cdots Ce$ (Tyr 192). Enfin, une dernière interaction est au contraire allongée lors de la relaxation de géométrie : $C_5\cdot H\cdots OH$ (Tyr 89).

Pour comparer les deux structures optimisées avec la structure expérimentale, nous avons superposé les atomes homologues des différentes structures (les atomes lourds du ligand, du squelette peptidique et des chaînes latérales des acides aminés impliqués ont été considérés, ce qui correspond à un total de 24 paires atomiques), le complexe cristallographique étant utilisé comme référence. La Figure 4 montre le résultat de ces superpositions. Les valeurs de RMSD obtenues pour les conformères A et B, respectivement de 0,353 et 0,387, indiquent la validité de la méthodologie théorique mise en œuvre, les déviations par rapport à la structure expérimentale étant faibles. De façon cohérente, la superposition est meilleure pour le complexe avec la nicotine B.

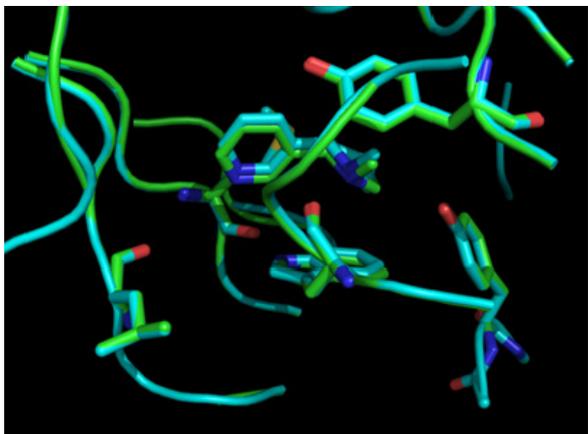


Figure 4- Superposition du complexe du modèle de l'AChBP de la nicotine B (bleu) avec la structure de référence cristallographique est en vert.

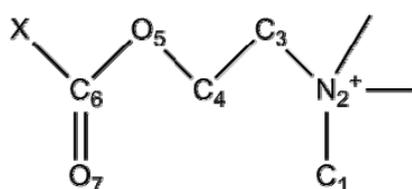
Dans l'ensemble, l'étude de ce premier complexe avec la nicotine confirme l'importance du Trp 143 dans l'interaction avec le ligand, les deux contributions (liaison $H\ NH^+\cdots OC$ et une interaction cation- π) obtenues, étant conservées par les simulations. Par ailleurs, nos résultats mettent clairement en évidence le rôle joué par la molécule d'eau relai

en interaction avec l' N_1 sp^2 de la pyridine. Enfin, une liaison H faible et une interaction de type cation- π entre des CH polarisés par la charge positive du cycle pyrrolidine de la nicotine (C_5 H et C_6 H, respectivement) et un groupe hydroxyle du noyau phénolique de la Tyr 89 et le noyau aromatique de la Tyr 192 ont également été identifiées à la suite de l'optimisation. Ces tendances sont en accord avec les données expérimentales obtenues avec l'AChBP^{1, 3} et avec les éléments du pharmacophore nicotinique des nAChRs récemment confirmés expérimentalement par Dougherty.³ Nos données sont également cohérentes avec les résultats d'approches de modélisation moléculaire mettant en œuvre des méthodes classiques, qu'elles soient de type mécanique moléculaire,^{4,5} ou dynamique moléculaire.⁶

I.2- Complexe ACh-AChBP

Dans le cas de l'ACh, aucune structure expérimentale de complexe n'est disponible, seule une structure avec la carbamylcholine (Figure 5)¹ est répertoriée (entrée 1UV6) dans la PDB. Sur la base de l'analogie structurale entre les deux composés (le méthyle de la fonction ester de l'ACh est « simplement » substitué par un NH_2 dans la carbamylcholine), et dans la mesure où (i) ils présentent une flexibilité importante (ii) trois sites sur les cinq que compte le pentamère de l'AChBP sont occupés dans la structure cristallographique (iii) la résolution de la structure est moyenne (2,5 Å), nous avons positionné l'ACh manuellement dans le site de la structure optimisée du complexe avec la nicotine plutôt que de considérer une des géométries de départ observée expérimentalement pour la carbamylcholine. Dans la littérature, les différences d'affinité entre la nicotine, d'une part, et l'ACh et la carbamylcholine, d'autre part, ont fait l'objet de discussions essentiellement basées sur les conséquences enthalpiques de la perte de la liaison H $NH^+ \cdots OC$ (Trp 143) existant dans le complexe avec la nicotine.^{1, 7} En fait, des interactions plus faibles, faisant intervenir le

méthylène en position 3 de la carbamylcholine, ont été suggérées sur la base des données structurales.¹ Pour positionner la molécule d'ACh dans le site optimisé de l'AChBP, nous avons considéré plusieurs points de repère fondés sur les éléments du pharmacophore nicotinique à savoir (i) la composante principale de l'interaction, c'est-à-dire l'interaction du groupe ammonium de l'ACh avec le noyau indole du Trp-143 (un des groupes méthyle polarisé positivement du fait de la proximité de la charge positive de la fonction ammonium est situé au-dessus du cycle à six du noyau indole) (ii) l'orientation du méthylène en position 3 lié à l'N quaternaire par rapport au carbonyle du Trp 143 (iii) l'orientation de la fonction carbonyle de l'ACh par rapport aux résidus impliqués dans l'interaction avec la nicotine (Leu 102 et Met 114). Par ailleurs, l'ACh étant, comme la carbamylcholine, particulièrement flexible (cf. chapitre 3.II), nous avons pris en compte pour cette étude les trois conformations principales (t^+g , t^-g , et tt) suggérées d'après des études de RMN multi-impulsionnelles à l'état solide dans l'environnement du récepteur.⁸ Pour chacune de ces conformations, trois positions de départ sur la base des critères évoqués précédemment ont été étudiées, c'est-à-dire un ensemble de neuf géométries. Enfin, pour chaque cas, l'implication d'une molécule d'eau ayant été démontrée dans le cas de la nicotine, nous avons également considéré chaque complexe en présence d'une molécule d'eau. Au total, dix-huit structures ont donc été optimisées.



Acétylcholine : $X=C_8$
Carbamylcholine: $X=N_8$

Figure 5- Structure chimique et numérotation de l'ACh et de la carbamylcholine

Tableau III- Variation des énergies (en kJ mol^{-1}) de complexation (ΔE_{cpx}), de fixation (ΔE_{fix}) et de relaxation du ligand ΔE_{rel} (L) et du modèle de site ΔE_{rel} (MS) pour les complexes les plus stables optimisés avec l'ACh.

| Système ^a | ΔE_{cpx} | ΔE_{fix} | ΔE_{rel} (L) | ΔE_{rel} (MS) |
|---|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| ACh-tt-1 | -297,4 | -282,3 | 11,0 | 4,1 |
| ACh-tt-3 | -297,4 | -282,3 | 11,0 | 4,1 |
| ACh-tt-3 + H ₂ O | -285,0 | -257,5 | 7,0 | 20,5 |
| ACh-t ⁺ g-1 | -271,1 | -250,2 | 16,0 | 5,0 |
| ACh-t ⁺ g-3 | -259,5 | -246,1 | 7,6 | 5,8 |
| ACh-t ⁺ g-3+H ₂ O | -279,8 | -259,8 | 7,2 | 12,8 |

^a La notation utilisée est de type ACh-xi-n : xi désigne le type de conformation de l'ACh (tt, t⁺g ou t⁻g) et n désigne l'orientation de l'ACh dans le site.

Le Tableau III rassemble les différentes valeurs énergétiques obtenues pour les complexes les plus stables (situés à moins de 40 kJ mol^{-1} du minimum absolu trouvé). En réalité, la variation d'énergie de fixation ΔE_{fix} calculée pour tous les complexes se situe sur une gamme de l'ordre 70 kJ mol^{-1} , étalée de -282 à -212 kJ mol^{-1} . Ce résultat est significativement différent du comportement observé avec la nicotine (gamme correspondante d'une dizaine de kJ mol^{-1}) et est cohérent avec la grande flexibilité conformationnelle de l'ACh et les multiples positions qu'elle peut adopter dans le site de l'AChBP. Par ailleurs, les complexes les plus stables (ΔE_{fix} de $282,3 \text{ kJ mol}^{-1}$) apparaissent situés plus haut en énergie que les structures obtenues avec la nicotine, d'environ 2 kJ mol^{-1} , cette tendance étant en accord avec l'affinité plus importante de la nicotine par rapport à l'ACh. Contrairement au ligand précédent, l'examen du Tableau III montre que les complexes les plus stables correspondent à des structures sans molécule d'eau. Dans les trois complexes les plus bas en énergie, les conformations de l'ACh sont soit de type tt ou t⁺g. La flexibilité conformationnelle importante de l'ACh est confirmée par les valeurs des énergies

de relaxation correspondantes ΔE_{rel} (L) (de 7,2 à 16,0 kJ mol⁻¹), c'est-à-dire significativement plus élevées que les valeurs de l'ordre de 7 à 8 kJ mol⁻¹ obtenues avec la nicotine. Par contre, en accord avec les tendances observées dans le cas de la nicotine, les structures conduisant aux termes de relaxation les plus élevés pour le modèle du site (ΔE_{rel} (MS)) correspondent toutes à des complexes avec des molécules d'eau. La variation de ce terme est d'ailleurs remarquable, les structures sans molécule d'eau conduisant à des valeurs de l'ordre de 4 à 6 kJ mol⁻¹. L'examen de la différence entre les termes énergétiques de fixation et de complexation, témoignant du degré de relaxation de l'ensemble des partenaires conduit, en considérant l'ensemble des complexes, à des valeurs variant de 9 à 28 kJ mol⁻¹, c'est-à-dire significativement supérieures à la gamme obtenue dans le cas de la nicotine. Ces résultats mettent de nouveau indirectement en relief d'une part la contribution notable de la relaxation de l'ACh du fait de la grande variété de structures qu'elle peut adopter et d'autre part les réorientations significatives de la molécule d'eau dans le site.

Les Figures 6 et 7 montrent les interactions de l'ACh pour deux des complexes les plus stables obtenus et le Tableau IV présente les distances interatomiques des principaux contacts pour les quatre complexes les plus bas en énergie. Ces données montrent tout d'abord que les contacts majoritaires du ligand sont établis avec la composante principale du site, c'est-à-dire le Trp 143. Ainsi, un des méthyles de la tête ammonium de l'ACh se positionne au-dessus du cycle à six du noyau indole du Trp, les distances entre l'H le plus proche et le centroïde du cycle variant de 2,30 à 2,62 Å selon les complexes. Selon les structures, le méthylène en position 3 ou 4 de l'ACh est également à proximité du carbonyle peptidique du Trp 143. Enfin, le carbonyle de la fonction acétyl de l'ACh est en interaction avec la molécule d'eau relai pontant le ligand avec le carbonyle et le NH peptidique des résidus Leu 102 et Met 114. Dans les complexes où la molécule d'eau est absente, des

contacts entre le groupe méthyle de la fonction ester de l'ACh et les mêmes résidus sont établis. Ces derniers sont cohérents avec l'hypothèse de Sixma et coll., qui ont suggéré que la meilleure affinité de l'ACh vis-à-vis de l'AChBP par rapport à la carbamylcholine (de l'ordre d'un facteur 10) pourrait être liée à des contacts faibles (de type van der Waals ou des liaisons H faibles) de cette extrémité de l'ACh avec des résidus de la composante complémentaire.¹ D'autres interactions, plus secondaires, sont également observées selon les complexes. Une interaction entre un des groupes méthyles de la tête ammonium et la fonction hydroxyle de la Tyr 89 est ainsi parfois obtenue (Figure 7). L'implication de ce résidu dans l'interaction est en accord avec les études de mutagenèse dirigée ayant montré une baisse de l'affinité des ligands lorsque le résidu Tyr dans la position correspondante dans les nAChRs est muté en Phe.⁹

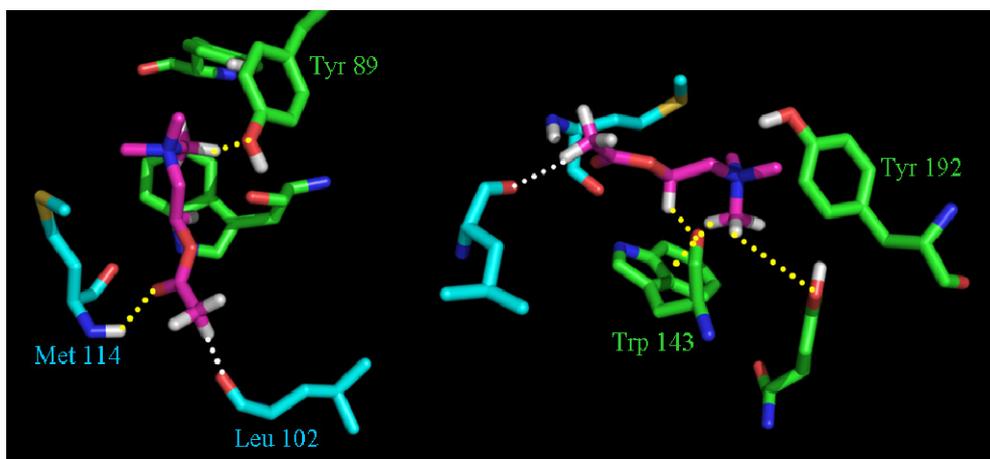


Figure 6- Structure optimisée du complexe AChtt-1 (en bleu : partie complémentaire du site, en vert : partie principale, en violet : la nicotine). Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés jaunes et les contacts faibles par des pointillés blanc.

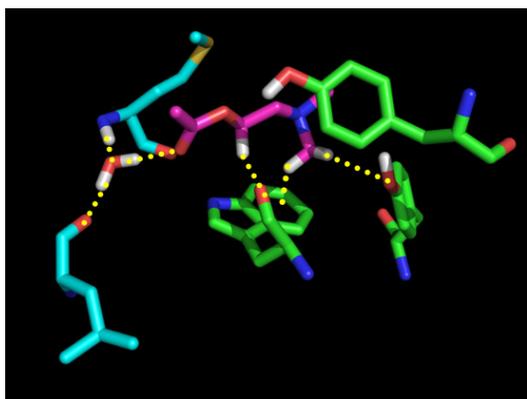


Figure 7- Structure optimisée du complexe AChtg-3 + H₂O (en bleu : partie complémentaire du site, en vert : partie principale, en violet : nicotine. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés.

Tableau IV- Distance des principales interactions (Å) pour les différents complexes obtenus avec l'ACh.

| | AChtt-1 | AChtt-3 | AChtt-3 + H ₂ O | AChtt-g-3 + H ₂ O |
|---------------------------------|---------|---------|-------------------------------|---------------------------------|
| $d_{C_4H \cdots CO(Trp143)}$ | 2,32 | 2,32 | 2,46 | 2,43 |
| $d_{C_1H \cdots Ce(Trp143)^a}$ | 2,30 | 2,30 | 2,62 | 2,62 |
| $d_{NH(Met114) \cdots OH_2}$ | | | 1,7 | 1,69 |
| $d_{NH(Met114) \cdots CO(ACh)}$ | 2,19 | 2,19 | | |
| $d_{CO(Leu102) \cdots OH_2}$ | | | 1,69 | 1,69 |
| $d_{CO(Leu102) \cdots HC_8}$ | 2,04 | 2,04 | | |
| $d_{CO(ACh) \cdots OH_2}$ | | | 1,86 | 2,65 |
| $d_{C_1H \cdots OH(Tyr89)}$ | 3,45 | 3,45 | 2,65 | 2,67 |

^a : Centroïde du cycle à 6 du Trp 143.

Le Tableau IV montre que la stabilité supérieure des complexes sans molécule d'eau est attribuable, selon nos résultats, d'une part à un raccourcissement de l'interaction cation – π (de l'ordre de 0,1 Å) et d'autre part, à des interactions de l'extrémité C-terminale du ligand avec les résidus Leu 102 et Met 114 de la partie complémentaire du site. Plus précisément, une liaison H entre le NH peptidique de la Met 114 et le carbonyle de l'ACh est d'une part observée, et d'autre part une interaction faible entre le méthyle de la fonction ester de l'ACh

et le carbonyle de la Leu 102 est obtenue. On peut noter que l'interaction avec la fonction hydroxyle de la Tyr 89 n'est pas systématiquement présente. Dans le même ordre d'idée, des tendances contradictoires concernant l'interaction entre l'ACh et le carbonyle du Trp 143 sont obtenues d'après nos calculs. En effet, dans les complexes les plus stables, le méthylène impliqué dans les interactions avec le carbonyle n'est pas le CH₂ en position 3, directement lié à l'N quaternaire, mais le CH₂ en position 4. Quoiqu'il en soit, une telle interaction est effectivement obtenue lors de nos simulations, les valeurs de distances correspondantes, de l'ordre de 2,3 à 2,5 Å suggérant une contribution non négligeable.

Comme pour la nicotine, nous avons superposé les structures des quatre complexes les plus stables sur la structure expérimentale obtenue avec la carbamylcholine (Figure 8) en considérant les atomes des Carbones alpha du squelette peptidique (27 paires au total). Les valeurs faibles de RMSD correspondantes, systématiquement de l'ordre de 0,15 Å, témoignent de la conservation de la position du Trp 143. Ce type de superposition permet de visualiser les différences de position du ligand dans le site de l'AChBP. Ainsi, la Figure 8 montre clairement une orientation significativement différente de l'extrémité opposée à la tête ammonium pour les deux ligands. Cependant, une différence significative pour la tête ammonium est également apparente. Ainsi, si une interaction entre un groupe méthyle lié à l'azote quaternaire est effectivement conservée dans la structure théorique, on mesure une distance de 1,4 Å entre les deux atomes d'azote à l'issue de la simulation. Ce résultat montre donc une « translation » significative du ligand dans le site actif lors de l'optimisation de géométrie et indique la nécessité d'études complémentaires pour explorer de façon plus complète l'orientation de ce ligand très flexible dans le site. Il explique par ailleurs les différences significatives de contacts observés par rapport à la structure expérimentale avec la carbamylcholine, en particulier au niveau du méthylène en position 3.

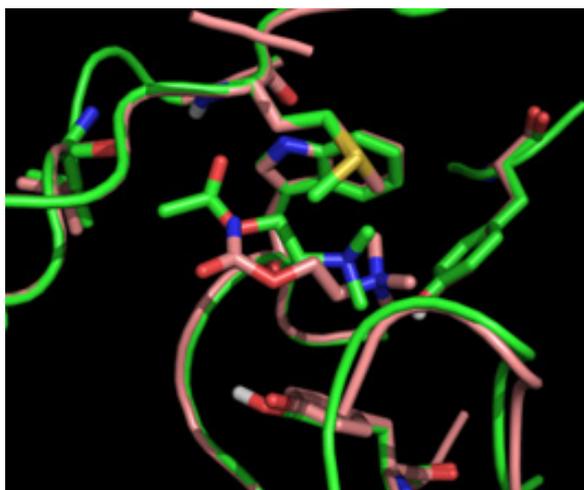


Figure 8- Complexe ACh-tt-1 (en vert) superposé à la structure cristalline de l'entrée 1Uv6 (en saumon).

I.3- Complexe épibatidine-AChBP

Pour l'épibatidine (Figure 9), comme pour la nicotine, une structure expérimentale (entrée 2BYQ) est disponible dans la PDB. Cependant, cette structure est caractérisée par une résolution très moyenne (3,4 Å) et plusieurs conformations pour le ligand ont été suggérées dans le site sur la base des observations cristallographiques.¹⁰ Pour quatre des structures, le cycle pyridinique est orienté de la même façon que dans les complexes avec la nicotine, c'est-à-dire avec l'azote sp^2 N_1 , positionné vers la molécule d'eau. La cinquième conformation présente une orientation opposée (rotation de l'ordre de 180° autour de la liaison intercycle). Par ailleurs, les contacts du cycle saturé dans l'environnement du site de l'AChBP sont significativement différents selon l'interface dimérique du récepteur. En effet des interactions d'un N_7H^+ avec la fonction hydroxyle de la Tyr 93 sont parfois observées en plus de l'interaction du second N_7H^+ avec le carbonyle peptidique du Trp 143. Ces données, cohérentes avec l'existence de plusieurs minima énergétiques pour la forme protonée sur l' N sp^3 de l'épibatidine,¹¹ pourraient également être liées à la résolution moyenne de la structure. Pour nos simulations, nous avons donc considéré trois points de départ, basés sur les

observations expérimentales, l'une des structures présentant une orientation inversée du cycle pyridine (Epi-2), les deux autres correspondant à des orientations différentes du cycle saturé (Epi-1 et Epi-3). Pour les raisons déjà évoquées, nous avons également considéré les mêmes structures en présence d'une molécule d'eau, le nombre de géométries étudiées pour ce ligand étant donc de six au total. Le Tableau VI regroupe les différents paramètres énergétiques pour les six complexes modélisés.

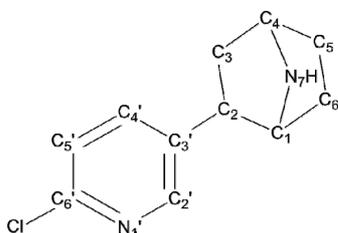


Figure 9- Structure chimique et numérotation de l'épi-batidine.

Tableau VI- Variation des énergies (en kJ mol^{-1}) de complexation (ΔE_{cpx}), de fixation (ΔE_{fix}) et de relaxation du ligand ΔE_{rel} (L) et du modèle de site ΔE_{rel} (MS) pour les complexes les plus stables optimisés avec l'épi-batidine.

| Système | ΔE_{cpx} | ΔE_{fix} | ΔE_{rel} (L) | ΔE_{rel} (MS) |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Epi 1 | -316,0 | -305,9 | 6,3 | 3,8 |
| Epi 2 | -316,1 | -288,8 | 15,8 | 11,5 |
| Epi 3 | -320,5 | -297,2 | 11,3 | 12,1 |
| Epi 1 + H ₂ O | -334,4 | -302,7 | 5,7 | 25,9 |
| Epi 2 + H ₂ O | -321,8 | -268,0 | 17,8 | 36,0 |
| Epi 3 + H ₂ O | -334,1 | -286,6 | 10,2 | 37,3 |

Les valeurs des paramètres énergétiques répertoriés dans le Tableau VI montrent tout d'abord que les complexes avec l'épi-batidine sont caractérisés par des énergies de complexation et de fixation les plus basses dans la série des trois composés étudiés. Les termes de complexation et de fixation sont situés sur une gamme de l'ordre de 20 kJ mol^{-1} ,

c'est-à-dire proches des valeurs obtenues dans le cas de la nicotine. Cependant, une différence majeure est notable dans la mesure où la valeur la plus basse de l'énergie de complexation ne correspond pas, contrairement aux ligands précédents, à la valeur la plus stable de l'énergie de fixation. En d'autres termes, du fait de contributions très importantes des termes de relaxation (les différences entre énergies de complexation et de fixation sont comprises entre 32 et 54 kJ mol⁻¹ avec les molécules d'eau), le gain énergétique provenant de l'apparition éventuelle de liaisons H avec la molécule d'eau apparaît compensé par l'importante réorganisation structurale consécutive à son positionnement optimal. C'est pourquoi, de façon surprenante, les complexes avec molécules d'eau n'apparaissent pas comme les plus stables sur la base des énergies de fixation. Ces résultats sont donc à considérer avec précaution et peuvent provenir d'un mauvais positionnement de la molécule d'eau au départ de nos simulations.

