



HAL
open science

Modélisation du mécanisme catalytique de l'urate oxydase

Muhammad Altarsha

► **To cite this version:**

Muhammad Altarsha. Modélisation du mécanisme catalytique de l'urate oxydase. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2005. Français. NNT : 2005NAN10127 . tel-01747493

HAL Id: tel-01747493

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747493v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



U.F.R. Sciences et Techniques de la Matière et des Procédés
Ecole Doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires (SESAMES)
Département de Formation Doctorale en Chimie Informatique et Théorique

THÈSE

présentée à l'Université Henri Poincaré - Nancy I
en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

en Chimie Informatique et Théorique

par

Muhannad ALTARSHA

Modélisation du mécanisme catalytique de l'urate oxydase

Soutenance publique le 25 Novembre 2005, salle Jean Barriol, devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Président :	M.	J.-L.	RIVAIL	Professeur, Université Henri Poincaré
Rapporteurs :	Mme	A.	DEJAEGERE	Maître de Conférences, Université Louis Pasteur
	M.	G.	DIVE	Professeur, Université de Liège, Belgique
Examineurs :	Mme	C.	POLICAR	Maître de Conférences, Université Paris XI
	M.	B.	CASTRO	Directeur de Recherche, Sanofi-Aventis
	M.	M. F.	RUIZ-LÓPEZ	Directeur de Recherche CNRS, Nancy
Invité	M.	G.	MONARD	Maître de Conférences, Université Henri Poincaré

Remerciements

Cette étude n'aurait jamais pu voir le jour sans l'attribution d'une « bourse industrielle » par la société pharmaceutique Sanofi-Aventis dans le cadre d'une thèse de chimie théorique et informatique par Monsieur le Professeur Bertrand CASTRO. Je tiens par conséquent à lui exprimer toute ma gratitude. Ce travail a été l'occasion de riches discussions avec de nombreux interlocuteurs, en particulier avec Monsieur le Professeur Bertrand CASTRO, qui ont à chaque fois manifesté de l'intérêt pour l'étude du mécanisme d'action de l'urate oxydase.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au Laboratoire de Chimie et Biochimie Théoriques à Nancy.

Mes remerciements vont tout d'abord à Monsieur le Professeur Jean Louis RIVAIL pour m'avoir offert l'opportunité d'élargir mes connaissances en chimie quantique, pour sa disponibilité et son soutien moral. Pour toutes ces raisons, c'est un grand plaisir pour moi qu'il ait accepté de participer au jury de thèse.

J'aimerais remercier tout particulièrement Monsieur Manuel RUIZ-LOPEZ, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Henri Poincaré de Nancy, qui m'a accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance, son enthousiasme, ses précieux conseils scientifiques et techniques.

C'est avec beaucoup de gratitude que je remercie Monsieur Gérard MONARD, Maître de Conférence à l'Université Henri Poincaré de Nancy, de m'avoir accepté pour mon stage de DEA et comme thésard. En plus de ses qualités scientifiques, j'ai découvert une personne profondément humaine qui se bat pour ses idées sans jamais renoncer. Il n'a jamais cessé de me soutenir tout au long de ces trois années de thèse.

Je tiens à remercier également Madame Annick DEJAEGÈRE, Maître de Conférence à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, et Monsieur Georges DIVE, Professeur à l'Université de Liège, d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie Madame Clotilde POLICAR, Maître de Conférence à l'Université d'Orsay, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je remercie Monsieur Alain CARTIER pour sa contribution dans la correction du manuscrit, sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci également aux personnes que j'ai eu de la chance de côtoyer durant ces années. Je remercie tout spécialement Daniel RINALDI « le chef » pour son humanité et François OGLIARO pour les nombreuses

discussions que j'ai eues avec lui.

Mes remerciements vont aussi aux thésards et ex-thésard : Saron, Laurent, Eddy, Yohann, Jean-Paul et Jean-Marc pour leur soutien et amitié. Un merci particulier à Laurent, Eddy et Bulent pour leurs remarques judicieuses. Merci également au personnel de l'équipe de chimie et biochimie théoriques pour leur sympathie, leur disponibilité ainsi que pour tout ce que j'ai partagé avec eu tout au long de mon séjour au « labo ».