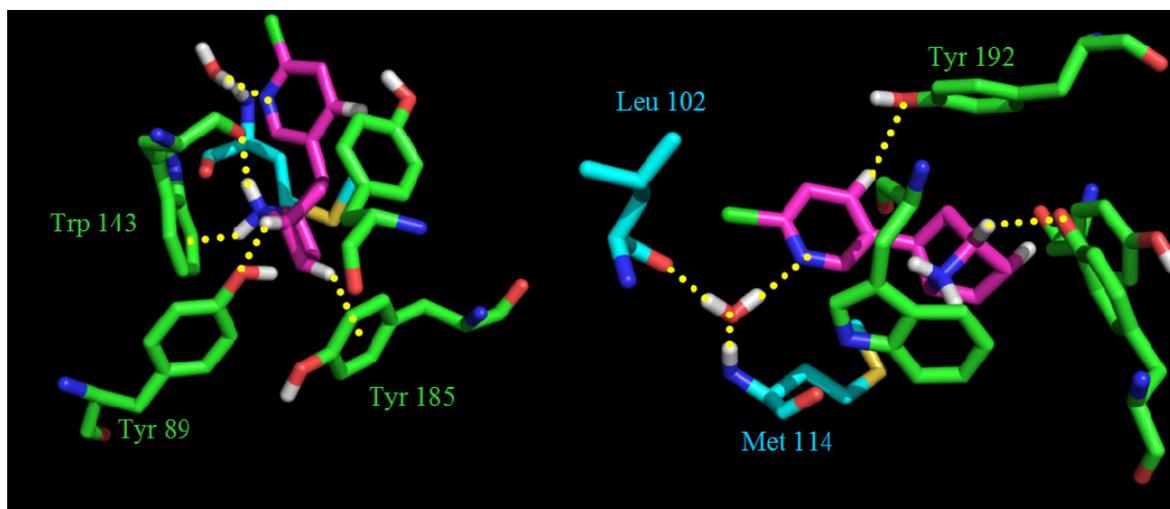


Figure 10- Structure optimisée du complexe epi1 + H₂O. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés avec en bleu la partie complémentaire du site, en vert la partie principale et en violet le ligand.

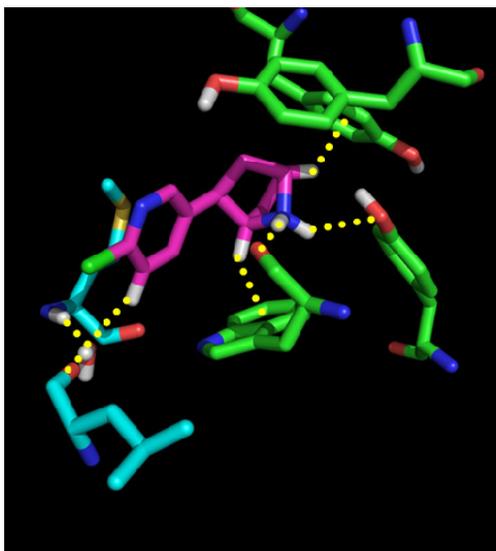


Figure 11- Structure optimisée du complexe epi2 + H₂O. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés avec en bleu la partie complémentaire du site, en vert la partie principale et en violet le ligand.

Les Figures 10 et 11 montrent les interactions de l'épibatidine dans l'environnement de l'AChBP pour les complexes les plus stables et le Tableau VII liste les distances interatomiques des principaux contacts. Ces résultats indiquent tout d'abord la présence de deux interactions entre le groupe ammonium du cycle saturé de l'épibatidine et le Trp 143, d'une part entre un N₇H⁺ et le carbonyle peptidique du Trp 143, et d'autre part entre le second N₇H⁺ et le cycle à six du noyau indole du Trp 143. Par ailleurs, le CH en position 4 du cycle saturé, directement lié à l'azote ammonium, apparaît en interaction avec le groupe hydroxyle de la Tyr 89. Un contact dans lequel un autre groupe CH (C₅H) du cycle saturé serait impliqué en tant que donneur est également obtenu, cette fois dans une interaction de type cation- π , avec le nuage électronique du cycle à six de la Tyr 185. Dans le complexe Epi2 où l'orientation du cycle saturé n'est pas compatible avec ces interactions, le groupe C₁H remplace le N₇H⁺ dans l'interaction cation- π , la liaison H N₇H⁺...OC(Trp 143) étant maintenue. Dans ce cas, l'interaction avec le second N₇H⁺ est remplacée par une liaison H avec le groupe hydroxyle de la Tyr 89. Ce résultat est en accord avec la structure décrite expérimentalement.¹²

Du côté pyridinique, donc de la composante complémentaire du site, les complexes avec molécules d'eau montrent les liaisons H classiquement observées, entre l'N sp^2 , l'eau et les fonctions carbonyle et NH du squelette peptidique des résidus Leu 102 et Met 114. De plus, des interactions exploitant le caractère donneur de liaison H des CH du cycle pyridine, accentué par la présence du Cl,¹¹ sont également observées dans certains complexes. C'est le cas pour l'interaction entre le C₄'H et le groupe hydroxyle de la Tyr 192. On peut également noter que pour les complexes présentant une orientation opposée de l'N sp^2 , les trois interactions avec la molécule d'eau sont maintenues par l'intermédiaire du C₅'H du cycle pyridine.

Tableau VII- Distance des principales interactions (en Å) pour les différents complexes obtenus avec l'épibatidine.

| | Epi 1 | Epi 1 + H ₂ O | Epi 2 | Epi 2 + H ₂ O | Epi 3 | Epi 3 + H ₂ O |
|--------------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------------------------|-------|-----------------------------|
| $d_{N^+H \cdots CO(Trp143)}$ | 2,15 | 2,31 | 1,77 | 1,79 | 1,79 | 1,80 |
| $d_{N^+H \cdots Ce(Trp143)^a}$ | 2,09 | 2,08 | | | | |
| $d_{C_1H \cdots CE(Trp143)^a}$ | | | 2,42 | 2,46 | 2,43 | 2,42 |
| $d_{CO(Leu102) \cdots HOH}$ | | 1,63 | | 1,79 | | 1,65 |
| $d_{CO(Leu102) \cdots HOH}$ | | 1,87 | | 1,72 | | 1,88 |
| $d_{N_1 \cdots HOH}$ | | 1,93 | | | | |
| $d_{C_5 \cdots HOH}$ | | | | 2,17 | | 1,89 |
| $d_{C_4H \cdots OH(Tyr89)}$ | 2,51 | 2,47 | | | | |
| $d_{N^+H \cdots OH(Tyr89)}$ | | | 2,53 | 2,48 | 2,65 | 2,66 |
| $d_{C_5H \cdots Ce(Tyr185)^b}$ | 2,54 | 2,52 | 2,38 | 2,32 | 2,47 | 2,44 |

^a: Centroïde du cycle à 6 du Trp 143. ^b: Centroïde du cycle à 6 de la Tyrosine 185.

Le Tableau VII montre une évolution significative des distances des différentes interactions du ligand avec l'AChBP pour les complexes étudiés. Globalement, le nombre d'interactions de l'épibatidine dans le site de l'AChBP est le même pour les différentes conformations mais la nature des atomes impliqués est différente, de sorte que les distances, donc la force des interactions, peuvent être significativement différentes. Ainsi, la distance $N_7H^+ \cdots OC$ avec le carbonyle du Trp 143 varie de l'ordre de 0,3 Å selon les complexes. Par ailleurs, l'interaction de type cation- π établie entre le second N_7H^+ et le cycle à six du noyau indole est significativement la plus courte dans le complexe le plus stable, dans la mesure où elle serait remplacée dans les autres structures par une interaction impliquant un CH (C_1H) polarisé du cycle. Par ailleurs, cette « permutation » en terme d'interactions s'observe également avec l'hydroxyle de la Tyr 89, dans la mesure où l'interaction impliquant ce groupement avec le N_7H^+ est remplacée par un CH du cycle saturé. Finalement, la structure apparaissant la plus stable d'après nos résultats est cohérente avec les éléments du pharmacophore nicotinique, en particulier l'implication essentielle du Trp 143, à la fois par l'intermédiaire du CO peptidique et du cycle à 6 chaînons du noyau indole. Les interactions plus secondaires mises en évidence sur la base de nos simulations sont par ailleurs en majorité plus courtes que dans les autres minima obtenus. Enfin, la géométrie de complexation expérimentale retenue par Hansen et coll.¹⁰ correspond bien à un des minima que nous avons obtenus. Nous pensons que ces différents arguments constituent des indications supplémentaires validant l'approche théorique que nous avons utilisée.

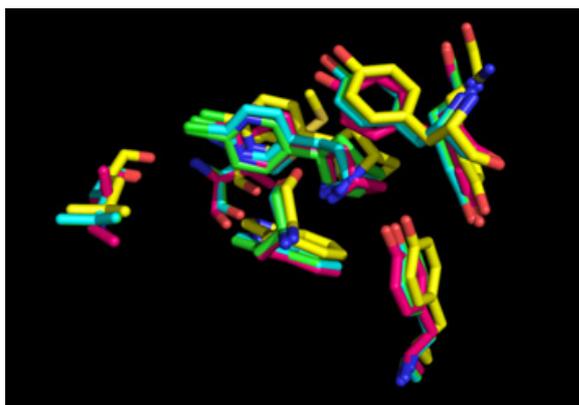


Figure 12- Superposition des complexes Epi1 (en bleu), Epi2 (en vert) et Epi 3 (en jaune) sur une des structures cristallines (en vert).

La superposition des trois structures optimisées sans molécule d'eau sur les atomes de carbone alpha du squelette peptidique (Figure 12) illustre les différences de conformation et d'orientation de l'épibatidine dans l'environnement de l'AChBP, la structure expérimentale retenue par Hansen et coll. apparaissant en magenta. Cette représentation met en particulier en évidence la différence d'orientation, décisive pour l'affinité, du cycle saturé.

II] Comparaison de la structure et des énergies d'interaction de quelques ligands avec l'AChBP.

Le Tableau VIII rassemble les variations relatives des énergies de fixation ($\delta\Delta E_{\text{fix}}$) des complexes les plus stables de l'épibatidine et de la nicotine par rapport à celui du plus stable du ligand endogène de l'AChBP que constitue l'ACh, considérée donc comme ligand de référence, fixant le zéro énergétique. Pour cette comparaison relative, nous n'avons considéré que les énergies de fixation, qui renferment l'ensemble des contributions énergétiques du processus d'interaction. Nous présentons dans le Tableau VIII les résultats

obtenus pour les formes directement comparables, c'est-à-dire d'une part les plus stables avec molécule d'eau, et d'autre part sans molécule d'eau. Les deux dernières colonnes indiquent également les résultats obtenus en considérant la forme la plus basse énergétiquement pour les trois complexes, qu'elle contienne ou non de l'eau.

Tableau VIII- Variation des énergies relatives de fixation $\delta\Delta E_{\text{fix}}$ (en $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) des minima énergétiques de l'épibatidine et de la nicotine par rapport à ceux de l'ACh.

| Systèmes | Complexes | $\delta\Delta E_{\text{fix}}$ | Complexes | $\delta\Delta E_{\text{fix}}$ | Complexe le plus | $\delta\Delta E_{\text{fix}}$ |
|--------------------|-------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | sans eau | | avec eau | | stable | |
| ACh | ACh-tt-1(3) | (-282,3) | ACh-t ⁺ g-3 | (-259,8) | ACh-tt-1(3) | (-282,3) |
| | | 0,0 | | 0,0 | | 0,0 |
| Nicotine | Nicotine-A | (-275,3) | Nicotine-B | (-284,3) | Nicotine-B+H ₂ O | (-284,3) |
| | | +7,0 | | -24,5 | | -2,0 |
| Epibatidine | Epi-1 | (-305,9) | Epi-1 | (-302,7) | Epi-1 | (-305,9) |
| | | -23,6 | | -42,9 | | -23,6 |

Les résultats rassemblés dans le Tableau VIII montrent des différences significatives et contradictoires, selon les systèmes considérés. Ainsi, pour les complexes sans molécule d'eau, les structures obtenues avec la nicotine sont moins stables de l'ordre de 7 kJ mol^{-1} par rapport aux correspondants avec l'ACh. Dans le cas des complexes avec molécules d'eau, on obtient la séquence d'affinité ACh < Nicotine < Epibatidine. Cependant, l'examen des valeurs absolues d'énergies de fixation obtenues pour les différents complexes indique que le complexe le plus stable obtenu en présence d'eau dans le cas de l'ACh possède une énergie de l'ordre de 22 kJ mol^{-1} *supérieure* aux complexes du même ligand sans molécule d'eau. Pour cette raison, ces résultats ne nous ont pas paru pertinents à sélectionner pour notre comparaison. La dernière colonne du tableau présentant les énergies relatives par rapport à

l'ACh pour les complexes les plus stables, avec ou sans molécule d'eau, conduit également à l'ordre ACh<Nicotine<Epibatidine, bien que la différence obtenue dans le cas de la nicotine par rapport à l'ACh, de l'ordre de 2 kJ mol^{-1} ne paraisse pas significative. Sur la base de la discussion précédente, nous avons toutefois retenu ces dernières valeurs, et donc les géométries correspondantes, pour l'étude relative des différentes interactions mises en jeu dans la reconnaissance des trois ligands par l'AChBP.

L'ordre ACh<Nicotine<Epibatidine obtenu à partir de nos résultats correspond à celui observé sur la base des mesures expérimentales d'affinité.¹³ En effet, des constantes de dissociation K_d respectives de 890, 86 et 0,16 nM ont été déterminées par ITC pour l'interaction de l'ACh, de la nicotine et de l'épibatidine avec l'AChBP extraite de *Lymnea stagnalis* (L-AChBP). Le même ordre est obtenu vis-à-vis de l'AChBP provenant d'*Aplysia californica* (A-AChBP), mais dans des proportions différentes. Dans la mesure où la structure 1UW6 que nous avons utilisée en tant que référence pour le positionnement des différents ligands est de type L-AChBP, nous avons considéré ces résultats comme point de repère expérimental. Les variations d'enthalpie libre correspondant à ces constantes de dissociation sont donc respectivement de -34,5, -40,3 et -55,9 kJ mol^{-1} , ce qui conduit à des variations relatives $\delta\Delta G$ par rapport à l'ACh de l'ordre de -6 kJ mol^{-1} pour la nicotine et de $-21,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ pour l'épibatidine, écarts relatifs en accord remarquable avec nos tendances théoriques, les différentes valeurs n'étant bien sûr absolument pas directement comparables. L'ordre d'affinité ACh<Nicotine<Epibatidine a déjà été reproduit par des simulations mettant en œuvre des méthodes classiques^{14, 15} sur des modèles des nAChRs mis au point par des méthodes d'homologie. Aujourd'hui, les complexes avec ces trois ligands ou certains d'entre eux (fréquemment la nicotine ou l'épibatidine) sont souvent utilisés comme « référence » dans des approches de modélisation ciblant le site de l'AChBP pour du

criblage virtuel exploitant des chimiothèques de produits chimiques beaucoup plus diversifiés^{5, 16, 17} ou dédiées à l'étude d'agonistes particuliers.¹⁸⁻²⁰ Cependant, à notre connaissance, des études basées sur la mise en œuvre de méthodes mixtes de type QM/QM' font toujours défaut dans la littérature, aucune étude systématique d'analyse des trois ligands « de référence » de même que de l'influence d'une molécule d'eau n'ayant été publiée. Ces méthodes permettent de s'affranchir des problèmes de non-universalité des champs de force utilisés par les méthodes classiques et donc de décrire avec précision les propriétés structurales et énergétiques des complexes.

Une fois les complexes sélectionnés sur un plan énergétique, nous avons étudié les variations *relatives* des distances interatomiques des interactions communes aux trois ligands, par rapport aux données structurales mesurées dans le cas de l'ACh. Ces contacts sont : (i) la distance entre l'azote ammonium de l'ACh et l'O de la fonction carbonyle du Trp 143 $d_{N^+...O}$ (ii) la distance entre l'N ammonium de l'ACh et le centroïde du cycle à six du noyau indole du Trp 143 (iii) la distance entre le carbone C₄ de l'ACh et l'O de la Tyr 89. Par ailleurs, nous avons également comptabilisé dans chacun des complexes le nombre total d'interactions, qu'il s'agisse de liaisons H ou d'interactions de type cation- π . Le Tableau IX rassemble ces différentes données et la Figure 13 montre les géométries et les interactions obtenues dans ces trois complexes.

Tableau IX- Distances interatomiques (en Å) des interactions conservées pour les trois ligands avec leur variation relative.

| Agoniste | Nb de contacts | $d_{N^+ \dots OC(Trp143)}$ | Δd | $d_{N^+ \dots Ce(Trp143)}$ | Δd | $d_{C_n \dots OH(Tyr89)}^a$ | Δd |
|-------------|----------------|----------------------------|------------|----------------------------|------------|-----------------------------|------------|
| ACh | 5 | 3,6 | 0 | 4,4 | 0 | 4,1 | 0 |
| Nicotine | 6 | 2,8 | -0,8 | 4,4 | 0,0 | 3,7 | -0,4 |
| Epibatidine | 6 | 3,0 | -0,6 | 3,0 | -1,4 | 3,3 | -0,8 |

^a: n=1 pour l'acétylcholine, n=5' pour la nicotine et n=4 pour l'épibatidine.

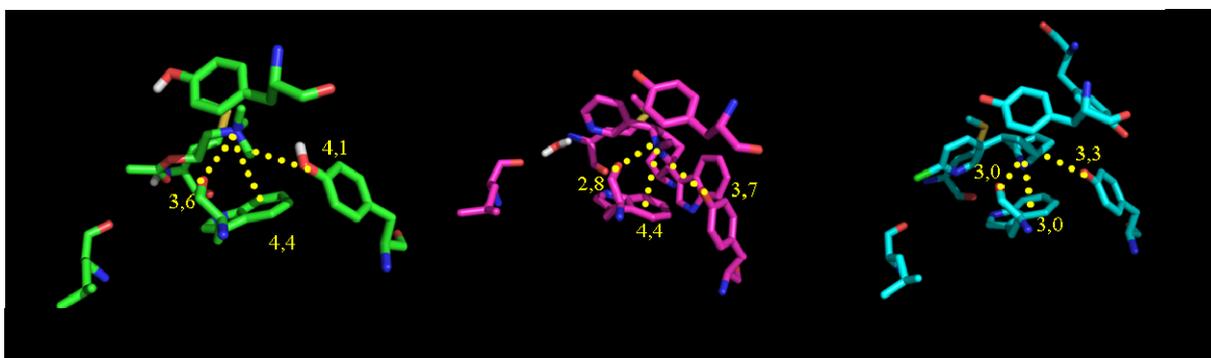


Figure 13- Structure des trois complexes les plus stables pour chaque ligand (en vert celui de l'ACh, en violet celui de la nicotine et en bleu celui de l'épibatidine). Les paramètres géométriques des trois interactions communes aux trois agonistes sont également indiqués (avec le carbonyle peptidique et le noyau indole du Trp 143 d'une part et le groupe hydroxyle de la chaîne latérale de la Tyr 89, d'autre part).

Le Tableau IX et la Figure 13 montrent une évolution significative des distances interatomiques des contacts entre la partie « ammonium » des agonistes et des résidus de la composante principale du site. Ainsi la distance entre l'azote ammonium des ligands et l'oxygène de la fonction carbonyle peptidique du Trp 143 est sensiblement raccourcie. Nous attribuons cette évolution à la variation de substitution de l'azote dans chacun des ligands, puisque d'un ligand quaternaire (ACh), l'azote devient tertiaire dans la nicotine et secondaire dans l'épibatidine. Cette modification d'environnement autour de l'azote permet un rapprochement du ligand des résidus en interaction et donc une optimisation des contacts.

Une tendance comparable est observée pour la distance entre l'azote ammonium et le centroïde du cycle à six chaînons du noyau indole du Trp 143. On peut noter un raccourcissement beaucoup plus significatif dans le cas de l'épibatidine, dans la mesure où les interactions entre les CH polarisés de la nicotine et de l'ACh ($(N_{1(2)}^+C)H \cdots \pi$) sont remplacées dans ce cas directement par une interaction $(N_7^+)H \cdots \pi$. Ces variations structurales ont été rapportées par Dougherty pour les mêmes ligands vis-à-vis des nAChRs à travers une approche combinant des mesures d'électrophysiologie, des expériences de mutagenèse dirigée et des calculs quantiques sur un modèle ligand-Trp 143 simplifiant le site.⁷ La troisième interaction observée dans les différents ligands, qui met en jeu un CH polarisé (C_4H) directement lié à l'azote ammonium et l'oxygène de la fonction hydroxyle de la Tyr 89, est plus longue pour la nicotine par rapport à l'épibatidine, mais ces contacts sont significativement plus courts que ceux observés avec l'ACh. Nous attribuons cette différence à la plus grande « dispersion » de la charge positive sur l'ensemble des CH dans le cas de l'ACh par rapport à la nicotine et à l'épibatidine, pour lesquelles la suppression d'un ou de deux groupes méthyle, respectivement, induit une localisation supérieure de la charge, donc une polarisation plus importante.

A cette modification significative des paramètres géométriques des interactions communes aux trois agonistes permettant d'ores et déjà de rationaliser la séquence d'affinité observée, l'apparition de nouvelles interactions dans le cas de la nicotine et de l'épibatidine peut également expliquer l'évolution mise en évidence. C'est le cas concernant le même fragment ammonium des trois ligands pour une interaction de type $cation \cdots \pi$ entre un CH polarisé directement lié à l'azote ammonium des ligands (C_6 et C_4 , respectivement dans le cas de la nicotine et de l'épibatidine) et le centroïde du cycle benzénique de la Tyr 192. L'évolution des distances de ces contacts est ainsi en accord avec la séquence d'affinité

ACh<Nicotine<Epibatidine obtenue sur la base des paramètres énergétiques. D'autres contacts impliquent le second élément du pharmacophore nicotinique et des résidus de la composante complémentaire du site. Dans le cas de la nicotine, en particulier, on note l'implication d'une molécule d'eau relai assurant la jonction entre l'N sp^2 pyridinique et les groupes CO et NH du squelette peptidique des résidus Leu 102 et Met 114. Comme nous l'avons évoqué plus haut, la présence d'une molécule d'eau ne conduit pas au complexe le plus stable dans le cas de l'ACh, puisque, d'une part, une interaction directe entre le carbonyle de la fonction acétyle de l'ACh et le NH peptidique de la Met 114 est observée, une interaction faible entre l'un des CH du groupe méthyle de l'ACh et le carbonyle de la Leu 102 étant d'autre part obtenue dans le complexe le plus stable. Ce résultat est en contradiction avec l'étude théorique menée par Schapira et coll., qui ont obtenu un minimum dans lequel une molécule d'eau joue un rôle de relai semblable par docking de l'ACh sur un modèle des nAChRs mis au point par des méthodes de modélisation par homologie.¹⁵ Dans le même ordre d'idée, dans le cas de l'épibatidine, une nouvelle interaction impliquant en tant que donneur de liaison H un CH du cycle pyridine est notable (entre le CH en position 4' et la fonction hydroxyle de la Tyr 192). Cependant, contrairement à l'interaction avec la nicotine et l'ACh, aucun contact ne paraît exploiter le caractère accepteur de liaison H de l'N sp^2 du cycle pyridine. Ce comportement est cohérent avec la diminution de ce potentiel du fait de l'effet électroattacteur du chlore en position ortho, le même effet étant responsable de l'augmentation du caractère donneur des CH pyridiniques.

Nos résultats a priori contradictoires concernant le rôle de la molécule d'eau pour les différents ligands sont cohérents avec un pouvoir accepteur de liaison H plus faible de l'oxygène de la fonction carbonyle de l'ACh par rapport à l'N sp^2 pyridinique de la nicotine²¹ et avec la diminution du potentiel accepteur de liaison H de l'N sp^2 de

l'épibatidine du fait de la présence du chlore. Cependant, ils doivent être confirmés par une étude explorant plus systématiquement la position de la molécule d'eau dans le site de reconnaissance. Des simulations par dynamique moléculaire ont ainsi récemment montré, aussi bien dans le cas de la nicotine et de la carbamylcholine, un temps de présence très élevé d'une molécule d'eau (environ 92% de la durée de la simulation) entre le site accepteur de liaison H des ligands et les groupes NH et CO des résidus Met 114 et Leu 102 de l'AChBP.⁶ Par ailleurs, cette étude a mis en évidence la flexibilité plus importante de la poche de fixation de l'AChBP dans le cas de la carbamylcholine par rapport à la nicotine.

La Figure 14 montre la superposition des trois complexes les plus stables sur les carbones α du modèle de l'AChBP. Cette représentation met en lumière les différences de position des ligands dans le site de fixation.

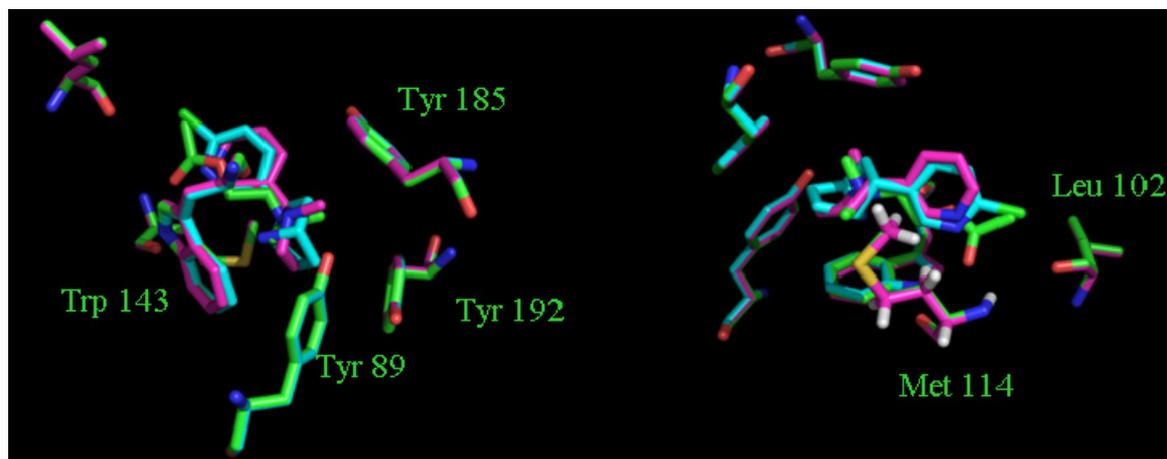


Figure 14- Superposition des trois complexes (en vert : l'acétylcholine, en violet : la nicotine, en bleu : l'épibatidine).

III] Conclusion

L'approche théorique mise en œuvre dans le cadre de ce chapitre, fondée sur l'utilisation d'une méthode mixte QM/QM' (ONIOM2), a permis (i) de mettre en lumière les caractéristiques propres aux interactions des trois ligands avec le modèle du site de fixation

de l'AChBP (ii) de suggérer, sur un plan structural, des paramètres impliqués dans les évolutions énergétiques pouvant rationaliser en partie les variations d'affinité.

Dans le cas de la nicotine, un des chefs de file historique des agonistes des nAChRs, nos résultats, en cohérence avec des données expérimentales et théoriques de la littérature, montrent le rôle stabilisant exercé par une molécule d'eau « relais » assurant la jonction entre le ligand et des résidus de la protéine. En ce qui concerne l'ACh, les données obtenues reflètent la grande flexibilité conformationnelle de la molécule, plusieurs positions de départ et conformations distinctes conduisant à des minima dissemblables, significativement différents sur un plan énergétique. Pour ce ligand, le minimum le plus stable ne correspond pas à un complexe avec une molécule d'eau, des interactions « directes » ACh-AChBP étant issues des simulations. Enfin, l'étude de l'épibatidine met en évidence les contraintes plus importantes exercées par la présence du ligand dans le site de fixation, des contributions significativement plus grandes de termes de relaxation étant obtenues. Ce comportement est en accord avec l'encombrement plus important du cycle saturé de l'épibatidine par rapport au cycle pyrrolidine de la nicotine. Pour cet agoniste également, la structure la plus stable n'implique pas de molécule d'eau. Ce comportement est cohérent avec une diminution significative du potentiel accepteur de liaison H de l'N sp^2 du fait de la présence du chlore en ortho, une interaction supplémentaire mettant en jeu un CH polarisé du cycle pyridine pouvant par ailleurs compenser cette perte de stabilisation.

Dans une seconde partie, nous avons comparé les complexes les plus stables des trois ligands avec l'AChBP et exprimé d'une façon relative la variation d'énergie de fixation obtenue à l'issue de nos calculs, en considérant comme valeur de référence celle du ligand endogène de l'AChBP (et des nAChRs) que constitue l'ACh. Cette méthodologie a conduit à la séquence d'affinité suivante : ACh < Nicotine < Epibatidine, qui correspond à l'ordre

expérimental d'affinité établi par des mesures d'ITC. L'analyse de l'évolution relative de paramètres géométriques clés des interactions ligand-AChBP nous a permis de rationaliser cette évolution. Ainsi, les liaisons H et interactions cation- π impliquant le fragment ammonium des ligands et le Trp 143, sont renforcées (raccourcies) selon cette séquence. Par ailleurs, de nouvelles interactions impliquant des CH polarisés des ligands nicotiques faisant défaut dans le cas de l'ACh sont révélées par nos simulations. Des liaisons H entre de tels groupements et le groupe hydroxyle de la Tyr 89, sont ainsi obtenues, de même qu'une interaction cation- π impliquant des groupements analogues et le noyau aromatique de la Tyr 192.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans ce chapitre, validés par leur bon accord avec les données expérimentales disponibles, fournissent une description structurale précise permettant une rationalisation du comportement observé pour les trois ligands. Cependant, des données contradictoires ayant été obtenues en ce qui concerne le rôle controversé d'une molécule d'eau, ces travaux doivent notamment être complétés par une analyse plus systématique de la position de départ de cette molécule.

Références bibliographiques.

-
- 1) P. H. N. Celie, S. E. Van Rossum-Fikkert, W. J. Van Dijk, K. Brejc, A. B. Smit and T. K. Sixma, *Neuron*, **41**, 907-914 (2004).
 - 2) S. Kone, N. Galland, E.-H. S. Bamba and J.-Y. Le Questel, *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **B64**, 338-347 (2008).
 - 3) P. Rucktooa, A. B. Smit and T. K. Sixma, *Biochem. Pharmacol.*, **78**, 777-787 (2009).
 - 4) A. Babakhani, T. T. Talley, P. Taylor and J. A. McCammon, *Comput. Biol. Chem.*, **33**, 160-170 (2009).
 - 5) A. Akdemir, P. Rucktooa, A. Jongejan, R. v. Elk, S. Bertrand, T. K. Sixma, D. Bertrand, A. B. Smit, R. Leurs, C. de Graaf and I. J. P. de Esch, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 6107-6119 (2011).
 - 6) S. Amiri, M. S. P. Sansom and P. C. Biggin, *Protein Eng., Des. Sel.*, **20**, 353-359 (2007).
 - 7) A. L. Cashin, E. J. Petersson, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 350-356 (2005).
 - 8) P. T. F. Williamson, A. Verhoeven, K. W. Miller, B. H. Meier and A. Watts, *PNAS*, **104**, 18031-18036 (2007).
 - 9) S. M. Sine, P. Quiram, F. Papanikolaou, H. J. Kreienkamp and P. Taylor, *J. Biol. Chem.*, **269**, 8808-8816 (1994).
 - 10) S. B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor and Y. Bourne, *EMBO J*, **24**, 3635-3646 (2005).
 - 11) A. P. Atkinson, A. Planchat, J. Graton, E. Renault, G. Gregoire and J.-Y. Le Questel, *PCCP*, **13**, 2272-2277 (2011).
 - 12) S. B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor and Y. Bourne, *EMBO Journal*, **24**, 3635-3646 (2005).

- 13) Y. Bourne, T. T. Talley, S. B. Hansen, P. Taylor and P. Marchot, *EMBO Journal*, **24**, 1512-1522 (2005).
- 14) N. Le Novere, T. Grutter and J.-P. Changeux, *PNAS*, **99**, 3210-3215 (2002).
- 15) M. Schapira, R. Abagyan and M. Totrov, *BMC Struct. Biol.*, **2**, 1-8 (2002).
- 16) A. Taly, C. Colas, T. r. s. Malliavin, A. Blondel, M. Nilges, P.-J. Corringer and D. Joseph, *J. Mol. Graph. Model.*, **30**, 100-109.
- 17) P. Taylor, T. T. Talley, Z. Radic, S. B. Hansen, R. E. Hibbs and J. Shi, *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1164-1171 (2007).
- 18) X. Huang, F. Zheng, P. A. Crooks, L. P. Dwoskin and C.-G. Zhan, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 14401-14414 (2005).
- 19) X. Huang, F. Zheng, X. Chen, P. A. Crooks, L. P. Dwoskin and C.-G. Zhan, *J. Med. Chem.*, **49**, 7661-7674 (2006).
- 20) C. Colas, X. Brotel, N. Duclert-savatier, M. Nilges, D. Joseph and T. E. Malliavin, *Lett. Drug Des. Discov.*, **9**, 54-62 (2012).
- 21) V. Arnaud, M. Berthelot, M. Evain, J. Graton and J.-Y. Le Questel, *Chem. Eur. J.*, **13**, 1499-1510 (2007).

CONCLUSION

Les nAChRs sont à l'heure actuelle des cibles prometteuses pour le traitement de nombreuses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer, la schizophrénie ou encore la dépendance au tabac. Leur nature transmembranaire, l'existence de différents états interconvertibles, leur grande hétérogénéité structurale et de combinaison rendent leur caractérisation difficile. Dans ce contexte, la découverte d'une protéine présentant un degré d'homologie significatif avec les nAChRs, l'AChBP, puis sa résolution structurale par diffraction des rayons-X, sous forme libre et complexée, ont constitué une avancée décisive dans la connaissance de leur structure. Dans ce travail de thèse, nous avons combiné différentes approches expérimentales et théoriques pour (i) déterminer les caractéristiques structurales, conformationnelles et des propriétés physicochimiques pertinentes pour la compréhension du mode d'action de ligands des nAChRs, de quelques agonistes et/ou modulateurs allostériques des nAChRs (ii) caractériser de façon approfondie un motif original constitué de cinq acides aminés faisant intervenir un réseau de liaisons H complexe dans l'environnement du Trp 143, essentiel dans la fonction biologique de l'AChBP (et des nAChRs) (iii) comparer les variations relatives de paramètres énergétiques et structuraux obtenues lors de la complexation de trois agonistes avec un modèle du site de fixation de l'AChBP, grâce à une méthode mixte de type ONIOM-2 (QM/QM').

Nous avons étudié dans un premier temps les caractéristiques conformationnelles de trois agonistes des nAChRs : la nicotine, l'épibatidine et l'acétylcholine (ACh) et de deux modulateurs allostériques de ces récepteurs, la codéine et la galanthamine. Dans le cas de la nicotine et de l'ACh, seules des méthodes théoriques ont été utilisées. Ces études nous ont permis à la fois de déterminer les caractéristiques de ces composés au niveau de théorie que nous avons sélectionné (DFT avec la fonctionnelle MPWB1K) mais également d'obtenir des

structures de départ pour les calculs ultérieurs dans l'environnement du site de fixation des agonistes dans l'AChBP. Pour l'épibatidine, une étude expérimentale en phase gazeuse par spectroscopie IRMPD au Centre Laser Infrarouge d'Orsay a également été réalisée, les données obtenues ayant été interprétées à l'aide de calculs de chimie quantique. Ces travaux nous ont permis de montrer qu'en phase gazeuse, l'épibatidine existe sous la forme d'un mélange de deux espèces protonées, l'une majoritaire (environ 85 %) sur l'azote bicyclique saturé, l'autre (de l'ordre de 15 %) sur l'azote pyridinique. Par ailleurs, des analyses conformationnelles nous ont permis de caractériser les minima énergétiques des différentes formes protonées. En ce qui concerne la galanthamine et la codéine, modulateurs allostériques des nAChRs, bien que ces deux molécules soient très proches sur le plan structural, nous avons mis en évidence des différences de comportement significatives entre les deux composés en terme d'interactions moléculaires grâce à la combinaison d'approches expérimentales (spectroscopie IRTF, RMN) et théoriques (calculs DFT) et à l'exploitation de structures cristallographiques obtenues par diffraction des rayons X. La confrontation de ces informations avec les tendances observées dans l'environnement de certains de leur(s) récepteur(s) biologique(s) (AChE et AChBP) a effectivement mis en évidence une diversité de contacts des deux ligands avec l'AChE, en particulier avec le résidu « clé » Trp 84, alors qu'au contraire ils paraissent adopter un même mode d'interaction avec l'AChBP.

L'analyse structurale de données cristallographiques provenant de la banque de données des protéines et l'exploitation de calculs de chimie quantique ont été effectuées de façon conjointe et ont révélé, dans une seconde étape, de nouvelles informations sur l'arrangement tridimensionnel et les interactions établies au niveau d'un motif impliqué dans le site actif de l'AChBP. Ce motif comprend le Trp 143 nécessaire à la fixation des agonistes et un résidu Asp 85 apparaissant comme hautement conservé dans la famille des canaux

ioniques, qui, quoique n'interagissant pas directement avec l'agoniste, exerce un rôle déterminant dans la fonction du récepteur. La confrontation des approches mises en œuvre nous a permis de (i) révéler de nouvelles liaisons H intervenant dans l'architecture du motif (ii) montrer l'importance d'un effet coopératif dans le maintien du réseau complexe d'interactions.

Dans une dernière étape, nous avons déterminé les caractéristiques énergétiques et structurales des complexes entre trois ligands (la nicotine, l'ACh et l'épibatidine) et un modèle du site de fixation de l'AChBP, mis au point en sélectionnant tous les résidus compris dans une sphère d'un rayon de 7 Å centrée sur le ligand. Une étude théorique fondée sur l'utilisation d'une méthode mixte ONIOM2 (QM/QM') a ensuite été réalisée sur ce système. Ce travail, qui constitue à notre connaissance la première étude avec une méthode mixte de ces systèmes biologiques importants, nous a permis de décrire de façon précise les variations énergétiques et structurales liées au changement de ligand dans le site de fixation. Pour chaque ligand, plusieurs conformations ont été étudiées, de même que l'influence de la présence d'une molécule d'eau. Pour l'ACh, plus flexible, plusieurs positions de départ ont également été testées. L'approche mise en œuvre, validée par le bon accord avec les données expérimentales disponibles, a conduit à l'ordre d'affinité ACh < Nicotine < Epibatidine, en accord avec la séquence expérimentale. Cette séquence a été rationalisée par l'évolution de paramètres structuraux clés des interactions entre le fragment ammonium des ligands et les résidus de la composante principale du site de l'AChBP, en particulier des interactions par liaison H et cation- π avec le Trp 143. Parallèlement au renforcement des interactions précédentes selon l'ordre d'affinité établi, de nouvelles interactions ont également été mises en évidence pour la nicotine et l'épibatidine par rapport à l'ACh, en cohérence avec la plus grande affinité de ces ligands.

Perspectives

L'utilisation conjointe des approches expérimentales et théoriques mises en œuvre dans le chapitre dédié à l'analyse approfondie des caractéristiques des ligands nous paraît tout d'abord prometteuse pour une compréhension fine de leur comportement, des différences subtiles telles que celles existant dans la galanthamine et la codéine pouvant conduire, comme nous l'avons démontré, à des propriétés physicochimiques et des potentiels d'interactions significativement différents. Par ailleurs, les études menées dans différents environnements (gazeux, solution diluée dans différents solvants, état solide, site de fixation du récepteur) permettent d'appréhender de façon globale les propriétés de ces ligands et donc d'obtenir des informations très complémentaires.

Les caractéristiques structurales du motif de type coude- β mises en évidence dans le chapitre quatre doivent être complétées par des études d'alignement de séquence (i) d'AChBP extraites de différentes espèces (ii) de différents isotypes des nAChRs (en particulier $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$). L'importance de ce motif, démontrée sur la base de ce travail dans le cas de l'AChBP, nécessite en effet des études complémentaires dans le cas des nAChRs.

Les études réalisées dans le chapitre cinq, quoique prometteuses, doivent être complétées et/ou affinées par des investigations avec des modèles plus sophistiqués. Tout d'abord, comme nous l'avons suggéré, la surface d'énergie potentielle d'interaction des différents ligands en présence d'eau doit être explorée de façon plus complète, par exemple par des études de dynamique moléculaire réalisées en amont. Par ailleurs, sur un plan plus fondamental, l'étude des interactions d'autres formes chimiques des ligands, en particulier des isomères optiques lorsqu'il en existe (nicotine, épibatidine) serait intéressante. D'autre part, la mise en œuvre d'un protocole ONIOM2 plus élaboré, qui permettrait la relaxation géométrique d'un plus grand nombre d'atomes, affinerait les premiers résultats obtenus dans

ce travail. Enfin, la décomposition de l'énergie totale de fixation en différentes paires ligand-résidu permettrait de déterminer la contribution relative des différents acides aminés du site. Dans l'ensemble, des travaux tels que ceux présentés dans le cadre de cette thèse devraient être utiles au développement rationnel de nouveaux ligands des nAChRs. La complexité de ces cibles et les variations énergétiques mises en jeu lors des processus de reconnaissance moléculaire récepteur-ligands restent cependant toujours des défis importants.

ANNEXES

Abréviations

ACh : acétylcholine

AChBP : acetylcholine binding protein

AChE : acétylcholinestérase

Asp : aspartate

Cod : codéine

Cys : cystéine

DEC : domaine extracellulaire

DIC: domaine intracellulaire

DTM : domaine transmembranaire

Gal : galanthamine

His : histidine

IRMPD : Infrared Multiphoton Dissociation (dissociation multiphotonique infrarouge)

IRTF : infrarouge à transformée de Fourier

LBD : ligand binding site

Liaison H : liaison hydrogène

Leu : leucine

LGIC : ligand-gated ion channel (canaux ioniques activés par des ligands)

mAChRs : récepteurs muscariniques de l'acétylcholine

MA : maladie d'Alzheimer

Met : Méthionine

MP : maladie de Parkinson

nAChRs : récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine

PDB : Protein Data Bank

RMN : résonance magnétique nucléaire

Ser : sérine

TDA : trouble déficitaire de l'attention

Thr : thréonine

Trp : tryptophane

Tyr : tyrosine

Val : valine

Publications

Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, **13**, 2272–2277

www.rsc.org/pccp

PAPER

Structural features and protonation site of epibatidine in the gas phase: an investigation through infrared multiphoton dissociation spectroscopy and computational chemistry

Alexandre P. Atkinson,^a Aurélien Planchat,^a Jérôme Graton,^a Eric Renault,^{ab} Gilles Grégoire^b and Jean-Yves Le Questel^{*a}

Received 25th August 2010, Accepted 4th November 2010

DOI: 10.1039/c0cp01605e

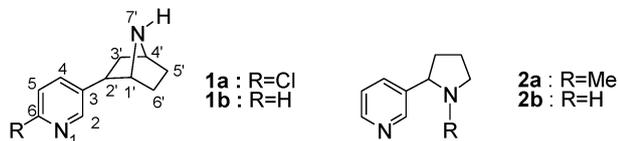
The gas phase structures of epibatidine, one of the most potent agonists of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), are determined by means of infrared multiphoton dissociation (IRMPD) spectroscopy and quantum chemistry calculations. Comparison of the experimental and theoretical spectra provides evidence that about 15% of epibatidine is protonated on the Nsp² nitrogen in the gas phase. In contrast, the computational study of deschloroepibatidine shows that in the gas phase, the molecule is present only protonated on the Nsp² nitrogen. The main minima of the Nsp² protonated forms of the two molecules are strongly stabilized by intramolecular CH...Nsp³ hydrogen bonds. The fundamental insights obtained in the present study on these two important nAChRs agonists show how subtle chemical modifications can have a deep impact on important physicochemical properties.