Je dois un grand merci à mes chers amis d'avoir partagé avec moi les bons et les mauvais moments : Ahlamou, Isminou (Mireille), Walido, Charboula, Sadiki el ifriki (Rodrigue), Janjonne (Joni) et Raid.

Je remercie également Hassoun pour tout ce que nous avons partagé, que ce soit dans le labo ou dans la RU, pour sa profonde amitié et sa présence qui ont été pour moi une source de vitalité.

Je n'aurais pas pu arriver jusque là sans le soutien et l'aide de ceux qui me sont les plus proches. J'adresse donc mes derniers (et forcément les meilleurs) remerciements à mes parents, à mon frère Hamoudé et à ma vie.

Table des matières

Introduction	7
1. Méthodologie	9
1.1. Description quantique des systèmes moléculaires	9
1.1.1. Equation de Schrödinger	9
1.1.2. Approximation de Born-Oppenheimer	9
1.1.3. L'approximation orbitale	11
1.2. Méthode Hartree-Fock	12
1.2.1. Equations de Hartree-Fock	12
1.2.2. L'approximation CLOA (Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques)	13
1.2.3. La procédure SCF	14
1.3. Les méthodes post Hartree-Fock	14
1.3.1. L'approche perturbative Møller-Plesset	14
1.3.2. Les méthodes d'interaction de configurations (IC)	15
1.4. La théorie de la fonctionnelle de densité (DFT)	15
1.4.1. Les équations de Kohn-Sham	16
1.4.2. Les fonctionnelles énergies d'échange-corrélation	17
1.5. Les méthodes semi-empiriques	17
1.6. Prise en compte de l'effet du solvant	18
1.6.1. La méthode dite du "continuum"	18
1.6.2. Modèle à cavité de Nancy	19
2. L'Urate Oxydase	21
2.1. Fonction biologique	21
2.2. Données expérimentales	22
2.3. Structure cristallographique	24
2.3.1. Description du site actif	25
2.3.2. Positionnement des molécules d'eau dans le site actif	25
2.3.3. Forme du substrat dans le site actif	26
2.4. Mécanisme proposé dans la littérature	27
2.5. Conclusion	28

3. Etude théorique de l'acide urique et de ses anions	29
3.1. Etude des formes tautomères de l'acide urique	29
3.1.1. Détails des calculs	31
3.1.2. Résultats et discussion	31
3.2. Stabilités relatives des anions urates	37
3.2.1. Mise en œuvre des calculs	38
3.2.2. Résultats et discussion	39
3.3. Potentiels d'ionisation de l'acide urique et de ses anions	40
3.3.1. Potentiels d'ionisation	40
3.3.2. Affinité électronique du dioxygène	42
3.4. Spectroscopie UV-Visible de l'acide urique et de ses anions	43
3.4.1. Méthodologie	43
3.4.2. Résultats et discussion	44
3.5. Conclusion	48
4. Réactivité intrinsèque de l'acide urique et de ses anions	49
4.1. Mise en œuvre	49
4.2. Résultats et discussion	49
4.2.1. Initiation de la réaction	49
4.2.2. Transfert de proton de l'acide urique vers le dioxygène	51
4.2.3. La réactivité intrinsèque du monoanion 3 dans le vide	55
4.2.4. La réactivité intrinsèque du dianion 3-7 dans le vide	61
4.3. Conclusion	65
5. Modélisation du site actif de UOx	67
5.1. Choix du site actif	67
5.2. Mise en œuvre	67
5.3. Stabilité des formes anioniques dans le site actif	69
5.3.1. Insertion d'un urate monoanion	70
5.3.2. Insertion d'un urate dianion	70
5.4. Potentiels d'ionisation des formes anioniques	71
5.5. Stabilité des intermédiaires et produits possibles	72
5.5.1. L'intermédiaire 5-hydroperoxyisourate	72
5.5.2. L'intermédiaire 4-hydroperoxyisourate	73
5.5.3. Le produit 5-hydroxyisourate	75
5.5.4. Le produit 4-hydroxyisourate	76
5.6. Conclusion	78
6. Chemins réactionnels de l'oxydation du dianion urate dans l'urate oxydase 2UOX	81
6.1. Système modèle	81
6.2. Méthodologie employée	82
6.3. Mécanisme général de réaction	82