1. Introduction

Epibatidine **1a** (Scheme 1), first isolated by Daly and co-workers from the skin of the Ecuadorean poison frog, *Epipedobates tricolor*,¹ has attracted considerable interest since it is one of the most potent agonists of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs).² With nicotine and acetylcholine, few other nicotinic agents have had such an influence on nACh receptor research as has epibatidine.³ Though its high toxicity prevents any therapeutic applications, it has provided an attractive lead for the design of new ligands selective for distinct nAChR subtypes and possibly for the treatment of nervous system disorders.^{4–7} Furthermore, in the case of nicotinoid ligands, it has been shown recently that very subtle effects only “observable” at the atomic level have proved very

crucial for understanding the basis for their differential action on brain compared with muscle ACh receptors.⁸ The therapeutic potential of epibatidine has led to investigations devoted to the characterisation of its conformational properties^{9–11} and of its interactions, through X-ray crystallography, with the Acetylcholine Binding protein (AChBP), a surrogate of the ligand binding domain of nAChRs.^{12,13} However, the low resolution of the structure of the epibatidine–AChBP complex (3.40 Å)¹³ prevents a detailed analysis, at the atomic level, of the binding features of this ligand. From a molecular modeling point of view, several studies aimed at elucidating the binding of epibatidine and other agonists to nAChRs isotypes have been published, in order to gain insights, at the atomic level, on the geometric and energetic features of their recognition by the nAChRs.^{14–16} However, the results of such investigations can be strongly dependent on the level of theory used, in particular on the parameters of the force field. In this context, a detailed knowledge of the conformational features of the ligand can be an important prerequisite.

Infrared Multiphoton Dissociation (IRMPD) spectroscopy is a powerful tool for the structural elucidation of small molecules of biological interest in the gas phase, when used in conjunction with quantum chemistry calculations. IRMPD can also be used to determine the protonation site of biomolecular ions, e.g. aminoacids and small peptides in the gas phase.^{17–20} In the case of nAChRs ligands such as nicotine **2a** (Scheme 1), IRMPD spectroscopy has thus shown that, contrary to the Nsp³ protonation in water, the molecule is protonated on the Nsp² nitrogen in the gas phase.²¹ This result is in contrast to previous conclusions learnt from gas phase



Scheme 1 Chemical structures of epibatidine (**1a**), deschloroepibatidine (**1b**), nicotine (**2a**) and nornicotine (**2b**).

^a Laboratoire CEISAM, UMR CNRS 6230, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, 2, rue de la Houssinière, BP 92208, Nantes F-44322 Cedex 3, France.
E-mail: Jean-Yves.Le-Questel@univ-nantes.fr;

Fax: +33 (0)2 51 12 55 67; Tel: +33 (0)2 51 12 55 63

^b Laboratoire de Physique des Lasers, UMR CNRS 7538, Institut Galilée, Université Paris 13, 99, Avenue J. B. Clément, Villetaneuse, F-93430, France

basicity measurements by Fourier Transform Ion cyclotron resonance (FT-ICR), which had proposed that nicotine exists in the gas phase as a mixture of Nsp^3 and Nsp^2 protonated forms.²² On the contrary, nornicotine **2b** (Scheme 1) was unambiguously found to exist only in the Nsp^2 protonated form.²² These studies have shown that the intrinsic basicity of nicotinic ligands is strongly dependent on structural effects such as intramolecular hydrogen bonding and polarisability effects. Indeed, it has been shown through a theoretical investigation that nicotinoid ligands with a secondary amino nitrogen should be protonated on the pyridine nitrogen in the gas phase, except when electron-withdrawing substituents on the pyridine ring decrease the intrinsic pyridine basicity and therefore favour the Nsp^3 nitrogen.²³

In the present study, we report the structural features of protonated epibatidine in the gas phase through a combined experimental and theoretical approach. Apart from the obvious interest of such properties for this ligand, the question of the protonation site of the molecule in the gas phase is challenging because of the chemical environment of the two nitrogen atoms. Epibatidine possesses a secondary amino nitrogen that should be, in the gas phase, a weaker protonation site than the pyridine nitrogen. However, the presence of the chlorine substituent on the pyridine ring might induce a decrease of its proton affinity giving finally priority to the amino nitrogen. The case of deschloroepibatidine **2b**, which has no chlorine substituent on the pyridine ring, has therefore also been addressed computationally. The data reported herein provide evidence that in the gas phase, epibatidine exists as a mixture of Nsp^2 and Nsp^3 protonated forms, the first representing about 15% of the whole species. Conversely, according to the theoretical calculations, deschloroepibatidine **1b** exists in the gas phase only in the Nsp^2 protonated form.

2. Experimental and theoretical methods

The experiments have been carried out using the Free Electron Laser (FEL) facility of CLIO (Orsay, France) coupled to an electrospray ionization-ion trap mass spectrometer (Bruker Esquire3000+). The experimental procedure used in the present work has been described previously.²⁴ The ions selected according to their mass absorb photons that bring them from a $\nu_i = 0$ to a $\nu_f = 1$ vibrational state. Internal vibrational redistribution (IVR) takes place between two photon absorptions and brings back ions to their initial $\nu_i = 0$ vibrational state while the acquired internal energy is redistributed over other modes. The stepwise absorption of multiple photons induces then dissociation. Infrared absorption is next monitored through detection of the ionic fragmentation yield. The average power of the FEL is in the order of 600 mW and the irradiation time was set to 500 ms in order to ensure a good signal-to-noise ratio and to avoid a saturation effect. Within these experimental conditions, the fragmentation rate is relatively weak and only reaches 0.04 for the most intense transitions. It is worth noting that in IRMPD experiments, fragmentation yields involve highly excited vibrational states and thus depend upon IVR rates. An IRMPD spectrum is thus not identical to a linear absorption

spectrum but, in a first approximation, it reflects the true IR absorption spectrum at least for the band position.

Epibatidine was prepared by dissolution of the commercial dihydrochloride hydrate salt in water. Ions were produced from the solution using electrospray ionization. The desired ionic species were isolated and confined within the ion trap where they then experienced multiple collisions with helium buffer gas (10^{-5} mbar in the Paul trap) for 40 ms prior to irradiation by the IR-FEL. The IR-FEL beam was then focused and introduced into the center of the ion trap of the mass spectrometer. The resulting mass spectra were recorded following laser irradiation and ten mass spectra were accumulated for each wavelength. IRMPD spectra were acquired by scanning the wavelength in steps of $\sim 4 \text{ cm}^{-1}$.

The interpretation of the experimental gas phase IRMPD spectra has been realised through quantum chemistry calculations. All the calculations were carried out using the Gaussian03²⁵ and Jaguar6.0²⁶ packages. In a first step, systematic scans of the potential energy surfaces of epibatidine in its various protonated forms (monoprotonated on Nsp^3 or Nsp^2) have been realised at the HF/6-31G(d,p) level. The rotation around the intercyclic C3–C2' bond, which appears to be the main degree of freedom, has been studied through the C2–C3–C2'–C3' dihedral angle (Scheme 1). The geometry of the minima found on the energetic profiles has subsequently been optimised with DFT calculations. For deschloroepibatidine, the chlorine atom was substituted by an hydrogen atom in all minima identified for the various protonated forms of epibatidine, and a full optimisation of their geometries was carried out. We have selected the B3PW91 functional which has recently been used with success for the analysis of IRMPD results for nicotinic ligands.²¹ These calculations have been made with a 6-311++G(d,p) basis set. The vibrational frequencies for each minimum of the various protonated forms of epibatidine and deschloroepibatidine have then been computed at the same level of theory (B3PW91/6-311++G(d,p)). Since intramolecular hydrogen bonding interactions have been shown to occur in nicotinic ligands in the gas phase,²² single point calculations with the Local-MP2 (LMP2) methodology have been realised on the previously optimised geometries with a triple zeta basis set: LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p). Indeed, LMP2 calculations have been shown to reduce greatly the BSSE contribution,²⁷ particularly difficult to estimate in the case of intramolecular hydrogen-bond interactions. The infrared absorption spectra, covering the whole experimental spectral range from 1000 to 1800 cm^{-1} , have afterwards been simulated from the calculated frequencies ν_{cal} using the B3PW91/6-311++G** level with the linearly dependent scaling factor $\nu_{\text{exp}} = 0.955\nu_{\text{cal}} + 25.7$ (in cm^{-1}). For this part of the procedure, each line of the spectrum is convoluted by a Lorentzian (15 cm^{-1} fwhm). The linearly dependent scaling factor used has recently provided fair agreements between predicted and experimental spectra for nicotine and acetylcholine in the gas phase.^{21,28} The IRMPD experiments being conducted at 300 K, for a given ionic species, different populated conformations are simultaneously observed and the experimental IRMPD spectrum is consequently a weighted sum of the different corresponding spectral contributions. For this reason, the

theoretical spectra computed for the various conformations of the different protonated species have been weighted according to their computed Gibbs energies ΔG by using a Boltzmann distribution, as applied by Macleod *et al.* for the determination of the conformational features of carbohydrates from the gas phase to an aqueous solution.²⁹

3. Results and discussion

Structural features of epibatidine and deschloroepibatidine cations

Epibatidine and deschloroepibatidine **1a** and **1b** appear as fairly rigid molecules since their main degrees of freedom is the rotation around the intercyclic bonds. In the gas phase, the molecules can be protonated either on the pyridine or on the amino nitrogen, these chemical species being, respectively, designated hereafter as Nsp^2+ and Nsp^3+ . For Nsp^3+ , two distinct categories of conformations are possible. These structures are homologs to those pointed by Elmore and Dougherty in the case of nicotine³⁰ and reported by Graton *et al.* for other nicotinoid ligands.²² They distinguish themselves by the relative orientations of the two nitrogen atoms with respect to the intercyclic bond. When the two nitrogen atoms are on the same side, the conformer is labeled A, whereas it is designated as B when they are opposite. A second degree of freedom appears when the protonation occurs on the pyridine nitrogen. It refers to the orientation of the NH bond of the amino nitrogen with respect to the pyridine

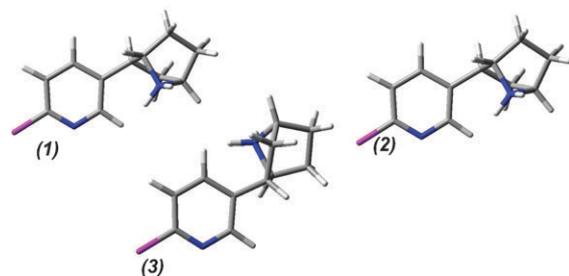


Fig. 1 Optimized geometries of the three energetic minima of the Nsp^3+ protonated form of epibatidine at the B3PW91/6-311++G(d,p) level.

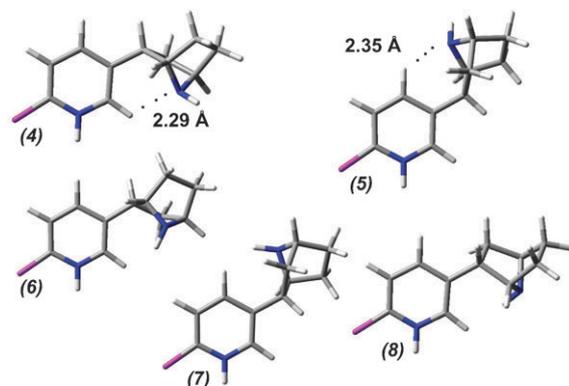


Fig. 2 Optimized geometries of the five energetic minima of the Nsp^2+ protonated form of epibatidine at the B3PW91/6-311++G(d,p) level.

Table 1 Relative gas phase energy values (in kJ mol^{-1}) and inter-ring dihedral angles (in degrees) computed for the various monoprotonated forms of epibatidine **1a**

| Conformer type | B3PW91 ^a | | | LMP2//B3PW91 ^b | |
|-------------------------------------|---------------------|------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | φ^c | ΔG | P_i (%) | ΔG | P_i (%) |
| Nsp^3+ A (1) | 273 | 3.51 | 15.6 | 0.00 | 57.4 |
| Nsp^3+ A (2) | 350 | 6.41 | 4.8 | 2.02 | 25.5 |
| Nsp^3+ B (3) | 86 | 7.19 | 3.5 | 8.79 | 1.7 |
| Nsp^2+ Atrans (4) | 308 | 0.00 | 64.0 | 3.91 | 11.8 |
| Nsp^2+ Btrans (5) | 124 | 4.12 | 12.1 | 6.87 | 3.6 |
| Nsp^2+ Asyn (6) | 276 | 29.77 | 0.0 | 33.96 | 0.0 |
| Nsp^2+ Bsyn (7) | 101 | 29.22 | 0.0 | 34.46 | 0.0 |
| Nsp^2+ Asyn (8) | 351 | 33.14 | 0.0 | 35.59 | 0.0 |

^a B3PW91/6-311++G(d,p). ^b LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p).
^c φ = C2–C3–C2'–C3' dihedral angle.

Table 2 Relative gas phase energy values (in kJ mol^{-1}) and inter-ring dihedral angles (in degrees) computed for the various monoprotonated forms of deschloroepibatidine **1b**

| Conformer type | B3PW91 ^a | | | LMP2//B3PW91 ^b | |
|--------------------------------------|---------------------|------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | φ^c | ΔG | P_i (%) | ΔG | P_i (%) |
| Nsp^3+ A (1') | 275 | 22.72 | 0.0 | 15.95 | 0.1 |
| Nsp^3+ A (2') | 348 | 25.81 | 0.0 | 17.68 | 0.1 |
| Nsp^3+ B (3') | 85 | 26.13 | 0.0 | 28.13 | 0.0 |
| Nsp^2+ Atrans (4') | 307 | 0.00 | 86.5 | 0.00 | 85.4 |
| Nsp^2+ Btrans (5') | 124 | 4.61 | 13.5 | 4.42 | 14.3 |
| Nsp^2+ Asyn (6') | 278 | 29.84 | 0.0 | 30.86 | 0.0 |
| Nsp^2+ Bsyn (7') | 100 | 28.67 | 0.0 | 30.82 | 0.0 |
| Nsp^2+ Asyn (8') | 348 | 32.29 | 0.0 | 31.41 | 0.0 |

^a B3PW91/6-311++G(d,p). ^b LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p).
^c φ = C2–C3–C2'–C3' dihedral angle.

ring. The conformers are then labeled as *syn* or *anti*. The optimised geometries found for the Nsp^3+ ((**1**) to (**3**)) and Nsp^2+ ((**4**) to (**8**)) forms of epibatidine are shown in Fig. 1 and 2, respectively. The energetic parameters computed at the B3PW91 and LMP2 levels of theory, the corresponding probabilities of existence (P_i) and the intercyclic C2–C3–C2'–C3' dihedral angles are gathered in Tables 1 and 2 for epibatidine and deschloroepibatidine, respectively. A comparison of the dihedral angles φ shows that identical conformers are found for both molecules. For the amino protonated form, the minima observed at 270° (**1,1'**) and 350° (**2,2'**) correspond to A conformers, while the third structure, at 90° (**3,3'**), corresponds to a B one. The energetics reported in Tables 1 and 2 clearly indicate that among them, those close to 270° are for both molecules the lowest energy minima. However, the Gibbs energies computed for these three Nsp^3+ conformers in the case of epibatidine are all situated within a narrow energetic range, the variation in free energy being 4 and 9 kJ mol^{-1} , respectively, at the B3PW91 and LMP2//B3PW91 levels, suggesting that epibatidine in the Nsp^3+ form should exist in the gas phase as a mixture of all minima. These results confirm the tendencies pointed out by Campillo *et al.* using various levels of theory.⁹ The same trends are observed in Table 2 for deschloroepibatidine, the variation in free energies being 3 and 12 kJ mol^{-1} , respectively, at the B3PW91 and LMP2//B3PW91 levels for the same conformers. On the other hand,

the optimised geometries of Nsp^{2+} epibatidine and deschloroepibatidine can be splitted up into *anti* and *syn* isomers, as shown in Fig. 2 on the example of epibatidine for structures ((4) and (5)) and ((6), (7) and (8)), respectively. Table 1 shows that the *trans* isomers of epibatidine are strongly preferred energetically, the *syn* isomers being higher in energy from about 30 to 36 kJ mol^{-1} depending on the level of theory. This behaviour also applies to deschloroepibatidine, the *syn* isomers being located at about 29 to 32 kJ mol^{-1} above the *trans* isomers, according to the level of theory. Fig. 2 reveals that this conformational preference can be attributed to the existence of intramolecular $\text{CH}\cdots\text{Nsp}^3$ hydrogen-bonds. Such interactions have been pointed out in the gas phase in Nsp^2 protonated nicotine and nornicotine²² and have also been suggested to occur in the neutral form of epibatidine through a thorough computational study.⁹ The present results clearly indicate that this interaction partly explains the conformational preferences observed in the gas phase of the Nsp^{2+} form of epibatidine and deschloroepibatidine. Fig. 2 and Tables 1 and 2 further demonstrate that the *anti* A ((4) (4')) and B ((5), (5')) isomers behave differently, the $\text{CH}\cdots\text{Nsp}^3$ hydrogen bond being significantly shorter (2.29 Å) in (4) compared to the one occurring in (5) (2.35 Å). This stronger interaction leads to a greater conformer population for (4) and (4'), whatever the level of theory. This trend is probably due to the better hydrogen bond donating ability of the CH in *ortho* of the positive Nsp^2 nitrogen in (4) compared to the one involved in the hydrogen bond in (5), located in *para*.

Site of protonation of epibatidine and deschloroepibatidine

The question of the relative proportions of the two protonated forms of epibatidine and deschloroepibatidine can be addressed by considering the theoretical Gibbs energies computed at the B3PW91/6-311++G(d,p) and LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p) levels. However, Table 1 shows that these energetic parameters, and the resulting conformer populations (P_i), are markedly different at the two levels of theory in the case of epibatidine. Indeed, the Nsp^{2+} form is predicted to be the main one (the total population of the Nsp^{2+} conformers is of about 76%) at the DFT level. In contrast, the Nsp^{3+} species are predicted to be the preferred species (total population of about 85%) at the LMP2 level of theory. These discrepancies could be attributed to the energetic overstabilisation of the protonated Nsp^{2+} conformers with intramolecular $\text{CH}\cdots\text{Nsp}^3$ hydrogen bonds at the DFT level (Table 1: (4) and (5) conformers). Indeed, the DFT results can suffer from BSSE due to the intramolecular hydrogen bond interaction and LMP2 calculations have been shown to correct this deficiency.^{31–35} Table 2 shows that the energetic correction brought by the LMP2 calculations follows the same trend for all the conformations of epibatidine and deschloroepibatidine. Thus, (1)–(2) and (1')–(2') conformers of epibatidine and deschloroepibatidine are stabilized by the LMP2 calculations. This is not the case for (4)–(8) and (4')–(8') conformers, for which the LMP2 correction induces a destabilization varying from about 3 to 5 kJ mol^{-1} for epibatidine whereas it comes to very close energetics in the case of deschloroepibatidine. In fact, the weak difference in energy between the Nsp^{3+} and Nsp^{2+}

species in the case of epibatidine (from 3.5 to 7.2 kJ mol^{-1}) compared to deschloroepibatidine (from 22.7 to 26.1 kJ mol^{-1}) (compare the energy difference between (4) and (1)–(3) conformers and between (4') and (1')–(3'), respectively) leads to the predilection of different conformations for the two molecules. In our opinion, these results can be attributed to the chlorine atom effect, which induces a decrease of the basicity of the Nsp^2 nitrogen, and consequently leads to a stabilization of the Nsp^{3+} conformers. In any case, we believe that the LMP2 results are more reliable to estimate the relative proportions of Nsp^{2+} and Nsp^{3+} forms of epibatidine and deschloroepibatidine in the gas phase. From the theoretical data, epibatidine should exist as a mixture of Nsp^{2+} (15%) and Nsp^{3+} (85%) in the gas phase, whereas deschloroepibatidine appears to exist only in the Nsp^{2+} form.

IRMPD spectra

The spectral features of the three Nsp^{3+} conformers ((1), (2) and (3)) of epibatidine are quasi-identical. This observation can also be made for the computed spectra of the populated Nsp^{2+} conformers ((4) and (5)) of the molecule. To compare the experimental IRMPD spectrum of epibatidine (Fig. 3a) to the theoretical spectra, we have therefore selected the computed spectrum of the main Nsp^{3+} (1) and Nsp^{2+} (4) conformers in Fig. 3b and c, respectively. Experimentally, four intense bands are observed, positioned at 1121, 1151, 1457 and 1579 cm^{-1} . These bands are satisfyingly reproduced in the calculated spectra of the three Nsp^{3+} conformers. The first two, located on the low frequency range, can be assigned to strongly coupled C–Cl stretching and C–C–H in-plane bending modes, respectively. The band at 1457 cm^{-1} can safely be ascribed to in-plane bending vibrations of the methylene groups involved in the 7-azabicyclo[2.2.1]heptane moiety. Lastly, the band at 1579 cm^{-1} can be assigned to the in-plane bending vibrations of the NH_2^+ group of the azabicyclo[2.2.1]heptane ring in Nsp^{3+} and the pyridine ring vibrations. A new band at 1523 cm^{-1} , absent in the calculated

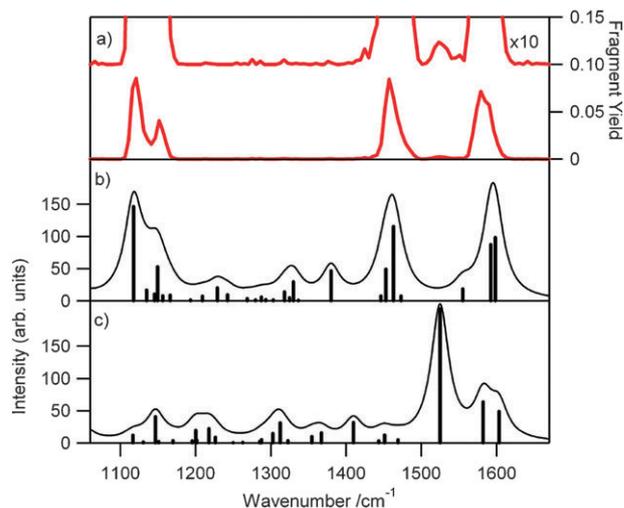


Fig. 3 Comparison between (a) the experimental IRMPD spectrum of protonated epibatidine and simulated spectra corresponding to the two lowest-energy conformations: (b) Nsp^{3+} conformer (1) and (c) Nsp^{2+} conformer (4) calculated at the B3PW91/6-311++G(d,p) level.

spectrum of the Nsp^3+ isomers, becomes apparent when the vertical axis of the experimental spectrum is expanded (top spectrum of Fig. 3a). This absorption is attributable to the coupling of the stretching vibrations of the pyridine ring bonds with in-plane bending vibrations of the aromatic CH vibrations specific to Nsp^2+ (Fig. 3c). This band suggests that the Nsp^2+ form is also present in the gas phase.