6.4.	Mécanisme d'action avec deux molécules d'eau	82
6.4.1.	Aspect géométrique	83
6.4.2.	Aspect énergétique	85
6.4.3.	Aspect électronique	88
6.5.	Mécanisme d'action avec une molécule d'eau	90
6.5.1.	Aspect géométrique	90
6.5.2.	Aspect énergétique	94
6.5.3.	Aspect électronique	95
6.6.	Comparaison entre les deux mécanismes	96
6.7.	Conclusion	98
7.	Etude des inhibiteurs et autres ligands connus de l'urate oxydase	99
7.1.	Mise en œuvre	99
7.2.	La 8-azaxanthine	99
7.2.1.	Stabilités relatives des formes anioniques	100
7.2.2.	Potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine et de ses anions	101
7.2.3.	Réactivité intrinsèque de la 8-azaxanthine dans le vide	103
7.2.4.	Stabilité relative de la 8-azaxanthine dans un modèle de site actif	107
7.2.5.	Potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine à l'intérieur du site actif	107
7.3.	L'acide 9-méthyl urique	109
7.3.1.	Stabilité relative des formes anioniques	109
7.3.2.	Potentiels d'ionisation de l'acide 9-méthyl urique et de ses anions	111
7.3.3.	Stabilités relatives dans le site actif	112
7.3.4.	Potentiel d'ionisation des formes anioniques dans le site actif	114
7.4.	Quelques autres ligands	115
7.5.	Conclusion	116
8.	Réactivité comparée du monoanion 3 de l'acide urique et de la 8-hydroxy-xanthine	121
8.1.	Stabilités relatives dans le vide et dans le solvant	121
8.2.	Potentiels d'ionisation dans le vide et dans le solvant	122
8.3.	Réactivité intrinsèque de l'acide 8-hydroxyxanthine	122
8.4.	Stabilités relatives et potentiels d'ionisation dans le site actif	126
8.5.	Hypothèse de chemin réactionnel pour la 8-hydroxyxanthine	129
	Conclusion	135
A.	Réactivité intrinsèque de l'acide urique et de ses anions	137
A.1.	Réactivité intrinsèque de l'acide urique	138
A.2.	Réactivité intrinsèque du monoanion 1 de l'acide urique	142
A.3.	Réactivité intrinsèque du monoanion 7 de l'acide urique	146
A.4.	Réactivité intrinsèque du dianion 1-3 de l'acide urique	154
A.5.	Réactivité intrinsèque du dianion 1-7 de l'acide urique	158

A.6. Réactivité intrinsèque du dianion 1-9 de l'acide urique	162
A.7. Réactivité intrinsèque du dianion 3-7 de l'acide urique	166
A.8. Réactivité intrinsèque du dianion 3-9 de l'acide urique	168
Bibliographie	184

Introduction

L'urate oxydase, ou uricase, est une enzyme responsable de la dégradation de l'acide urique en allantoiné. Elle intervient dans la plupart des organismes vivants. Cette enzyme est utilisée sous sa forme Uricozyme (*i.e.*, l'enzyme uricase provenant d'*Aspergillus flavus* et stabilisée par la 8-azaxanthine) dans le traitement des désordres hyperuricémiques apparaissant lors des traitements des cancers par chimiothérapie. L'urate oxydase est considérée comme l'une des protéines thérapeutiques les plus anciennes car elle a été enregistrée en France par l'entreprise pharmaceutique SANOFI dès 1975, et en Italie il y a près de 20 ans.

L'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* est une protéine possédant 301 résidus, sans pont disulfure. Sa forme active se présente en solution sous forme de dimères et de tétramères. Cette enzyme possède des propriétés remarquables car, même si elle peut lier des atomes de cuivre, elle n'a pas besoin d'ion métallique pour assurer son activité, ni même d'un co-facteur. Elle ne présente ainsi pas d'analogie mécanistique avec la plupart des autres enzymes oxydo-réductrices. De plus, il a été montré expérimentalement qu'aucun groupement fonctionnel de l'enzyme ne semble participer directement à la réaction de catalyse.

En 1997 a été publiée la première structure tridimensionnelle de l'urate oxydase, obtenue après cristallisation puis diffraction par rayons X, cette structure à 2.05 Å de résolution contient la 8-azaxanthine en tant qu'inhibiteur compétitif. L'un des points remarquables de cette structure, outre qu'elle inaugure un nouveau type de repliement appelé « T-fold », est le fait que les sites actifs de l'enzyme sont situés aux interfaces monomériques. Cela explique ainsi pourquoi la forme monomérique est non active et pourquoi il est nécessaire que l'enzyme s'associe au minimum en dimère pour pouvoir avoir un effet catalytique. Récemment, le complexe avec la 8-azaxanthine a été résolu jusqu'à une résolution de 1.7 Å. Cependant, dans la nouvelle structure, l'inhibiteur a été mis dans une orientation différente de ce qui a été montré dans la structure cristallographique initiale.

L'observation de l'agencement des résidus ainsi que de l'inhibiteur à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase montre que l'acide urique ne peut-être lié par l'enzyme que dans sa forme dianionique 3-7. Une molécule d'eau, présente dans la structure cristallographique au-dessus du plan formé par l'inhibiteur, semble être la molécule d'eau intervenant dans le bilan chimique de la réaction et se liant au carbone 5. Le canal permettant l'entrée dans le site actif du substrat semble, quant à lui, autoriser l'acheminement du dioxygène déclencheur de la réaction.

Malgré l'avancée scientifique importante apportée par la résolution cristallographique de la structure de l'urate oxydase, de nombreuses questions concernant le mécanisme catalytique de cette enzyme restent sans réponse. Notamment, nous pouvons nous demander quel est le rôle exact de la protéine, sachant qu'aucun groupement fonctionnel ne participe directement au

mécanisme. De plus, il est difficile d'expliquer pourquoi la 8-azaxanthine est un inhibiteur de l'enzyme, alors que l'acide urique est le substrat naturel (*i.e.* la seule différence entre les deux molécules est la présence d'un groupement C=O en position 8 dans l'acide urique à la place d'un azote dans la 8-azaxanthine). De même, l'acide 9-méthyl urique est un inhibiteur de l'uricase alors qu'il ne diffère de l'acide urique que par le remplacement d'un hydrogène par un groupement méthyle en position 9. Nous pouvons aussi nous interroger sur le passage naturel lors de la réaction d'un état initial triplet (dû à la présence du dioxygène) à un état final singulet, sachant qu'expérimentalement, aucune espèce radicalaire n'a, semble-t-il, été détectée.

L'objectif principal de notre travail va donc être la compréhension du mécanisme catalytique de l'urate oxydase par une étude théorique en utilisant les outils de la chimie quantique. Pour cela, nous nous fixons cinq objectifs :

1. Modéliser précisément les propriétés physico-chimiques du substrat principal de l'urate oxydase : l'acide urique.
Les composés dérivés des purines pouvant exister sous plusieurs formes tautomères, nous nous intéresserons à étudier les diverses formes tautomères dans le vide et dans le solvant de l'acide urique afin de découvrir la forme tautomère la plus stable de celui-ci. Nous déterminerons aussi les formes anioniques les plus stables de l'acide urique dans le vide et dans le solvant, ainsi que les potentiels d'ionisation de l'acide urique et de ses anions. D'autre part, nous essaierons de reproduire par la modélisation les résultats expérimentaux connus de spectroscopie d'absorption de l'acide urique.
2. Etudier les mécanismes possibles de formation du 5-hydroxyisourate qui est le produit réel de la réaction enzymatique de l'acide urique avec O₂.
3. Etudier les propriétés particulières du site actif de l'urate oxydase à travers l'utilisation d'un modèle de site actif.
4. Etudier le chemin réactionnel de l'acide urique dans ce modèle de site actif en présence des molécules d'eau qui semblent être impliquées dans la réaction.
5. Etudier les propriétés physico-chimiques d'un certain nombre de ligands connus de l'urate oxydase, et découvrir pourquoi certains de ces ligands réagissent avec l'urate oxydase alors que d'autres sont inhibiteurs.