It is worth noticing that the bands appearing between 1200 and 1400 cm^{-1} in the computed spectra of the main Nsp^3+ and Nsp^2+ conformers (Fig. 3b and c, respectively) are not at all visible experimentally (Fig. 3a). The first two, located at about 1200 and 1300 cm^{-1} , correspond to out-of-plane wagging vibrations of the methylene groups of the 7-azabicyclo[2.2.1]heptane ring. The third one, appearing at 1400 cm^{-1} , can be assigned to in-plane bending of pyridinic CH groups coupled with out-of-plane bending of the saturated CH group located at the inter-ring junction. The fact that these absorptions are not observable on the experimental spectrum illustrates the difference between an IRMPD spectrum and a linear absorption spectrum, the experimental intensities of an IRMPD spectrum being related to the spectral dependence of the fragmental yields.

To assess the presence of both Nsp^3+ and Nsp^2+ forms, a calculated spectrum taking into account the weighted contribution of all the epibatidine energetic minima has been computed through a Boltzmann distribution based on the free energies computed at the LMP2//B3PW91 level. The fair agreement found by superposition of this spectrum with the experimental IRMPD spectrum observed in Fig. 4 confirms this interpretation.

The computed spectrum of deschloroepibatidine, taking into account the weighted contribution of the two minima ((4') and (5')), is shown in Fig. 4c. It is clearly seen that the main component of the spectrum is located at 1535 cm^{-1} . This band, homologous to the one observed at 1523 cm^{-1} in the case of epibatidine, corresponds to the intense stretching

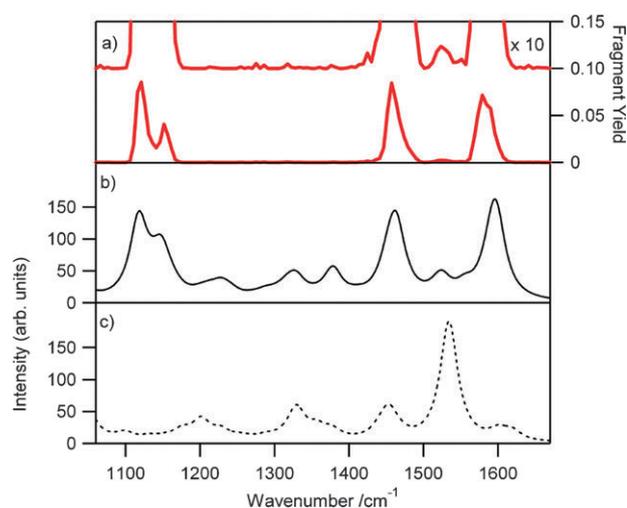


Fig. 4 Comparison between (a) the experimental IRMPD spectrum of protonated epibatidine and the simulated spectra corresponding to the average of the spectra for the minima of (b) epibatidine and (c) deschloroepibatidine weighted through a Boltzmann distribution based on the free energies calculated at the LMP2/cc-pVTZ//B3PW91/6-311++G(d,p) level.

vibrations of the pyridine ring bonds coupled with in-plane bending vibrations of the aromatic CH vibrations specific to Nsp^2+ . The weak band at 1602 cm^{-1} can be assigned to the pyridine ring vibrations. The band located at 1453 cm^{-1} is composed of in-plane bending vibrations of methylene groups of the 7-azabicyclo[2.2.1]heptane moiety coupled with in-plane bending vibrations of the pyridinic CH. Lastly, the bands at 1201 and 1329 cm^{-1} can be assigned to rocking vibrations of methylene groups of the 7-azabicyclo[2.2.1]heptane ring.

Fig. 4, which compares the weighted computed spectra of epibatidine and deschloroepibatidine to the experimental IRMPD spectrum of epibatidine, allows us to distinct unambiguously the gas phase protonation site of the two molecules. In agreement with the trends pointed out in a thorough theoretical investigation on the gas phase protonation site of nicotinoid ligands,²³ the protonation site of deschloroepibatidine, which has a secondary amino nitrogen, is the pyridine nitrogen. In contrast, epibatidine appears preferentially protonated on the Nsp^3 nitrogen of the 7-azabicyclo[2.2.1]heptane ring, the population of the Nsp^3+ and Nsp^2+ species being, respectively, 85 and 15%. We attribute this partial reverse of the gas phase protonation site to the strong electron-attracting effect of the chlorine atom which induces a decrease of the intrinsic basicity of the Nsp^2 pyridine nitrogen.

Conclusions

We have shown, through IRMPD spectroscopy and quantum chemistry calculations, that epibatidine, one of the most potent agonist of nAChRs, exists in the gas phase as a mixture of Nsp^2+ (about 15%) and Nsp^3+ (85%) protonated forms whereas deschloroepibatidine appears to exist only protonated on the pyridine Nsp^2 nitrogen. These results are in agreement with the conclusions drawn from a theoretical investigation of the gas phase protonation site of nicotinoid ligands.²³ Furthermore, they show how subtle modification of chemical structure can lead to significant changes in terms of important physicochemical properties.

From a structural point of view, we have shown that the Nsp^2+ species of the two ligands are strongly stabilized by the existence of $\text{CH}\cdots\text{Nsp}^3$ hydrogen bonds.

From a theoretical point of view, the discrepancies observed between the DFT and LMP2 conformers free energies in the case of epibatidine lead us to recommend LMP2//DFT calculations for such investigations, the LMP2 method having proven to overcome some deficiencies of DFT, in particular for BSSE corrections in case of the occurrence of hydrogen bond interactions.

Finally, we believe that the information obtained in the present work is important for a full characterization of the physicochemical properties of nAChRs ligands, for example to set up quantitative structure–activity relationships, but also in view of a deep understanding of their interactions with their biological targets.

Acknowledgements

The authors thank the CLIO team for their technical help. This work was granted access to the HPC resources of

[CCRT/CINES/IDRIS] under the allocation 2010-x2010085117 made by GENCI (Grand Equipement National de Calcul Intensif). The authors also gratefully acknowledge the CCIPL (Centre de Calcul Intensif des Pays de la Loire) for a grant of computer time. E. R. acknowledges the CNRS and the Université de Nantes for the “accueil en délégation au CNRS” at the LPL (Laboratoire de Physique des Lasers).

References

- 1 T. F. Spande, H. M. Garraffo, M. W. Edwards, H. J. C. Yeh, L. Pannell and J. W. Daly, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3475–3478.
- 2 A. A. Jensen, B. Frolund, T. Liljefors and P. Krosggaard-Larsen, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 4705–4745.
- 3 M. Dukat and R. A. Glennon, *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2003, **23**, 365–378.
- 4 M. N. Romanelli, P. Gratteri, L. Guandalini, E. Martini, C. Bonaccini and F. Gualtieri, *ChemMedChem*, 2007, **2**, 746–767.
- 5 F. I. Carroll, *Heterocycles*, 2009, **79**, 99–120.
- 6 G. R. Abdrakhmanova, F. I. Carroll, M. I. Damaj and B. R. Martin, *Neuropharmacology*, 2008, **55**, 1287–1292.
- 7 F. I. Carroll, T. P. Robinson, L. E. Brieady, R. N. Atkinson, S. W. Mascarella, M. I. Damaj, B. R. Martin and H. A. Navarro, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 6383–6391.
- 8 X. Xiu, N. L. Puskar, J. A. P. Shanata, H. A. Lester and D. A. Dougherty, *Nature*, 2009, **458**, 534–537.
- 9 N. Campillo, J. Antonio Paez, I. Alkorta and P. Goya, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1998, 2665–2670.
- 10 Z. L. Wei, Y. X. Xiao, C. George, K. J. Kellar and A. P. Kozikowski, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 3878–3881.
- 11 Z. L. Wei, C. George and A. P. Kozikowski, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 3847–3850.
- 12 J. Shi, J. R. Koeppe, E. A. Komives and P. Taylor, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 12170–12177.
- 13 S. B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor and Y. Bourne, *EMBO J.*, 2005, **24**, 3635–3646.
- 14 X. Huang, F. Zheng, P. A. Crooks, L. P. Dwoskin and C.-G. Zhan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 14401–14414.
- 15 N. Le Novere, T. Grutter and J.-P. Changeux, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 3210–3215.
- 16 X. Huang, F. Zheng, X. Chen, P. A. Crooks, L. P. Dwoskin and C.-G. Zhan, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 7661–7674.
- 17 R. Wu and T. B. McMahon, *J. Phys. Chem. B*, 2009, **113**, 8767–8775.
- 18 R. Wu and T. B. McMahon, *ChemPhysChem*, 2008, **9**, 2826–2835.
- 19 J. S. Prell, J. T. O'Brien, J. D. Steill, J. Oomens and E. R. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 11442–11449.
- 20 R. C. Dunbar, J. D. Steill, N. C. Polfer and J. Oomens, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2009, **283**, 77–84.
- 21 M. Seydou, G. Gregoire, J. Liquier, J. Lemaire, J. P. Schermann and C. Desfrancois, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 4187–4195.
- 22 J. Graton, M. Berthelot, J.-F. Gal, S. Girard, C. Laurence, J. Lebreton, J.-Y. Le Questel, P.-C. Maria and P. Naus, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 10552–10562.
- 23 M. Koné, B. Illien, C. Laurence, J.-F. Gal and P.-C. Maria, *J. Phys. Org. Chem.*, 2006, **19**, 104–114.
- 24 G. Gregoire, M. P. Gageot, D. C. Marinica, J. Lemaire, J. P. Schermann and C. Desfrancois, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, **9**, 3082–3097.
- 25 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, J. T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez and J. A. Pople, *Gaussian 03, Revision C.02*, Gaussian Inc., Wallingford CT, 2004.
- 26 L. L. C. Schrödinger, Jaguar, New York, NY, 2005.
- 27 S. Saebo, W. Tong and P. Pulay, *J. Chem. Phys.*, 1993, **98**, 2170–2175.
- 28 E. Gornicka, J. E. Rode, E. D. Raczynska, B. Dasiewicz and J. C. Dobrowolski, *Vib. Spectrosc.*, 2004, **36**, 105–115.
- 29 N. A. Macleod, C. Johannessen, L. Hecht, L. D. Barron and J. P. Simons, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2006, **253**, 193–200.
- 30 D. E. Elmore and D. A. Dougherty, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 742–747.
- 31 M. Schuetz, G. Rauhut and H.-J. Werner, *J. Phys. Chem. A*, 1998, **102**, 5997–6003.
- 32 J. M. Pedulla, F. Vila and K. D. Jordan, *J. Chem. Phys.*, 1996, **105**, 11091–11099.
- 33 F. Jensen, *J. Chem. Theory Comput.*, 2010, **6**, 100–106.
- 34 A. Reyes, L. Fomina, L. Rumsh and S. Fomine, *Int. J. Quantum Chem.*, 2005, **104**, 335–341.
- 35 R. M. Balabin, *J. Chem. Phys.*, 2010, **132**, 231101.

Structural Features and Hydrogen-Bond Properties of Galanthamine and Codeine: An Experimental and Theoretical Study

Alexandre P. Atkinson, Evelyne Baguet, Nicolas Galland, Jean-Yves Le Questel, Aurélien Planchat, and Jérôme Graton*^[a]

Abstract: Structural features of galanthamine and codeine, two allosteric potentiating ligands of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), have been investigated through experimental studies in solution by FTIR and NMR spectroscopy and by quantum chemical calculations in the isolated state. The infrared spectra accumulated in solvents of various polarities show that the intramolecular OH...O hydrogen bond in galanthamine is stronger than the corresponding interaction in codeine. Molecular electrostatic potential calculations allow rationalisation of the experimental trends. NOE measurements on the two ligands in the same solvent range show significant differences. In apolar solvents, the NMR spectroscopic data indicate the occurrence of CH...O hydrogen-bond interactions,

whereas in the more polar solvents, a *trans* orientation of the methoxy group with respect to the furanyl oxygen atom is favoured. A natural bond orbital (NBO) analysis provides evidence that these stabilising interactions originate in the hyperconjugation between the lone pairs of the furanyl oxygen atoms, n(O), and the methoxy antibonding $\sigma^*(\text{C}-\text{H})$ orbitals within the two molecules. Despite the strong structural similarities between the two allosteric modulators, FTIR equilibrium constants measurements of hydrogen-bond complexation combined with

quantum chemistry calculations point out the significant increase of hydrogen-bond accepting strength of galanthamine relative to codeine. This increase is mainly assignable to the stronger hydrogen-bond basicity of the hydroxyl group, and to a lesser extent to the higher hydrogen-bond accepting strength of the amino nitrogen of galanthamine in comparison with the corresponding groups of codeine. An analysis of the interactions that occur between the two ligands and acetylcholine esterase (AChE) suggests significant differences with Trp84, a key component of the AChE catalytic active site. In contrast, both ligands appear to interact similarly with acetylcholine binding protein (AChBP).

Keywords: codeine • FTIR spectroscopy • galanthamine • hydrogen bonds • NMR spectroscopy • quantum chemistry

Introduction

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) have been shown to be involved in the pathogenesis of several diseases of the central nervous system (CNS). The neurodegenerative Alzheimer's and Parkinson's diseases are thus associated with altered numbers of nAChR subtypes. nAChRs are also responsible for tobacco dependence and behavioural effects of nicotine.^[1] The design of drugs with minimum side effects that specifically target single nAChR subtypes requires detailed structural information on the various nAChR subtypes and on their complexes with ligands. In the last decade, significant efforts have been made, and our

knowledge regarding nAChR structure and its relation to function has been dramatically increased by the determination of various X-ray crystal structures of the free and ligand-bound molluscan ACh-binding proteins (AChBPs), which are soluble protein homologues of the extracellular domains (ECDs) of nAChRs.^[2–9] These data have provided an understanding at the atomic level of the structure of nAChRs and have complemented the general information gained through electron microscopy studies on *Torpedo* nAChR.^[10]

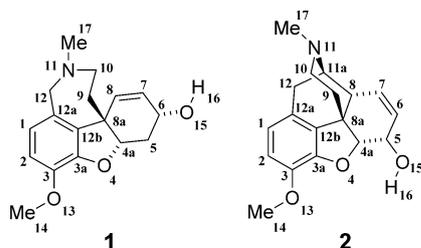
In the field of Alzheimer's disease (AD), acetylcholinesterase inhibitors (AChEI) remain, despite a debate on their efficiency, the first and the most developed drugs. However, an alternative means to increase nicotinic functions in the brain of AD patients is to sensitise the nAChRs to activation by the endogenous agonist(s) by using the so-called nicotinic allosteric potentiating ligands (APLs),^[11–14] which include, for example, drugs such as galanthamine, an alkaloid currently approved for the treatment of AD, and the morphine derivative codeine. Molecular-modelling studies have been used to gain information on the possible location of the APL binding site in nAChRs^[15,16] and have been confirmed through site-directed mutagenesis and electro-

[a] A. P. Atkinson, Dr. E. Baguet, Dr. N. Galland, Prof. Dr. J.-Y. Le Questel, A. Planchat, Dr. J. Graton
Laboratoire CEISAM, UMR 6230 CNRS
Faculté des Sciences et des Techniques de Nantes
2, rue de la Houssinière, BP 92208
44322 Nantes Cedex 3 (France)
Fax: (+33)251-12-55-67
E-mail: Jerome.Graton@univ-nantes.fr

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201100475>.

physiological experiments.^[16] These theoretical studies agree with the binding site of galanthamine observed in the crystallographic structure of a co-crystal with AChBP.^[17] Despite the obvious interest of such data, crystal structure coordinates give a misleadingly static view of interactions, whereas macromolecular complexes are not characterised by a single structure but rather by an ensemble of structures. Furthermore, even if very high-resolution structures are now available for AChBP (up to 1.76 Å), the inherent complexity of protein structures prevents a detailed analysis of the network of protein–ligand interactions that can lead to misleading interpretations.^[18] On the other hand, docking and scoring algorithms suffer from imperfections that do not allow one to have the required accuracy or necessitate expert knowledge to optimise their performance.^[19,20] In this context, it is our opinion that physicochemical studies aimed at providing a comprehensive understanding of the structural features and interactions of the biological ligands can be helpful in the drug-design process.

Following our previous studies on nicotinic ligands,^[21–26] we focus in the present work on the relative structural and hydrogen-bond (HB) properties of galanthamine (**1**) and co-



deine (**2**). Despite their strong chemical and structural similarities, these two ligands show significantly different behaviours in terms of biological activity. Galanthamine has a dual-mode action (AChEI and nAChR APL), which explains its position as a lead compound in the field of neurodegenerative disorders,^[27,28] whereas codeine is a recognised nAChR APL but not a known AChEI. In this paper, we present the results obtained from FTIR and NMR spectroscopic measurements in solution and from quantum chemistry calculations (local MP2 and DFT) in the isolated state. In a first step, the combined approach allows us to point out the differences between galanthamine and codeine in terms of intramolecular CH...O and OH...O interactions. The theoretical investigations, which are carried out on the basis of molecular electrostatic potential calculations and the analysis of natural bond orbital (NBO) descriptors, allow for a rationalisation of the experimental observations. Then a comprehensive investigation of the HB accepting strength of galanthamine and codeine has been carried out. The results allow us to highlight the greater HB basicity of galanthamine relative to codeine. The experimental and theoretical analyses allow us to discriminate between the contribution of the various HB sites of the two molecules, thereby enlightening the role of the hydroxyl group in this increase of HB basicity.

Finally, a comparison of the behaviour of the two molecules in protein environments (AChBP and AChE) has been carried out from previously determined crystallographic structures of galanthamine co-crystals. This analysis suggests significant differences with respect to the interactions of the two ligands with AChE that might be partly at the origin of their different biological activity. With AChBP, the key interactions involved in the binding appear to be conserved for the two ligands, which is in agreement with their nAChR APL effect.

Results and Discussion

Structures of galanthamine and codeine

Experimental insights from infrared and NMR spectra: As previously suggested by Carroll and co-workers,^[29] the infrared spectrum of a dilute solution of galanthamine in CCl₄ is typical of a structure that shows an intramolecular O–H...O hydrogen bond. Indeed, we observe in Figure 1a a fairly

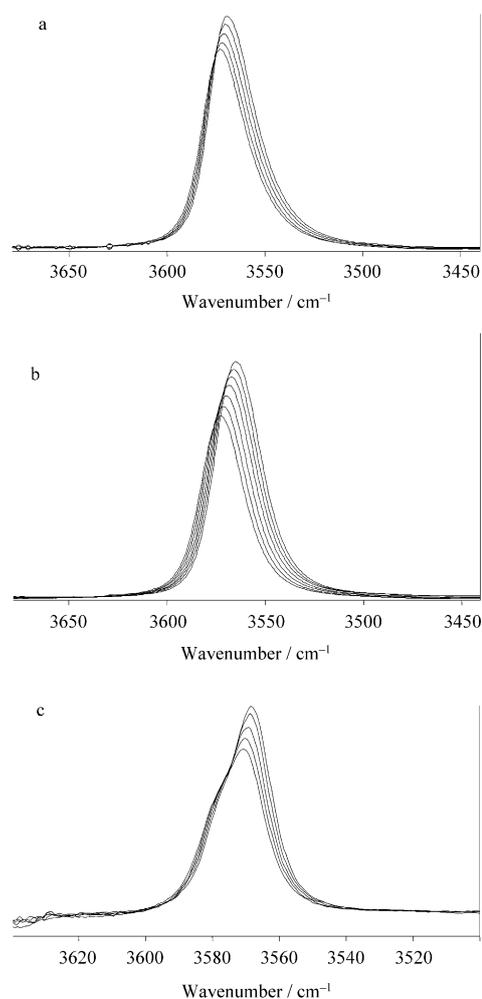


Figure 1. Hydroxyl ν_{OH} absorption region of galanthamine (4×10^{-3} M) dissolved in a) CCl₄, b) C₂Cl₄ and c) C-C₆H₁₂.

sharp band ($\Delta\nu_{1/2} = 27 \text{ cm}^{-1}$) at 3570 cm^{-1} , significantly shifted from cyclohexenol (3618 cm^{-1}), a model compound that cannot provide any intramolecular interaction. Moreover, the low concentration used (about $4.10 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) prevents any intermolecular association; the $\nu(\text{OH})$ vibration observed is thus necessarily attributed to an intramolecular interaction. This chelation phenomenon is likely to be sensitive to the variation in temperature. Recently, in the case of another nAChRs ligand, lobeline, we were able to estimate the proportion of the $\text{O}-\text{H}\cdots\text{N}$ chelated conformer in C_2Cl_4 by using a temperature interval from -5 to $+100^\circ\text{C}$.^[22] Using the same solvent and temperature range (Figure 1b), we do not observe any spectral evolution of the galanthamine solution. This shows that galanthamine remains fully chelated in C_2Cl_4 within this temperature interval. This feature of the molecule is conserved in CCl_4 within a temperature range from -5 to $+55^\circ\text{C}$.

Figure 2 shows that the codeine features appear more sensitive to the solvent. In a recent FTIR study of *N*-methylco-

deinium iodide,^[30] no intramolecular $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}$ hydrogen bonding has been reported; the occurrence of an intermolecular $\text{OH}\cdots\text{I}^-$ was suggested. Our results in C_2Cl_4 solution show that the hydroxyl absorption of codeine is very similar to the one observed for galanthamine, the $\nu(\text{OH})$ vibration being located at 3570 cm^{-1} (Figure 2b). However, in CCl_4 , an additional absorption band around 3620 cm^{-1} and favoured by the temperature increase is observable at higher frequency (Figure 2a). This band is roughly at the same wavenumber as the $\nu(\text{OH})$ stretching vibration of cyclohexenol, and codeine consequently shows a weak amount of unchelated hydroxyl group in CCl_4 . Thus, codeine remains fully chelated in C_2Cl_4 and this intramolecular interaction is found to be partially disrupted in CCl_4 .

Dissolved in cyclohexane, galanthamine (Figure 1c) and codeine (Figure 2c) remain both fully chelated since their spectra do not show any high frequency band around 3620 cm^{-1} , as observed for cyclohexenol. Nevertheless, a shoulder, which is favoured by the temperature increase, is observed on the $\nu_{\text{OH}\cdots\text{O}}$ band at a slightly higher frequency. The weak frequency shift from the main $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ band should thus be due to the perturbation of this $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ interaction. Since no specific solute-solvent interaction can occur in cyclohexane, a modification of the $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ surroundings could explain this frequency shift instead. Besides the hydroxyl group, the methoxy substituent is likely to move toward the immediate proximity of the furanyl oxygen atom through its rotation around the $\text{C}_{\text{ar}}-\text{O}$ bond and could therefore imply a perturbation of the $\nu_{\text{OH}\cdots\text{O}}$ band.