1. Méthodologie

Nous décrivons dans ce chapitre les différentes méthodes et outils de la chimie théorique qui nous ont permis d'accomplir notre travail.

1.1. Description quantique des systèmes moléculaires

Nous rappelons ici les principes qui sont à la base des méthodes de la chimie quantique. Un rappel des approximations couramment utilisées permet de comparer les méthodes entre elles et de mieux comprendre leurs limitations.¹⁻⁴

1.1.1. Equation de Schrödinger

La chimie quantique est basée sur l'équation de Schrödinger qui s'écrit pour des états stationnaires⁵ :

$$\hat{H}\Psi = E\Psi \quad (1.1)$$

où Ψ est une fonction d'onde qui dépend des coordonnées des noyaux et des électrons et contenant toute l'information du système. $|\Psi|^2$ détermine la probabilité de présence des particules à un instant donné, dans un volume donné.

L'hamiltonien \hat{H} est l'opérateur associé à E qui est l'énergie du système considéré. Les propriétés moléculaires qui peuvent être calculées par la résolution de l'équation de Schrödinger sont entre autres la géométrie moléculaire, les stabilités relatives entre systèmes moléculaires, les spectres de vibrations, les moments dipolaires et multipolaires en général, les spectres électroniques et aussi des fonctions descriptives de la réactivité, telles que les charges atomiques. Toutefois, la précision avec laquelle on peut espérer calculer ces quantités est très variable en fonction de la nature de ces propriétés. Cette équation ne peut, en effet, pas être résolue de manière exacte pour les systèmes moléculaires, et l'on doit donc effectuer un certain nombre d'approximations.

1.1.2. Approximation de Born-Oppenheimer

Dans le cas non-relativiste, l'opérateur hamiltonien pour un système moléculaire peut s'écrire en unités atomiques sous la forme⁶ :

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \Delta_i - \frac{1}{2M} \sum_{A=1}^N \Delta_A - \sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{i-1} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{A=1}^N \sum_{B=1}^{A-1} \frac{Z_A Z_B}{r_{AB}} \quad (1.2)$$

Dans cette équation, les deux premiers termes rendent compte de l'énergie cinétique des électrons et des noyaux respectivement. Le troisième terme décrit l'attraction coulombienne noyaux-électrons, et les deux derniers termes sont liés aux répulsions électroniques et nucléaires. L'approximation de Born-Oppenheimer⁶ trouve son origine dans le fait que les noyaux possèdent une masse beaucoup plus importante que celle des électrons et qu'il est alors possible de considérer leur mouvement comme étant très lent par rapport à celui des électrons. On peut alors considérer le comportement des électrons dans une molécule en supposant que les noyaux occupent des positions fixes dans l'espace. L'équation de Schrödinger pour les électrons [1.1] devient alors :

$$\hat{H}_{el}\Psi_{el} = E_{el}\Psi_{el} \quad (1.3)$$

où \hat{H}_{el} est l'hamiltonien électronique, qui comprend trois contributions.

On écrit :

$$\hat{H}_{el} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \Delta_i - \sum_{i=1}^n \sum_{A=1}^M \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{i=1}^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (1.4)$$

Le premier terme est relatif à l'énergie cinétique des électrons, le deuxième à l'attraction entre noyaux et électrons et le dernier correspond à la répulsion coulombienne entre les électrons. Δ_i est l'opérateur d'énergie cinétique correspondant à l'électron i , n désigne le nombre d'électrons du système, M le nombre de noyaux, Z_A est le numéro atomique de l'atome A et r_{ij} est la distance entre deux électrons i et j . L'hamiltonien du système s'obtient en ajoutant à l'hamiltonien électronique le terme de répulsion entre noyaux \hat{V}_{NN} :

$$\hat{H} = \hat{H}_{el} + \hat{V}_{NN} \quad (1.5)$$

$$\hat{V}_{NN} = \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (1.6)$$

et R_{AB} désigne la distance entre les noyaux A et B . Ce dernier terme peut être considéré comme constant. En conséquence, on peut écrire :