With a hydrogen-bond acceptor solvent, such as acetonitrile, the codeine and galanthamine behaviours now show significant discrepancies. Indeed, in ternary codeine/ CCl_4 / CH_3CN solutions with an increasing proportion of CH_3CN , the chelated $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ band decreases in favour of a broad band at lower frequency (Figure 3b). This new band is attributed to the $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{N}\equiv\text{C}$ intermolecular HB complex. Finally, in pure acetonitrile, almost all codeine is dechelated and associated with the solvent instead. On the contrary, galanthamine remains mainly chelated, even in pure acetonitrile as observed in Figure 3a in which the intramolecular $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ band is redshifted on account of the solvent effect, but is still predominant.

HB acceptor strength of organic bases can be assessed from the determination (through FTIR measurements) of their equilibrium constants of HB complexation with the reference donor 4-fluorophenol (*p*FP) in CCl_4 at 25°C , which leads to the $\text{p}K_{\text{BHX}}$ hydrogen-bond basicity scale.^[31] Hexamethylphosphoramide (HMPA, $\text{p}K_{\text{BHX}} = 3.56$ ^[32]) is then a much stronger HB acceptor than acetonitrile ($\text{p}K_{\text{BHX}} = 0.91$ ^[33]). The addition of a small amount of HMPA in CCl_4 is thus sufficient to clearly induce a rupture of a significant proportion of the intramolecular hydrogen bond, replaced by an intermolecular $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}=\text{P}(\text{NMe}_2)_3$ hydrogen bond between codeine as well as galanthamine and HMPA (Figure 4). As shown above with acetonitrile, galanthamine consistently appears to have the most robust chelation, as illustrated by the weaker relative proportion of intermolecu-

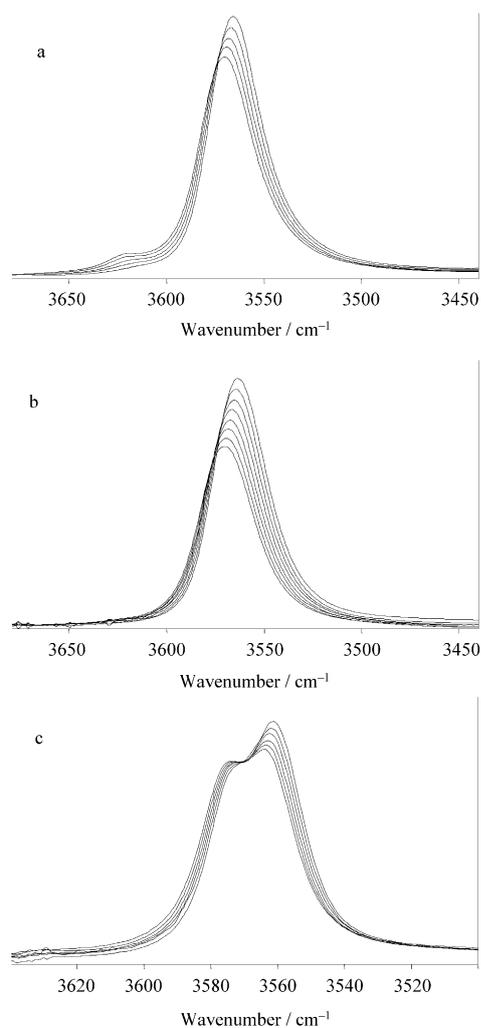


Figure 2. Hydroxyl ν_{OH} absorption region of codeine ($4 \times 10^{-3} \text{ M}$) dissolved in a) CCl_4 , b) C_2Cl_4 and c) *c*- C_6H_{12} .

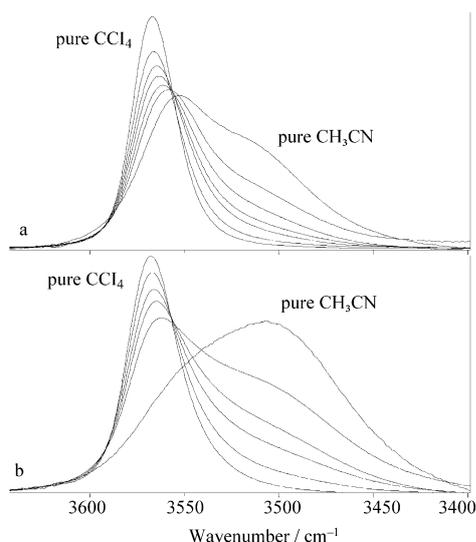


Figure 3. Hydroxyl ν_{OH} absorption region of a) galanthamine (4×10^{-3} M) and b) codeine (4×10^{-3} M) dissolved in various $\text{CCl}_4/\text{CH}_3\text{CN}$ mixtures.

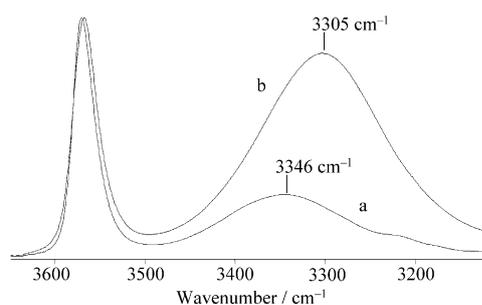


Figure 4. Hydroxyl ν_{OH} absorption region of a) galanthamine (4×10^{-3} M) and b) codeine (4×10^{-3} M) dissolved in CCl_4 in the presence of HMPA (1×10^{-2} M).

lar ($\approx 3350 \text{ cm}^{-1}$) toward intramolecular ($\approx 3570 \text{ cm}^{-1}$) bands relative to codeine. With HMPA it is also more obvious that the frequency shift of the OH band upon intermolecular complexation is significantly greater with codeine than galanthamine (263 vs. 224 cm^{-1}). This therefore strongly suggests that the unchelated hydroxyl group of codeine would be a better hydrogen-bond donor than the galanthamine one in unchelated conformations.

In addition to the infrared study, we have carried out an NMR spectroscopy investigation of galanthamine and codeine solutions by using the following solvents in descending order of polarity: $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, CD_3CN , CD_2Cl_2 , CCl_4 (with 5% CD_2Cl_2) and $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$ to probe (through 1D NOE measurements) the existence of secondary $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ interactions in the two ligands as a function of the solvent polarity. Table 1 gathers the results obtained by monitoring the dipolar interactions between the methoxy hydrogen atoms and the close phenyl hydrogen atom H_2 . Significant differences

Table 1. Evolution of the nuclear Overhauser enhancement (η) of the phenyl hydrogen atom (H_2) of galanthamine and codeine under methyl Me_{14} irradiation in solvents of varying polarities, from $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ to $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$.^[a]

| Solvent | $\eta(\text{H}_2)$ [%] | |
|-------------------------------|------------------------|---------|
| | Galanthamine | Codeine |
| $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ | 16 | 16 |
| CD_3CN | 13 | 11 |
| CD_2Cl_2 | 10 | 13 |
| CCl_4 ^[b] | 9 | 7 |
| $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$ | 7 | 6 |

[a] The NOE of one peak was measured as the other one was kept saturated. [b] With 5% of CD_2Cl_2 .

are observed in the various solvents, the trends being very similar for the two ligands. Table 1 shows a clear decrease of the nuclear Overhauser enhancement from $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ to $c\text{-C}_6\text{D}_{12}$. This observation suggests that in polar solvents the methoxy group is mainly in the surroundings of the phenyl hydrogen atom. On the contrary, weak values below 10% of NOE enhancements are observed in apolar solvents, thereby indicating an increase of the distance between the two chemical groups that could favour the occurrence of a stabilising $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ interaction between the methoxy group and the furanyl oxygen. It is worth noticing that the presence of this stabilising interaction could also explain, on the infrared spectra in cyclohexane (Figures 1c and 2c), the shoulder observed on the main O–H band of galanthamine and codeine. These experimental observations therefore constitute another piece of evidence in favour of the hypothesis that the chelated $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ band should be perturbed by the methoxy substituent.

Quantum chemistry calculations: Theoretical investigations have been realised to support and complete the various experimental results. In a previous work,^[25] we thoroughly studied the gas-phase galanthamine structure by using various Hartree–Fock (HF), post-HF and DFT methods. We have shown that its main structural features are 1) a strong preference for the $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ chelated conformer, 2) a chair conformation of the tetrahydroazepine ring, 3) a slight preference for an axial orientation of the *N*-methyl substituent and 4) a favoured *trans* orientation of the methoxy group with respect to the dihydrofuran ring. The experimental FTIR and NMR spectroscopic data obtained above have led us to reconsider the case of galanthamine and codeine, with special attention devoted to the methoxy substituent orientation and its ability to provide stabilising $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ intramolecular interactions with the furanyl oxygen within the two ligands.

Galanthamine: In this study, only the chair conformation of the nitrogen ring has been considered since the boat conformer has previously been predicted to be present in insignificant proportion.^[25] Table 2 shows the relative stabilities of the various conformers considered in this work computed at the LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)//MPWB1K/6-31+G(d,p) level

Table 2. Relative Gibbs energies, ΔG° , and populations, p_i , of galanthamine conformers with corresponding structural features.

| OH orientation | N-Ring conformation | N-Methyl position | MeO orientation | ΔG° ^[a] | p_i ^[b] |
|----------------|---------------------|-------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|
| chelated | chair | axial | <i>trans</i> | 0.0 | 28.6 |
| | | | <i>gauche</i> 1 | 0.9 | 19.6 |
| | | | <i>gauche</i> 2 | 1.8 | 13.7 |
| | | equatorial | <i>trans</i> | 1.8 | 14.0 |
| | | | <i>gauche</i> 1 | 1.1 | 18.1 |
| | | | <i>gauche</i> 2 | 3.9 | 6.0 |
| open | chair | axial | <i>gauche</i> 1 | 17.2 | 0.0 |
| | | | <i>gauche</i> 2 | 18.6 | 0.0 |

[a] In kJ mol^{-1} at the LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)//MPWB1K/6-31+G(d,p) level of theory. [b] Conformer population [%].

of theory. The axial position of the *N*-methyl substituent appears preferred; the relative populations of the *gauche* isomers for the methoxy group represent more than one half of the whole population. The computed data in the isolated state show therefore that the presence of a stabilising interaction between the methoxy group and the furanyl oxygen is effective, a trend that allows us to rationalise the experimental observations in apolar solvents. An NBO analysis of these *gauche* isomers provides evidence that this weak stabilisation originates in the hyperconjugation between the lone pair of the furanyl oxygen, n_{O} , and the methoxy antibonding $\sigma^*_{\text{(C-H)}}$ orbital ($E_{\text{n} \rightarrow \sigma^*}^{(2)} = 3.8 \text{ kJ mol}^{-1}$). This value is on the same order of magnitude as hyperconjugation energies computed recently for $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ interactions in HB complexes between ethers and haloforms (with $E_{\text{n} \rightarrow \sigma^*}^{(2)}$ ranging from 3.5 to 20.1 kJ mol^{-1}).^[34]

Codeine: Using a similar strategy, the structure of codeine has been investigated with a focus on the following degrees of freedom: 1) the hydroxyl group orientation, 2) the conformation of the piperidine ring, 3) the position of the *N*-methyl substituent and 4) the *gauche-trans* orientation of the methoxy substituent with respect to the furanyl oxygen. Only two structures appear to coexist in significant proportion in the isolated state (Table 3). Both isomers present a chelated hydroxyl group and a chair conformation of the piperidine ring with the *N*-methyl substituent in equatorial po-

Table 3. Relative Gibbs energies, ΔG° , and populations, p_i , of codeine conformers with corresponding structural features.

| OH orientation | N-Ring conformation | N-Methyl position | MeO orientation | ΔG° ^[a] | p_i ^[b] |
|----------------|---------------------|-------------------|-----------------|---------------------------------|----------------------|
| chelated | chair | equatorial | <i>gauche</i> | 0.0 | 63.3 |
| | | | <i>trans</i> | 1.4 | 36.3 |
| | | | <i>trans</i> | 13.4 | 0.3 |
| | | axial | <i>gauche</i> | 15.3 | 0.1 |
| | | | <i>trans</i> | 31.3 | 0.0 |
| | | | <i>trans</i> | 54.0 | 0.0 |
| open | chair | equatorial | <i>trans</i> | 20.4 | 0.0 |
| | | | <i>gauche</i> | 18.3 | 0.0 |
| | | | <i>trans</i> | 32.6 | 0.0 |
| | | axial | <i>trans</i> | 32.4 | 0.0 |

[a] In kJ mol^{-1} at the LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)//MPWB1K/6-31+G(d,p) level of theory. [b] Conformer population [%].

sition. They only differ by the *gauche-trans* orientation of their methoxy group (Figure 5). It is worth noticing that, unlike galanthamine, the axial-equatorial equilibrium of the

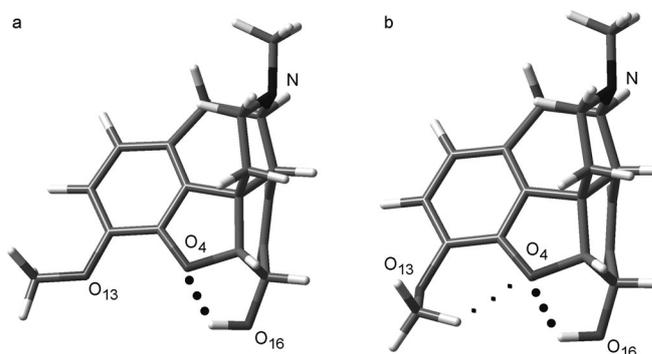


Figure 5. Optimised structures of codeine showing the chelated hydroxyl group, the chair conformation of the piperidine ring with its *N*-methyl substituent in equatorial position and the a) *trans* and b) *gauche* orientation of the methoxy group.

N-methyl group in codeine is definitely in favour of the equatorial isomer. The boat conformers of the piperidine ring are also notably destabilised (from about 31 to 54 kJ mol^{-1}) as are as the unchelated hydroxyl conformers (from about 18 to 32 kJ mol^{-1}). The methoxy group orientation and its potential interaction with the furanyl oxygen consequently appear to be the main degree of freedom of codeine in the isolated state. Despite the chemical similarities of the two ligands, their conformational features are therefore very different, since in contrast, the positions of both methoxy and *N*-methyl groups lead to six different local minima in galanthamine spread over less than 4 kJ mol^{-1} . The structural features of codeine obtained in the present work, in solution and in the gas phase agree well with those reported in the crystalline state. Indeed, neutral codeine structures^[35,36] unambiguously show an $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{O}_4$ intramolecular interaction ($d_{\text{H}\cdots\text{O}} = 2.140$ and 2.147 \AA , respectively) as well as in an *N*-methylcodeinium iodide structure^[30] despite the $\text{O}_{15}\text{H}\cdots\text{I}^-$ intermolecular interaction argued by the authors. A *trans* orientation of the methoxy substituent is found in both neutral codeine structures, whereas it adopts a *gauche* orientation in the *N*-methylcodeinium iodide structure, with a clear $\text{C}_{14}\text{H}\cdots\text{O}_4$ intramolecular interaction.

At the LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)//MPWB1K/6-31+G(d,p) level of theory, the methoxy *gauche-trans* conformers of codeine are found with a population ratio of 63:37. In the case of galanthamine, the relative proportion of *gauche* isomers is slightly weaker: 57% of the whole population. In agreement with this trend, the hyperconjugation energy between the furanyl oxygen lone pair, n_{O} , and the antibonding orbital of the methoxy group $\sigma^*_{\text{(C-H)}}$ computed from the NBO analysis in the *gauche* conformer of codeine is somewhat stronger (by 1 kJ mol^{-1}) for codeine than for galanthamine. The

stabilising $C_{14}H\cdots O_4$ intramolecular interaction therefore appears effective in both ligands in the isolated state and seems to be stronger in codeine. A direct consequence of this interaction is that the furanyl and hydroxyl surroundings in codeine should be more disturbed by the methoxy group. These theoretical trends are consistent with the IR spectra recorded in cyclohexane (Figures 1c and 2c), which suggest the presence of two *gauche* and *trans* conformers. In the ν_{OH} stretching region, a greater contribution of the shoulder at high wavenumber is observed in the codeine spectra relative to the galanthamine one. The measured blueshift between the main band and the shoulder is also slightly greater in codeine solution (about 10 cm^{-1} vs. 7 cm^{-1}). The predicted blueshift of $+15\text{ cm}^{-1}$ found in codeine is in good agreement with the experimental data and much more significant than the weak blueshift ($+2\text{ cm}^{-1}$) found for galanthamine.

Experimental FTIR results suggest that the galanthamine intramolecular $O_{15}H\cdots O_4$ interaction is stronger than the codeine one and is thus more difficult to break to form an intermolecular interaction with a hydrogen-bond acceptor (Figures 3 and 4). Given the relative energies gathered in Tables 2 and 3, both values of 17.2 and 18.3 kJ mol^{-1} , obtained for galanthamine and codeine, respectively, are comparable to those computed in guaiacol^[37,38] for the energy stabilisation brought by the intramolecular HB between the phenolic hydroxyl and methoxy groups (around 18 kJ mol^{-1}). Relative to codeine, a slightly larger destabilisation (about 10%) of the unchelated conformers of galanthamine confirms the somewhat greater robustness of its intramolecular $O_{15}H\cdots O_4$ interaction. This behaviour is corroborated by theoretical descriptors such as the electrostatic potentials $V_\alpha(r)$ and V_{\min} and the interaction energies $E_{n\rightarrow o}^{(2)*}$ (Table 4). Galanthamine is indeed found to present a stronger interaction between the furanyl oxygen lone pairs $n_{(O)}$ and the antibonding $\sigma^*_{(O-H)}$ orbital with the NBO analysis. It is even stronger than the interaction energy that occurs in guaiacol found at the same level of theory ($E_{n\rightarrow o}^{(2)*} = 14.2\text{ kJ mol}^{-1}$) or at the MP2/6-31+G(d,p) level ($E_{n\rightarrow o}^{(2)*} = 16.9\text{ kJ mol}^{-1}$).^[38] In the chelated conformers, the consideration of the minimum electrostatic potential value, V_{\min} , calculated around the hydroxyl oxygen atom, is also instructive. The galanthamine value is significantly more negative than the codeine one (Table 4), thereby suggesting in galanthamine a stronger charge transfer from the furanyl oxygen to the hydroxyl group, which therefore results in a stronger electron density on the hydroxyl oxygen lone pairs. On account of the stronger intramolecular interaction, the gal-

anthamine hydroxyl group seems to act with more difficulties as a hydrogen-bond donor, as observed in ternary solutions with hydrogen-bond acceptors such as acetonitrile and HMPA. Indeed, the larger stabilisation induced by the intramolecular $O_{15}H\cdots O_4$ interaction decreases the availability of its hydroxyl group. For codeine, the slightly larger electrostatic potential value, $V_\alpha(r)$, calculated around the hydroxyl hydrogen atom for the unchelated conformers, seems to indicate that it must be a stronger HB donor than the galanthamine one (Table 4). Furthermore, this feature is consistent with the greater frequency shift observed upon intermolecular complexation with HMPA.

Hydrogen-bond acceptor sites of codeine and galanthamine:

With an endocyclic nitrogen, a methoxy group, a furanyl and a hydroxyl oxygen, codeine, as well as galanthamine, shows no fewer than four potential acceptor sites for hydrogen bonding. Moreover, the presence of several conformers makes the evaluation of the corresponding individual affinities difficult. Nevertheless, a first simplification comes from the furanyl oxygen. Both compounds are found in CCl_4 or C_2Cl_4 to be present almost exclusively with their hydroxyl group chelated to this atom, and the consideration of the electrostatic potential molecular surface of the two conformers of codeine points out the absence of a complexation site specific to the furanyl oxygen. Indeed, this site either shows a common nucleophilic region with the methoxy oxygen (Figure 6a) or is no longer available to a hydrogen-bond donor when involved in intramolecular interaction with both hydroxyl and methoxy groups (Figure 6b). From this point of view, codeine has the same behaviour as galanthamine.^[26]

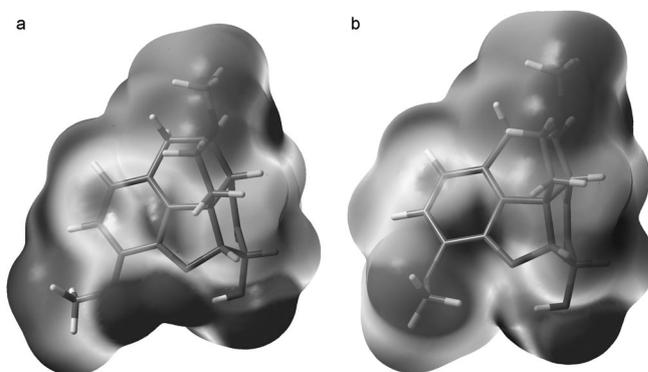


Figure 6. Molecular electrostatic potential maps of a) *trans* and b) *gauche* conformers of codeine. A common nucleophilic region between the furanyl and the methoxy oxygen atoms is found for the *trans* conformer, whereas the lone pairs of the furanyl oxygen atom are no longer available in the *gauche* conformer.

Table 4. Comparison of weighted theoretical descriptors characterising the hydroxyl moieties of galanthamine and codeine, interaction energies $E_{n\rightarrow o}^{(2)*}$, electrostatic potential values, V_{\min} and $V_\alpha(r)$ [kJ mol^{-1}].

| | Galanthamine | Codeine |
|-----------------------------|--------------|---------|
| chelated conformers | | |
| $E_{n\rightarrow o}^{(2)*}$ | 18.6 | 16.2 |
| $V_{\min}(O_{15})$ | -241.6 | -227.6 |
| unchelated conformers | | |
| $V_\alpha(r)(H_{16})$ | 849.6 | 851.7 |

A first experimental qualitative characterisation of these hydrogen-bond acceptor sites can be carried out by considering the behaviour of galanthamine and codeine in the presence of four hydroxyl hydrogen-bond donors. *p*FP is the reference hydrogen-bond donor (HBD) used for the pK_{BHX} determination, MeOH is usually selected for the $\Delta\nu(OH)$

frequency-shift measurements, and 2,2,2-trifluoroethanol and ethanol show intermediate hydrogen-bond acidity and/or basicity. The following trends can be drawn from the corresponding IR spectra (Figure 7). With the acidity decrease

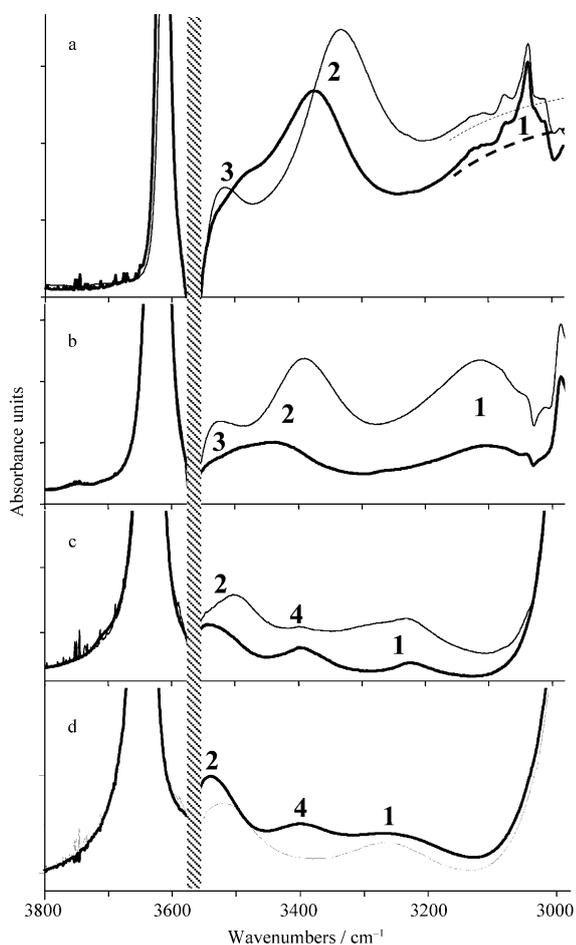


Figure 7. Hydroxyl ν_{OH} absorption region of a) *p*FP, b) $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$, c) EtOH and d) MeOH dissolved in CCl_4 with a small amount of galanthamine (non-bold) and codeine (bold).

in the hydrogen-bond donor ($p\text{FP} > \text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH} > \text{EtOH} \approx \text{MeOH}$),^[39] one can observe a decrease in the $\Delta\nu(\text{OH})$ frequency shifts for the complexation bands **1** and **2** (Table 5). On account of their $\Delta\nu(\text{OH})$ values, complexes **1** and **2** can only be attributed to the association of the hydrogen-bond donor on the nitrogen site and on the chelated hydroxyl

Table 5. Experimental $\Delta\nu(\text{OH})$ frequency shifts [cm^{-1}] of various HB donors upon complexation with the nitrogen and hydroxyl HB-acceptor sites of codeine and galanthamine.

| HBA → HBD ↓ | Nitrogen site | | Hydroxyl site | |
|------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| | codeine | galanthamine | codeine | galanthamine |
| <i>p</i> -fluorophenol | ≈ 800 | ≈ 800 | 241 | 279 |
| 2,2,2-trifluoroethanol | 517 | 508 | 179 | 229 |
| ethanol | 411 | 405 | 95 | 135 |
| methanol | 379 | 381 | 104 | 124 |

oxygen, respectively. With methanol, the frequency shifts of $\nu(\text{OH})$ upon associations greater than 375 cm^{-1} can indeed be found for amines, amine-*N*-oxides, amidines or anions.^[31] Complex **1** thus corresponds unequivocally to the association on the endocyclic nitrogen ($\Delta\nu(\text{OH}) = 379$ and 381 cm^{-1} for codeine and galanthamine, respectively (Figure 6d)). In the aromatic ether family, by using *p*FP as HBD the greatest $\Delta\nu(\text{OH})$ value ever measured (219 cm^{-1} for 2,6-dimethylanisole)^[31] is significantly weaker than the frequency shift of complex **2** ($\Delta\nu(\text{OH}) = 241$ and 279 cm^{-1} for codeine and galanthamine, respectively (Figure 6a)). With their two vicinal oxygen atoms on the aromatic moiety, galanthamine and codeine are expected to possess a strong hydrogen-bond acceptor site rather than two weak aromatic ether sites. Indeed, three-centred complexes are the most stable interaction geometry found in structures such as 1,2-dimethoxybenzene with hydrogen-bond donors, as shown, for example, with water.^[40] A strong basicity increase results in the lone pairs overlap, illustrated on the pK_{BHX} scale by the great difference between anisole and 1,2-dimethoxybenzene ($pK_{\text{BHX}} = -0.07$ and 1.16 , respectively).^[31] Despite this basicity increase, the frequency-shift value of *p*FP upon complexation with 1,2-dimethoxybenzene is still rather weak (149 cm^{-1}) and even weaker than that observed for the two-centred complex with anisole (168 cm^{-1}).^[31] As a consequence, complex **2** observed in galanthamine and codeine spectra cannot be attributed to the association of HBD on their aromatic ether group but rather on their hydroxyl group. These values ($\Delta\nu(\text{OH}) = 241$ and 279 cm^{-1}) are consistent with the value found for β -*N,N*-dimethylamino-1-phenylpropanol (324 cm^{-1}), which contains a chelated hydroxyl group and shows the strongest hydrogen-bond basicity ever measured in the alcohol family.^[22] A third complex **3**, which occurs on the aromatic ether site, can be guessed for the strongest HBDs used, *p*FP and 2,2,2-trifluoroethanol, but is no more detectable when using ethanol and methanol on account of the energy loss of the codeine and galanthamine $\nu(\text{OH})$ stretching vibration (hatched area on Figure 6). In the isolated state, the optimisation of the *p*FP...galanthamine and *p*FP...codeine 1:1 HB complexes formed on the various acceptor sites has been carried out to obtain the theoretical frequency shifts of the *p*FP $\nu(\text{OH})$ stretching vibration upon complexation. The nitrogen, hydroxyl and methoxy complexes show $\Delta\nu(\text{OH})$ around 600, 280 and 160 cm^{-1} , respectively, thus validating the experimental attribution.

Finally, a fourth complex (**4**), around 3400 cm^{-1} , appears in the presence of ethanol and methanol, especially for the codeine solutions (Figure 6c and d). Actually, these two HBDs contain hydroxyl oxygen atoms with a hydrogen-bond basicity ($pK_{\text{BHX}} = 1.02$ and 0.82 , respectively)^[41] on the same order of magnitude than acetonitrile ($pK_{\text{BHX}} = 0.91$).^[33] This fourth band is therefore attributed to a HB complex in which ethanol (or methanol) no longer plays the role of HBD but rather acts as a hydrogen-bond acceptor (HBA) complexed with the hydroxyl moiety of unchelated codeine. As found with CH_3CN and HMPA, the relative proportion

of complex **4** is significantly weaker in galanthamine solutions on account of the more robust chelation for this ligand. With the weaker acceptor ability of trifluoroethanol and *p*FP hydroxyl groups, these peculiar interactions are no longer observed (Figure 6a and b). Since the quantitative determination of the HB basicity is carried out with *p*FP in CCl₄ solution, these complexes that do not occur with this reference HBD will not falsify the experimental measurements.

Hydrogen-bond basicity of codeine and galanthamine:

Given the three HB acceptor sites found above, we will now focus on the comparison of their interaction strengths with *p*FP, the reference hydrogen-bond donor used to build the pK_{BHX} scale. Galanthamine is not stable enough in CCl₄ to allow the determination of the complexation equilibrium constant in this solvent, so the measurements have therefore been carried out in C₂Cl₄. Numerous amines precipitate in CCl₄ but do not react with C₂Cl₄. Moreover, equilibrium constant values are not significantly different in this solvent and can therefore be directly compared with those measured in CCl₄.^[42] Despite the strong structural similarities between galanthamine and codeine, their apparent equilibrium constants are significantly different, $K_{\text{app}}=88.4$ and 50.8 L mol^{-1} , respectively. Galanthamine therefore gains 75% of whole hydrogen-bond basicity by comparison with codeine. One must keep in mind that this equilibrium constant is global, that is to say, it corresponds to the sum of individual equilibrium constants on each acceptor site, weighted by the fractional population of each conformer [see Eq. (1) in the Experimental Section]. Determining the origin of this basicity increase (global; on all acceptor sites or only some of them) appears useful in gaining a deeper understanding of the behaviour of the ligands during molecular recognition process.

In ideal cases, the global apparent constant can be experimentally separated into individual equilibrium constants, provided that each acceptor site holds a spectroscopic probe significantly perturbed by hydrogen-bond complexation. For example, the $K_{\text{C=O}}$ and K_{N} equilibrium constants in cotinine have been measured individually thanks to the shift of the amide carbonyl group $\nu_{\text{C=O}}$ and the pyridine nitrogen ν_1 stretching vibrations, respectively.^[43] Unfortunately, none of the acceptor sites in galanthamine or codeine holds such a spectroscopic probe, and their individual constants are consequently not directly reachable. Nevertheless, we have shown above that the HBD ν_{OH} stretching mode was significantly shifted towards low frequencies upon complexation. Moreover, it is well established that this frequency shift is significantly correlated to the HB basicity, provided that the $pK_{\text{BHX}}-\Delta\nu(\text{OH})$ relationship is considered inside a homogeneous family (defined as a set of bases that hold the same HBA atomic site within the same function and subfunction with comparable steric hindrance).^[33,42,44-49] Hence, an increase in HB basicity is followed by an increase in the frequency shift when considering equivalent acceptor sites. The comparison of frequency shifts (Figure 6 and Table 5) re-

veals that whatever the HBD used, the hydroxyl site (complex **2**) of codeine appears significantly less basic than the galanthamine one. The nitrogen sites of codeine and galanthamine (complex **1**) seem to show equivalent HB basicities, but tertiary amines are very sensitive to steric effects, thereby leading to a significant decrease in HB basicity despite a strong frequency shift in sterically hindered amines.^[50] For this reason, the nitrogen sites of galanthamine and codeine must be compared with caution on the basis of the frequency-shift values, since their methyl group is either on an axial or equatorial position. On account of the energy loss around 3570 cm^{-1} , the position of the third complex on their methoxy group is also difficult to estimate with enough accuracy.

Quantum chemistry calculations support these experimental observations and supply further quantitative data. For each significant conformer of galanthamine and codeine, the calculated V_{min} values are gathered in Table 6 for the nitro-

Table 6. Minimum electrostatic potential (V_{min}) [kJ mol^{-1}] calculated at the MPWB1K/6-31+G(d,p) level of theory and predicted equilibrium constants (K_{calcd}) [$\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1}$] on the HB-acceptor sites of galanthamine and codeine.

| Structure | Nitrogen site N ₁₄ | | Hydroxyl site O ₄ | | Methoxy site O ₁₃ | |
|------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| | V_{min} | K_{calcd} | V_{min} | K_{calcd} | V_{min} | K_{calcd} |
| Gal-ax- <i>trans</i> | -233.6 | 26.4 | -247.8 | 50.0 | -179.4 ^[a] | 2.3 |
| Gal-ax- <i>gauche1</i> | -227.0 | 19.6 | -239.0 | 33.6 | -180.3 ^[b] | 2.4 |
| Gal-ax- <i>gauche2</i> | -229.7 | 22.2 | -229.0 | 21.5 | -173.3 ^[b] | 1.8 |
| Gal-eq- <i>trans</i> | -252.6 | 61.9 | -250.9 | 57.4 | -182.7 ^[a] | 2.7 |
| Gal-eq- <i>gauche1</i> | -245.7 | 45.5 | -241.0 | 36.8 | -183.1 ^[b] | 2.7 |
| Gal-eq- <i>gauche2</i> | -248.2 | 50.9 | -232.0 | 24.6 | -175.9 ^[b] | 2.0 |
| Cod-eq- <i>gauche</i> | -227.9 | 20.4 | -223.5 | 16.8 | -181.8 ^[b] | 2.6 |
| Cod-eq- <i>trans</i> | -234.4 | 27.3 | -234.7 | 27.8 | -176.8 ^[a] | 2.1 |

[a] V_{min} value located between the furanyl and methoxy oxygen atoms.
[b] V_{min} value located on the methoxy oxygen atom.

gen, the hydroxyl and the methoxy sites. The corresponding equilibrium constants, calculated using the calibration line (3) (see later; [Eq. (3)]), are also reported in this table. As suggested by the experimental results, the two main acceptor sites were found to be the nitrogen and the hydroxyl oxygen atoms. The methoxy oxygen atom remains a weak HB acceptor site whatever the *gauche* or *trans* conformer considered. As expected, the hydroxyl site is notably influenced by the secondary C₁₄H...O₄ interaction in the *gauche* conformation since the bifurcated intramolecular HB induces a significant weakening of electron density on the hydroxyl oxygen lone pairs, thereby leading to a decrease by a factor close to two of the corresponding equilibrium constants relative to the one predicted for the *trans* conformation. In galanthamine, one can see that the nitrogen atom is a significantly stronger HB acceptor in the equatorial conformation relative to the axial one.

In Table 7, the mean equilibrium constants, \bar{K}_{calcd} , on each acceptor site are calculated from the weighting by the population of the respective conformers, and the total equilibrium constants are obtained by following Equation (1) (see

Table 7. Weighted predicted equilibrium constants (\bar{K}_{calcd}) [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1}$] on the HB-acceptor sites of galanthamine and codeine.

| Structure | | Nitrogen site N ₁₄ | Hydroxyl site O ₄ | Methoxy site O ₁₃ | $K_{\text{tot,calcd}}$ | $K_{\text{tot,exp}}$ |
|--------------|--------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------|----------------------|
| galanthamine | \bar{K}_{calcd} | 34.4 | 40.0 | 2.4 | 76.7 | 88.4 |
| | pK_{BHX} | 1.54 | 1.60 | 0.37 | | |
| codeine | \bar{K}_{calcd} | 22.9 | 20.8 | 2.3 | 46.1 | 50.8 |
| | pK_{BHX} | 1.36 | 1.32 | 0.38 | | |

the Experimental Section). As experimentally shown, galanthamine appears to be a stronger HB-acceptor compound than codeine. In addition, theoretical results show that the contribution comes from both nitrogen and especially hydroxyl oxygen atoms, since their individual equilibrium constants increase by 50 and 100% from codeine to galanthamine, respectively.

Comparison of the galanthamine and codeine interactions in AChBP and AChE environments: To probe the interactions differences between the two alkaloids and their biological targets, we have used crystallographic structures of galanthamine complexes with AChBP and AChE as templates since no Protein Data Bank (PDB) entry is available for codeine. The strong interest in galanthamine derivatives as promising AChE inhibitors has indeed led to a significant number of studies devoted to the structural characterisation of their complexes with the enzyme.^[51–54] In the same vein, the APL activity of galanthamine and codeine towards nAChRs has recently led to the resolution (through X-ray crystallography) of a complex between galanthamine and AChBP.^[17]

Figure 8 shows the overlay of codeine and galanthamine on their pharmacophoric elements (see the molecular modelling paragraph in the Experimental Section) in the binding site of AChE. The interactions of codeine with AChE

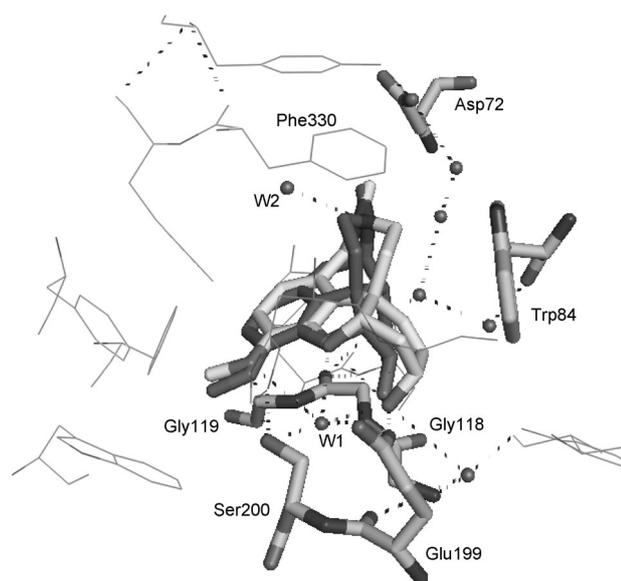


Figure 8. Overlay of codeine and galanthamine in the binding site of AChE (1QTI PDB entry).

appear very similar to galanthamine. Indeed, some of the specific interactions with AChE residues come out to be preserved together with the mediated HB interactions with conserved water molecules.^[55] The hydroxyl group (O₁₅H) of codeine is thus close to the carboxylate group of Glu199 and to the water molecule (W1 in Figure 8), which is itself involved in a characteristic network that includes Ser200 and the main chain NH groups of the oxyanion hole residues (Gly118 and Gly119). It is worth noting that, as with galanthamine, the oxygen atoms of the methoxy group (O₁₃) and of the furanic ring (O₄) appear well positioned to participate in HB with the same water molecule. However, a close examination of the environment of the two alkaloids in the vicinity of their saturated ring nitrogen atom suggests significant differences. First, contrary to galanthamine, the nitrogen atom of codeine is not correctly oriented for HB interactions with the water molecule (W2 in Figure 8) that is engaged in a strong HB with the nitrogen atom of galanthamine ($d(\text{N}\cdots\text{O})=3.3 \text{ \AA}$).^[53,55] This observation must of course be considered with caution on account of the mobility of water molecules in protein crystallographic structures. More importantly, as shown in Figure 9, none of the carbon

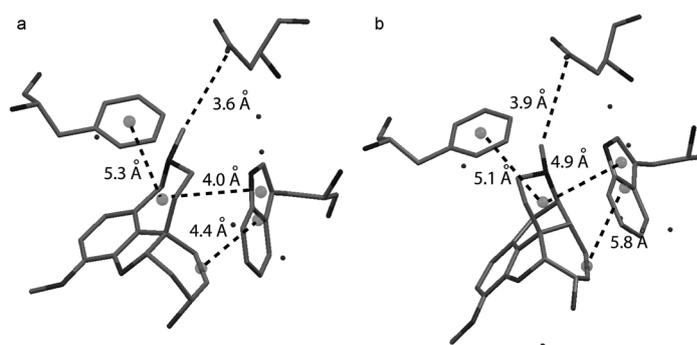


Figure 9. Key interactions between a) galanthamine and b) codeine with selected binding-site residues of AChE (1QTI). The distances between the rings are indicated with respect to their centroids (spheres in the figures).

atoms of the saturated ring of codeine are close to the pyrrole ring of Trp84. This feature is noticeable since Trp84 is involved in the so-called anionic subsite of the catalytic site (CAS) of AChE, thereby making π -cation interactions with the quaternary group of acetylcholine.^[56–59] Furthermore, the double bond of the cyclohexene ring is too far (distance between the centroids is approx. 5.8 \AA) to be involved in a π - π stacking interaction with Trp84 as observed with galanthamine (distance between the centroids is approximately 4.4 \AA). In contrast, no significant differences are noticeable with regards to the distances between the centroids of the saturated ring of galanthamine or codeine and Phe330, another aminoacid that belongs to the anionic subsite.

Using the same approach, Figure 10 shows the overlay of galanthamine and codeine in the binding site of AChBP. In contrast with the previous observations with AChE, all interactions with the protein environment appear now to be

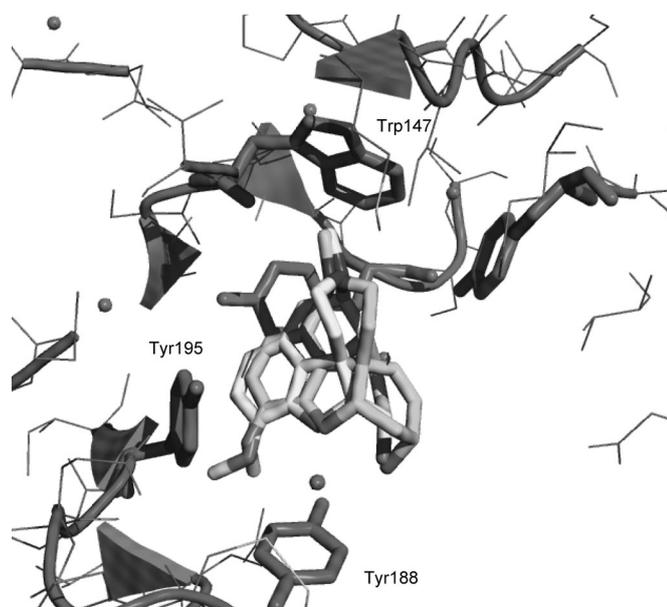


Figure 10. Overlay of codeine and galanthamine in the binding site of AChBP (2PH9 PDB entry).

conserved for the two ligands (for the oxygen atoms as well as for the atoms of the saturated nitrogenated rings). The phenolic hydroxyl of Tyr188 is in close proximity to the O₁₃, O₄ and O₁₅ oxygen atoms of the two ligands and might give rise to HB interactions. On the nitrogenated side of the two ligands, the nitrogen atom of neither molecule is correctly positioned to allow the formation of an HB interaction with the main chain carbonyl group of Trp147, as shown in Figure 11. However, this interaction can be replaced in the two molecules by one in which the positively charged methyl group (C₁₉H) fulfils this role ($d(\text{C}_{19}\cdots\text{O}_{\text{Trp147}})$ of 2.87 and 2.99 Å, respectively, for galanthamine and codeine). Furthermore, it is worth noting that the same methyl group can be involved in interactions with the electronic cloud of Trp147 ($d(\text{C}_{19}\cdots\text{Ce})=3.62$ and 3.43 Å, respectively, in galanthamine and codeine), thus fulfilling the requirement of cation- π interaction necessary for binding to nAChRs. Lastly, the distances between the centroids of the saturated nitrogenated ring of galanthamine or codeine to the centroid

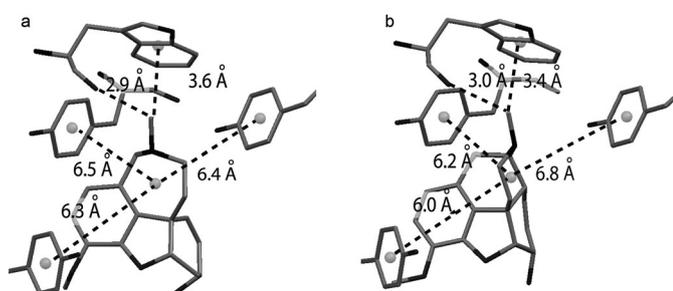


Figure 11. Key interactions between a) galanthamine and b) codeine with selected binding site residues of AChBP (2PH9 PDB entry). The distances between the rings are indicated with respect to their centroids (spheres in the figures).

of Tyr195 are of the same order of magnitude (respective values of 6.5 and 6.2 Å).

On the whole, this analysis allows us to point out significant differences in terms of interactions between galanthamine and codeine with AChE that might partly explain the difference in biological activity of the two molecules with respect to this enzyme. With regards to the interactions of the two molecules with AChBP, this preliminary study does not point out important changes in key interactions with AChBP, an observation that might be at the origin of the APL activity of the two ligands.