$$E = E_{el} + V_{NN} \quad (1.7)$$

L'hamiltonien électronique peut être écrit sous la forme de deux contributions ; un opérateur de coeur \hat{H}^c regroupant les contributions monoélectroniques plus un opérateur de répulsions inter-électroniques :

$$\hat{H}_{el} = \hat{H}^c + \sum_{i=1}^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{r_{ij}} \quad (1.8)$$

avec

$$\hat{H}^c = \sum_{i=1}^n -\frac{1}{2} \Delta_i + V_{Ni} = \sum_{i=1}^n H^c(i) \quad (1.9)$$

où i et j se rapportent à 2 électrons du système et où \hat{V}_{Ni} est l'opérateur associé à l'interaction attractive noyaux-électron. Dans la suite de ce manuscrit, les symboles H , Ψ et E désigneront respectivement l'hamiltonien électronique, la fonction d'onde électronique et l'énergie totale calculée pour des positions fixes des noyaux.

1.1.3. L'approximation orbitale

L'approximation orbitale consiste à écrire la fonction d'onde multiélectronique sous la forme d'un produit de fonctions monoélectroniques dénommées orbitales moléculaires (OM).

On note :

$$\Psi = \psi_1(1)\psi_2(2)\psi_3(3) \dots \psi_n(n) \quad (1.10)$$

où les $\psi_i(i)$ représentent les fonctions d'ondes monoélectroniques associées aux électrons i . En toute rigueur, cette approximation n'est valable que dans le cas d'un système de particules indépendantes. Dans cette fonction d'onde, nous n'avons pas inclus le spin car il est absent dans l'hamiltonien électronique. Cependant, pour décrire complètement la distribution des électrons, les coordonnées de spin doivent être introduites. Le produit d'une fonction d'onde spatiale (OM) et d'une fonction de spin $\eta(i)$ est appelé *spinorbitale* : $\chi(i) = \psi(i)\eta(i)$ où $\eta(i) = \alpha(i)$ ou $\beta(i)$, est l'une des deux fonctions de spin accessibles à un électron. Par conséquent, pour un système ayant n électrons la fonction d'onde la plus simple sera sous la forme d'un produit de spinorbitales :

$$\Psi = \chi_1(1)\chi_2(2)\chi_3(3) \dots \chi_n(n) \quad (1.11)$$

La fonction d'onde représentée par l'équation (1.11) n'est cependant pas correcte parce qu'elle ne prend pas en compte l'indiscernabilité des électrons. Elle doit satisfaire le *principe de Pauli*⁷ qui impose que si les coordonnées des électrons i et j sont interchangées la fonction d'onde doit changer de signe. Pour prendre en compte cette indiscernabilité et assurer l'antisymétrie, on peut écrire la fonction d'onde sous la forme d'un *déterminant de Slater*.⁸

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

où $\frac{1}{\sqrt{n!}}$ est le facteur de normalisation.

Les déterminants contenant des spinorbitales qui possèdent la même partie d'espace pour des fonctions de spin différents sont appelés *restreints*. Par contre les déterminants contenant des spinorbitales qui possèdent des parties d'espace différentes pour des fonctions de spin différents sont qualifiés de *non-restreints*.

En règle générale, les déterminants *restreints* (R) sont utilisés pour décrire des systèmes à couches fermées (systèmes singulets avec tous les électrons appariés). Pour les systèmes à couches ouvertes, cette contrainte est habituellement levée par l'utilisation de déterminants *non-restreints* (U par référence à l'anglais *unrestricted*).^{9,10} Toutefois, les déterminants *non-restreints*

ne sont pas forcément fonctions propres de l'opérateur \hat{S}^2 . Ainsi, une fonction d'onde non-restreinte représentant un état de multiplicité de spin donné peut être contaminée par des fonctions correspondant à des états de plus haute multiplicité de spin. Le calcul est alors entaché d'une erreur plus ou moins importante que l'on désigne sous le terme de contamination de spin. Nous verrons par la suite qu'il existe certaines méthodes qui permettent de corriger d'une manière plus ou moins correcte cette erreur.¹¹

1.2. Méthode Hartree-Fock

Une caractéristique fondamentale de l'hamiltonien électronique est de contenir un terme bi-électronique, qui prend en compte l'interaction de chaque électron avec chacun des autres. La théorie HF utilise le principe variationnel et se base sur le fait que l'énergie calculée pour un état électronique donné d'un système décrit par une fonction d'onde Ψ quelconque est toujours supérieure à l'énergie que l'on obtiendrait pour ce même état en utilisant une fonction d'onde solution de l'équation de Schrödinger.

1.2.1. Equations de Hartree-Fock

Nous avons construit une fonction d'onde Ψ sous la forme d'un déterminant de Slater. Il nous faut maintenant résoudre l'équation et calculer l'énergie électronique correspondante.^{12,13}

$$E = \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle = \sum_{i=1}^n \langle \chi_i(1) | H^c(1) | \chi_i(1) \rangle + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{i-1} \left[\langle \chi_i(1) \chi_j(2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_i(1) \chi_j(2) \rangle - \langle \chi_i(1) \chi_j(2) | \frac{1}{r_{12}} | \chi_i(2) \chi_j(1) \rangle \right] \quad (1.12)$$

En s'appuyant sur le principe variationnel, il s'agit de trouver les meilleures spinorbitales, et par conséquent les meilleures orbitales moléculaires, c'est-à-dire celles rendant l'énergie E la plus basse possible.

Si l'on fait l'hypothèse que ces orbitales correspondent à un minimum de l'énergie, on doit vérifier qu'une petite modification apportée à une orbitale quelconque, qui n'en modifie ni la norme ni l'orthogonalité aux autres orbitales, n'entraîne pas de variation de l'énergie. Cette condition impose aux orbitales d'être fonctions propres d'un opérateur \hat{F} appelé opérateur de Fock, les équations de Hartree-Fock^{12,13} correspondantes déterminent ces orbitales :

$$F(1)\psi_i(1) = \varepsilon_i\psi_i(1) \quad (1.13)$$

avec

$$F(1) = H^c(1) + \sum_i J_i(1) - K_i(1) \quad (1.14)$$

$$J_i(1) = \int_{(2)} \psi_i^*(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_i(2) d\tau_2 \quad (1.15)$$

$$K_i \psi_j(1) = \psi_i(1) \int_{(2)} \psi_i^*(2) \frac{1}{r_{12}} \psi_j(2) d\tau_2 \quad (1.16)$$

Les opérateurs J et K portent respectivement le nom d'opérateur coulombien et opérateur d'échange. ε_i est l'énergie de l'orbitale ψ_i correspondante.

1.2.2. L'approximation CLOA (Combinaison Linéaire d'Orbitales Atomiques)

L'approximation CLOA consiste à exprimer la fonction monoélectronique ψ_μ comme une combinaison linéaire d'orbitales atomiques centrées sur les atomes de l'édifice moléculaire :

$$\psi_i = \sum_{\mu} c_{\mu i} \phi_{\mu} \quad (1.17)$$

Les symboles latins i servent à définir les orbitales moléculaires (OM) tandis que les symboles grecs μ sont utilisés pour représenter les orbitales atomiques (OA). Dans ce cadre, il s'agit de trouver les meilleurs coefficients $c_{\mu i}$ qui minimisent l'énergie électronique E . En utilisant le formalisme CLOA, l'équation 1.17 prend la forme des équations de Roothaan-Hall¹⁴ :

$$\sum_{\nu} F_{\mu\nu} c_{\nu i} = \varepsilon_i \sum_{\nu} S_{\mu\nu} c_{\nu i} \quad (1.18)$$

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

$$F_{\mu\nu} = H_{\mu\nu}^c + \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \left[(\mu\nu|\lambda\sigma) - \frac{1}{2}(\mu\sigma|\lambda\nu) \right] \quad (1.19)$$