The comparison between the protein-bound and isolated ligand structures can only be made on galanthamine, since no bound structures of codeine are available. The hydroxyl (O₁₅H) group of galanthamine is consistently involved in an intermolecular interaction with the carboxylate group of Glu199 in AChE. This behaviour is in agreement with the much stronger HB basicity of the carboxylate group of Glu199 relative to the O₄ furanic oxygen. Furthermore, a *trans* orientation of the methoxy group with respect to the furanic oxygen O₄ is systematically observed in the AChE environment, whereas it is either found in a *gauche* or *trans* orientation in the AChBP binding site. These observations are in line with the flexibility, according to the chemical environment, of the OH \cdots O and CH \cdots O structural features pointed out experimentally in solution and theoretically through quantum chemistry calculations, the intramolecular interactions being preferred in apolar media. The low values of the rotation barriers involved in galanthamine (C₆-O₁₅ and C₃-O₁₃) explain this ease of adaptation to the chemical environment.^[25]

This analysis of the respective behaviours of galanthamine and codeine in protein (AChE and AChBP) environments suggests interesting trends with regard to their difference of biological activities. However, they must be considered with caution and require further molecular modelling investigations (molecular docking, molecular dynamics and QM/MM studies) that are beyond the scope of this paper.

Conclusion

This work shows that C₁₄H \cdots O₄ and O₁₅H \cdots O₄ intramolecular interactions have a significant influence on the conformational preferences of galanthamine and codeine. These intramolecular interactions are strongly dependent on the environment; they are preferentially observed in apolar solvents and in the isolated state. The intramolecular O₁₅H \cdots O₄ HB is significantly stronger in galanthamine; the C₁₄H \cdots O₄ interactions have similar features in the two molecules. The global HB-accepting strength of galanthamine is about 75% greater than codeine, mainly because of the greater HB basicity of the hydroxyl group.

Altogether, the various experimental and theoretical investigations conducted in solution and in the isolated state in the present work provide, for the first time, a detailed comparison of the structural and HB properties of these two

alkaloids of biological interest. In particular, it allows us to point out how subtle chemical differences can lead to significant changes in terms of HB properties that can have an impact on their behaviour in molecular-recognition processes. With regard to receptor and enzyme environments, a comprehensive molecular modelling study through docking, molecular dynamics and QM/MM studies would be of strong interest to complement this preliminary study and decipher in depth the binding of the galanthamine and codeine to AChE and AChBP.

Experimental Section

FTIR spectroscopy: Infrared spectra were recorded using a Fourier transform spectrometer Bruker Tensor 27 at a resolution of 1 cm^{-1} . We carried out the characterisation of the $\nu(\text{OH})$ stretching vibration of galanthamine and codeine, and the effect of the solvent or the co-solute, by using either KBr cells of 0.2 and 0.1 cm path lengths, or infrasil quartz cells of 1 and 0.2 cm path lengths when a temperature variation was needed. These latter cells were thermostat-controlled by a Peltier effect regulation in the range -5 to $+100^\circ\text{C}$ depending on the solvent used. Thermodynamic measurements of hydrogen-bonding complexation were obtained following the standard procedure^[32] from the absorbance decrease in the OH absorption of *p*FP ($\nu(\text{OH})=3614\text{ cm}^{-1}$; $\epsilon=237\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) in dilute ternary *p*FP–base– CCl_4 solutions at 25°C , and leading to $\text{p}K_{\text{BHX}}$ values.^[31] When the basicity measurement was carried out on polybasic compounds or on several conformers in thermodynamic equilibrium, the decrease in absorbance of the OH vibration band was due to the sum of the various complexations at the different sites of the same molecule and/or on the multiple conformers. In these situations, it can be shown that the apparent equilibrium constant K_{app} measured by the standard method is the sum of the equilibrium constants K_{ij} on the different sites j , weighted by the fractional population p_i of each conformer i found in solution [Eq. (1)]. The important condition is that the solutions are diluted enough so that only 1:1 complexes are present in solution.

$$K_{\text{app}} = \sum_{ij} p_i K_{ij} \quad (1)$$

NMR spectroscopy: All ^1H NMR spectra were recorded at 298 K with a 5 mm dual probe using a Bruker Avance 400 DPX spectrometer operating at 9.4 T, except for the sample in CCl_4 , which was studied using a Bruker Topspin 500 spectrometer operating at 11.7 T. Using the Avance 400 DPX spectrometer, free induction decays (FIDs) were accumulated in 16 K channels, with a spectral width of 7 ppm, an acquisition time of 2.9 s, using 90° read pulses of a duration between 11.4 and 12.2 μs , and 16 to 32 transients. Using the Topspin 500 spectrometer, FIDs were accumulated in 32 K channels, with a spectral width of 8 ppm, an acquisition time of 4.13 s. The standard ^1H spectrum of galanthamine was interpreted using the attribution made in a preliminary work^[29] and COSY spectroscopy performed on the sample in C_6D_{12} solvent.

Further details on the experimental methods are available in the Supporting Information.

Computational methods: Theoretical calculations were performed using Gaussian 03^[60] and Jaguar^[61] program packages.

Conformational study: On account of their excellent performance-to-cost ratio, DFT methods constitute a very appealing approach. The MPWB1K functional, recently developed by Truhlar and Zhao,^[62] gives improved results relative to many other DFT functionals for energy-barrier predictions and non-bonded interactions such as hydrogen bonding.^[62–65] In the present work, we selected the 6-31+G(d,p) basis set to carry out a conformational study of codeine and galanthamine. The harmonic frequen-

cies were computed to characterise the stationary points and to estimate the zero-point vibrational energy (ZPVE) corrections.

Due to the ability of codeine and galanthamine to show stable conformations including intramolecular interactions, single-point calculations were carried out at the LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)/MPWB1K/6-31+G(d,p) level of theory.^[66] Estimated ZPVE corrections and thermodynamic parameters from MPWB1K/6-31+G(d,p) harmonic frequencies were used at the LMP2/aug-cc-pVTZ(-f)/MPWB1K/6-31+G(d,p) level. The population of the various conformers was evaluated from the computed Gibbs energies through a Boltzmann distribution according to the relation [Eq. (2)]:

$$P_i = \frac{e^{-\Delta G_i/RT}}{\sum_{i=1}^n e^{-\Delta G_i/RT}} \quad (2)$$

Characterisation of HB properties: Galanthamine and codeine are present in several conformations in CCl_4 and the conformers may have different HB basicities. Thus, theoretical calculations must take into account the flexibility of the monomer to gain a better insight into the structural dependence of the HB basicity. In recent works,^[22,67] we have shown that a weighting of the electrostatic potentials or interaction energies by Boltzmann populations provides satisfactory descriptions of the experimental HB basicities.

Since the original work of Murray and Politzer,^[68–71] it has been consistently shown that HB basicity and the minimum electrostatic potential are pretty well correlated on account of the mainly electrostatic character of the HB interaction. When calculated at the molecular surface, defined by the 0.001 eBohr^{-3} contour of the electronic density,^[72] the so-called V_{smin} values lead however to family-dependent (by atomic site and chemical function) relationships with HB basicity.^[24,42,50,73,74] An alternative to this drawback can be the calculation of the absolute minimum value, V_{min} , of the electrostatic potential since “there is usually not a parallel, nor even a one-to-one correspondence between V_{min} and V_{smin} , at least in part because the latter reflect to a greater extent the overlapping of negative regions associated with different atoms”.^[75] As a consequence some authors rather chose the V_{min} descriptor for HB basicity prediction.^[70,73,76,77] For a training set that contained 45 oxygen and nitrogen compounds, we found that the $\text{p}K_{\text{BHX}}$ parameter is indeed pretty well correlated with the V_{min} descriptor [Eq. (3)].^[78] This sample contains the main chemical functions found in organic chemistry and listed in the $\text{p}K_{\text{BHX}}$ database,^[31] such as nitriles, pyridines, amines, ethers, ketones, aldehydes and sulfoxides.

$$\begin{aligned} \text{p}K_{\text{BHX}} &= -1.95 (V_{\text{min}}/100) - 3.14 \\ \text{correlation coefficient } (r) &= 0.982, \\ \text{standard deviation } (s) &= 0.15, \\ \text{number of points } (n) &= 45 \end{aligned} \quad (3)$$

HB acidity can be equally well characterised by an electrostatic descriptor such as V_{smax} or rather $V_{\alpha}(r)$ as recently recommended by Kenny.^[76] The $V_{\alpha}(r)$ descriptor is defined as the molecular electrostatic potential calculated at a distance $r=0.55\text{ \AA}$ from the donor hydrogen atom along the axis defined by the vector formed by the hydrogen and the atom to which it is bonded. The $V_{\alpha}(r)$ values have been calculated on the hydroxylic hydrogen atom of the unchelated conformers for the characterisation of their HB acidity.

In the natural bond orbital (NBO) approach,^[79] a hydrogen bond is viewed as an interaction between an occupied non-bonded natural orbital of the acceptor atom $n_{\text{(A)}}$ and the unoccupied anti-bonding orbital of the DH bond $s_{\text{(DH)}}^*$. The NBO interaction $E_{n \rightarrow \sigma^*}^{(2)}$ is estimated at the MPWB1K/6-31+G(d,p) level in the case of intramolecular interactions that occur in galanthamine and codeine structures, between oxygen lone pairs, $n_{\text{(O)}}$, and O–H or C–H anti-bonding orbitals $\sigma_{\text{(OH)}}^*$ and $\sigma_{\text{(CH)}}^*$.

Further details on the computational methods are available in the Supporting Information.

Acknowledgements

This work was granted access to the HPC resources of [CCRT/CINES/IDRIS] under the allocation 2010-x2010085117 made by GENCI (Grand Equipement National de Calcul Intensif). The authors gratefully acknowledge the CCIPL (Centre de Calcul Intensif des Pays de la Loire) for grants of computer time. The authors gratefully acknowledge Dr. Catherine Guillou (ICSN Gif sur Yvette, France) for the supply of galanthamine bromide amounts.

- [1] E. X. Albuquerque, E. F. R. Pereira, M. Alkondon, S. W. Rogers, *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 73–120.
- [2] K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van der Oost, A. B. Smit, L. K. Sixma, *Nature* **2001**, *411*, 269–276.
- [3] S. B. Hansen, T. T. Talley, Z. Radic, P. Taylor, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 24197–24202.
- [4] P. H. N. Celie, S. E. Van Rossum-Fikkert, W. J. Van Dijk, K. Brejc, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Neuron* **2004**, *41*, 907–914.
- [5] S. B. Hansen, G. Sulzenbacher, T. Huxford, P. Marchot, P. Taylor, Y. Bourne, *EMBO J.* **2005**, *24*, 3635–3646.
- [6] C. Ulens, R. C. Hogg, P. H. Celie, D. Bertrand, V. Tsetlin, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 3615–3620.
- [7] S. Dutertrre, C. Ulens, R. Buettner, A. Fish, R. van Elk, Y. Kendel, G. Hopping, P. F. Alewood, C. Schroeder, A. Nicke, A. B. Smit, T. K. Sixma, R. J. Lewis, *EMBO J.* **2007**, *26*, 3858–3867.
- [8] P. Rucktooa, A. B. Smit, T. K. Sixma, *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *78*, 777–787.
- [9] C. Ulens, A. Akdemir, A. Jongejan, R. van Elk, S. Bertrand, A. Perakakis, R. Leurs, A. B. Smit, T. K. Sixma, D. Bertrand, I. J. P. de Esch, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2372–2383.
- [10] N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **2005**, *346*, 967–989.
- [11] R. Faghii, M. Gopalakrishnan, C. A. Briggs, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 701–712.
- [12] S. N. Haydar, J. Dunlop, *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 144–152.
- [13] A. Maelicke, M. Samochocki, R. Jostock, A. Fehrenbacher, J. Ludwig, E. X. Albuquerque, M. Zerlin, *Biol. Psychiatry* **2001**, *49*, 279–288.
- [14] T. Kume, M. Sugimoto, Y. Takada, T. Yamaguchi, A. Yonezawa, H. Katsuki, H. Sugimoto, A. Akaike, *Eur. J. Pharmacol.* **2005**, *527*, 77–85.
- [15] B. Iorga, D. Herlem, E. Barre, C. Guillou, *J. Mol. Model.* **2006**, *12*, 366–372.
- [16] E. Luttmann, J. Ludwig, A. Hoefle-Maas, M. Samochocki, A. Maelicke, G. Fels, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1874–1882.
- [17] S. B. Hansen, P. Taylor, *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 895–901.
- [18] A. M. Davis, S. J. Teague, G. J. Kleywegt, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2822–2841; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2718–2736.
- [19] X. Li, Y. Li, T. Cheng, Z. Liu, R. Wang, *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 2109–2125.
- [20] J. B. Cross, D. C. Thompson, B. K. Rai, J. C. Baber, K. Y. Fan, Y. Hu, C. Humblet, *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1455–1474.
- [21] V. Arnaud, M. Berthelot, M. Evain, J. Graton, J.-Y. Le Questel, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 1499–1510.
- [22] A. Locati, M. Berthelot, M. Evain, J. Lebreton, J.-Y. Le Questel, M. Mathe-Allainmat, A. Planchat, E. Renault, J. Graton, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 6397–6405.
- [23] J. Graton, M. Berthelot, J.-F. Gal, S. Girard, C. Laurence, J. Lebreton, J.-Y. Le Questel, P.-C. Maria, P. Naus, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10552–10562.
- [24] J. Graton, M. Berthelot, J.-F. Gal, C. Laurence, J. Lebreton, J.-Y. Le Questel, P.-C. Maria, R. Robins, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8208–8221.
- [25] S. Kone, N. Galland, J. Graton, B. Illien, C. Laurence, C. Guillou, J.-Y. Le Questel, *Chem. Phys.* **2006**, *328*, 307–317.
- [26] S. Kone, N. Galland, E.-H. S. Bamba, J.-Y. Le Questel, *Acta Crystallogr. Sect. B* **2008**, *64*, 338–347.
- [27] M. D. Santos, M. Alkondon, E. F. R. Pereira, Y. Aracava, H. M. Eisenberg, A. Maelicke, E. X. Albuquerque, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 1222–1234.
- [28] S. Lilienfeld, *CNS Drug Rev.* **2006**, *8*, 159–176.
- [29] P. Carroll, G. T. Furst, S. Y. Han, M. Joullie, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1990**, 769–780.
- [30] R. W. Seidel, B. R. Bakalska, T. Kolev, D. Vassilev, H. Mayer-Figge, M. Spieller, W. S. Sheldrick, B. B. Koleva, *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, *73*, 61–66.
- [31] C. Laurence, K. A. Brameld, J. Graton, J.-Y. Le Questel, E. Renault, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4073–4086.
- [32] C. Laurence, M. Berthelot, *Perspect. Drug Discovery Des.* **2000**, *18*, 39–60.
- [33] M. Berthelot, M. Helbert, C. Laurence, J. Y. Le Questel, *J. Phys. Org. Chem.* **1993**, *6*, 302–306.
- [34] A. Mukhopadhyay, P. Pandey, T. Chakraborty, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 5026–5033.
- [35] D. V. Canfield, J. Barrick, B. C. Giessen, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1987**, *43*, 977–979.
- [36] S. Scheins, M. Messerschmidt, W. Morgenroth, C. Paulmann, P. Luger, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 5499–5508.
- [37] C. Agache, V. I. Popa, *Monatsh. Chem.* **2006**, *137*, 55–68.
- [38] S. Jalili, M. Akhavan, *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *118*, 947–957.
- [39] M. H. Abraham, P. L. Grellier, D. V. Prior, P. P. Duce, J. J. Morris, P. J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1989**, 699–711.
- [40] J. T. Yi, J. W. Ribblett, D. W. Pratt, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 9456–9464.
- [41] C. Laurence, M. Berthelot, M. Helbert, K. Sraidi, *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 3799–3802.
- [42] J. Graton, M. Berthelot, C. Laurence, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 2130–2135.
- [43] V. Arnaud, J.-Y. Le Questel, M. Mathe-Allainmat, J. Lebreton, M. Berthelot, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 10740–10748.
- [44] E. D. Raczynska, C. Laurence, P. Nicolet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1988**, 1491–1494.
- [45] E. D. Raczynska, C. Laurence, M. Berthelot, *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 2203–2208.
- [46] C. Laurence, M. Berthelot, M. Lucon, D. G. Morris, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 491–493.
- [47] F. Besseau, C. Laurence, M. Berthelot, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 485–489.
- [48] A. Chardin, C. Laurence, M. Berthelot, D. G. Morris, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1996**, *133*, 389–393.
- [49] M. Berthelot, C. Laurence, M. Safar, F. Besseau, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1998**, 283–290.
- [50] J. Graton, F. Besseau, M. Berthelot, E. D. Raczynska, C. Laurence, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 1375–1385.
- [51] C. Bartolucci, L. A. Haller, U. Jordis, G. Fels, D. Lamba, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 745–751.
- [52] H. M. Greenblatt, C. Guillou, D. Guenard, A. Argaman, S. Botti, B. Badet, C. Thal, I. Silman, J. L. Sussman, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15405–15411.
- [53] C. Bartolucci, E. Perola, C. Pilger, G. Fels, D. Lamba, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2001**, *42*, 182–191.
- [54] H. M. Greenblatt, G. Kryger, T. Lewis, I. Silman, J. L. Sussman, *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 321–326.
- [55] S. Koné, N. Galland, E.-H. S. Bamba, J.-Y. Le Questel, *Acta Crystallogr. B* **2008**, *64*, 338–347.
- [56] J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolow, C. Oefner, A. Goldman, L. Toker, I. Silman, *Science* **1991**, *253*, 872–879.
- [57] M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. H. Axelsen, I. Silman, J. L. Sussman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9031–9035.
- [58] J.-P. Colletier, D. Fournier, H. M. Greenblatt, J. Stojan, J. L. Sussman, G. Zaccari, I. Silman, M. Weik, *Embo J.* **2006**, *25*, 2746–2756.
- [59] Y. Bourne, Z. Radic, G. Sulzenbacher, E. Kim, P. Taylor, P. Marchot, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29256–29267.
- [60] Gaussian 03, Revision D.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K.

- Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2004**.
- [61] L. L. C. Schrödinger, Jaguar 6.0, New York, **2005**.
- [62] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 6908–6918.
- [63] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 6624–6627.
- [64] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 5656–5667.
- [65] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1*, 415–432.
- [66] S. Saebø, W. Tong, P. Pulay, *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 2170–2175.
- [67] F. Besseau, J. Graton, M. Berthelot, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 10656–10669.
- [68] J. S. Murray, P. Politzer, *J. Chem. Res. Synop.* **1992**, *3*, 110–111.
- [69] H. Hagelin, J. S. Murray, T. Brinck, M. Berthelot, P. Politzer, *Can. J. Chem.* **1995**, *73*, 483–488.
- [70] J. S. Murray, S. Ranganathan, P. Politzer, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3734–3737.
- [71] J. S. Murray, T. Brinck, M. E. Grice, P. Politzer, *THEOCHEM* **1992**, *256*, 29–45.
- [72] R. F. W. Bader, M. T. Carroll, J. R. Cheeseman, C. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7968–7979.
- [73] P. W. Kenny, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 199–202.
- [74] J.-Y. Le Questel, M. Berthelot, C. Laurence, *J. Phys. Org. Chem.* **2000**, *13*, 347–358.
- [75] J. S. Murray, Z. Peralta-Inga, P. Politzer, K. Ekanayake, P. Lebreton, *Int. J. Quantum Chem.* **2001**, *83*, 245–254.
- [76] P. W. Kenny, *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, *49*, 1234–1244.
- [77] M. Devereux, P. L. A. Popelier, I. M. McLay, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 1595–1603.
- [78] J. Graton, J. Y. Le Questel, unpublished results.
- [79] E. D. Glendening, A. E. Reed, J. E. Carpenter, F. Weinhold, Natural Bond Orbital (NBO), version 3.1, Theoretical Chemistry Institute, University of Wisconsin, Madison.

Received: February 11, 2011

Revised: June 21, 2011

Published online: September 2, 2011

Structure et interactions moléculaires d'agonistes et de modulateurs allostériques des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine

La découverte de l'acétylcholine binding protein (AChBP) a permis des avancées majeures dans la caractérisation des récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs). Dans le cadre de ce travail, une approche combinant la mise en œuvre de méthodes expérimentales et de calculs quantiques issus de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) a été utilisée pour (i) déterminer les conformations de basse énergie et les interactions d'une série de ligands des nAChRs (l'ACh, la nicotine, l'épibatidine, la galanthamine et la codéine) (ii) mettre à jour un motif structural de l'AChBP jouant un rôle majeur dans l'interaction avec les agonistes (iii) étudier la complexation de trois ligands avec un modèle tridimensionnel du site de fixation par une méthode mixte QM/QM'. Ainsi, malgré l'importante similitude structurale de la galanthamine et de la codéine, la confrontation des résultats obtenus au cours de ce travail révèle des différences d'interactions par liaison H significatives entre les deux composés. Par ailleurs, le motif structural mis à jour, qui comprend le Trp 143, impliqué dans la fixation des agonistes, et l'Asp 85, hautement conservé dans la famille des canaux ioniques, a été caractérisé de façon approfondie, l'influence d'un effet coopératif sur le réseau de liaison H formé étant démontrée. Enfin, l'ordre énergétique d'interaction ACh<Nicotine<Epibatidine rapporté dans la littérature a été reproduit par nos simulations, validées par le bon accord des résultats obtenus avec les données expérimentales disponibles. Cette séquence d'affinité a été rationalisée par une analyse fine de paramètres géométriques clés des interactions agonistes-AChBP.

Mots clés : Acétylcholine binding protein (AChBP)-agonistes des nAChRs- calculs théoriques- liaison hydrogène

Structure and molecular interactions of agonists and allosteric modulators of nicotinic acetylcholine receptors

The discovery of the Acetylcholine Binding Protein (AChBP) has allowed major breakthroughs in the characterization of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). In this work, a combined approach based on the use of various experimental methods and of theoretical calculations from density functional theory (DFT) has allowed to (i) determine the conformations and interactions of five nAChRs ligands (ACh, nicotine, epibatidine, galanthamine and codeine) in various environments (ii) shed light on a structural motif of AChBP playing a key role in the agonist binding (iii) study the complexation of ACh, nicotine and epibatidine with a three dimensional model of the AChBP binding site through a mixed QM/QM' approach. Thus, despite the important similarities of galanthamine and codeine, the confrontation of the results obtained from the various approaches used in this work reveals significant differences of hydrogen-bond interactions of the two compounds. Furthermore, the structural motif we have found, which includes the Trp 143, involved in the agonists binding, and the Asp 85, highly conserved in the ion channels family, has been deeply characterized, the influence of a cooperative effect on the H-bond network formed being demonstrated. Finally, the energetic ranking of interaction of the three ligands ACh<Nicotine<Epibatidine reported in the literature has been reproduced by our simulations, the results obtained being validated by their good agreement with the experimental data available. This affinity sequence has been rationalized by a comprehensive analysis of key geometric parameters of agonists-AChBP interactions.

Keywords : Acetylcholine binding protein (AChBP)- nAChRs agonists- theoretical calculations - hydrogen-bonding