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

$$P_{\lambda\sigma} = 2 \sum_i^{occ} c_{\lambda i}^* c_{\sigma i} \quad (1.20)$$

$H_{\mu\nu}^c$ est un élément de la matrice associée à l'hamiltonien de coeur. Les intégrales biélectroniques $(\mu\nu|\sigma\lambda)$ et $(\mu\lambda|\sigma\nu)$ proviennent respectivement des termes coulombien et d'échange définis précédemment :

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = \int_{(1)} \int_{(2)} \phi_{\mu}(1) \phi_{\nu}(1) \frac{1}{r_{12}} \phi_{\lambda}(2) \phi_{\sigma}(2) d\tau_1 d\tau_2$$

1.2.3. La procédure SCF

En examinant les équations de Hartree-Fock, on remarque qu'elles sont couplées puisque les opérateurs J et K , pour être définis, nécessitent la connaissance des spinorbitales solution de l'équation 1.13. Pour s'affranchir de ce problème, ces équations doivent être résolues de manière itérative. Une telle procédure porte le nom de méthode du champ auto-cohérent ou SCF (pour Self Consistent Field). L'idée de base de cette méthode est simple. On fait un choix initial de spinorbitales, donc d'une matrice densité P . On résout ensuite les équations de Hartree-Fock qui vont nous donner un ensemble de spinorbitales. Ces nouvelles spinorbitales vont à leur tour servir à définir de nouveaux opérateurs. Ceci est répété jusqu'à ce que la cohérence interne soit atteinte, c'est-à-dire jusqu'à ce que la nouvelle matrice densité P soit la même que la précédente, en tenant compte d'un seuil de convergence pré-fixé.

1.3. Les méthodes post Hartree-Fock

L'énergie obtenue dans le cadre des équations de Roothaan-Hall est égale à l'énergie Hartree-Fock dans le cas où la base de fonctions utilisée est infinie. De plus, la théorie Hartree-Fock néglige l'énergie de corrélation des électrons. D'après Löwdin,¹⁵ l'énergie de corrélation d'un système correspond à la différence entre l'énergie Hartree-Fock avec une base infinie (limite HF) et l'énergie exacte non-relativiste du système :

$$E_{corr} = E_{HF}^{\infty} - E \quad (1.21)$$

Deux grandes catégories de méthodes permettant la prise en compte au moins partielle des effets de corrélation électronique existent actuellement : les méthodes à référence unique et les méthodes multi-référencées.

1.3.1. L'approche perturbative Møller-Plesset

Dans la méthode des perturbations de Møller-Plesset,¹⁶ la corrélation électronique est vue comme une perturbation de l'hamiltonien électronique total construit à partir de la somme des opérateurs de Fock : $H_T = H_0 + V$, où H_0 est le terme d'ordre zéro, construit à partir de la somme des opérateurs de Fock et dont les fonctions propres sont les solutions Hartree-Fock, et V représente la perturbation due à la corrélation électronique.

L'énergie d'ordre zéro est égale à la somme des énergies orbitales. L'énergie d'ordre 1 est l'énergie Hartree-Fock. La théorie de perturbations de Rayleigh-Schrödinger est utilisée pour évaluer les corrections d'ordres plus élevés. Dans la pratique, les méthodes de Møller-Plesset à l'ordre 2 (MP2) ou à l'ordre 4 (MP4) sont les plus utilisées. Signalons que cette approche n'est valable que si la fonction d'onde d'ordre zéro est déjà une bonne approximation de la fonction d'onde exacte.

1.3.2. Les méthodes d'interaction de configurations (IC)

Considérons une fonction d'onde HF initiale Ψ_0 , de multiplicité définie, décrivant l'état d'un système. L'idée de base de la méthode IC est de représenter la fonction d'onde totale sous la forme d'une combinaison linéaire de déterminants $\Psi_a^r, \Psi_{ab}^{rs} \dots$ orthogonaux entre eux et à Ψ_0 et de même multiplicité de spin que Ψ_0 :

$$\Psi_{IC} = c_0\Psi_0 + \sum_{a,r} c_a^r\Psi_a^r + \sum_{a<b,r<s} c_{ab}^{rs}\Psi_{ab}^{rs} + \sum_{a<b<c,r<s<t} c_{abc}^{rst}\Psi_{abc}^{rst} \quad (1.22)$$

Ces déterminants sont obtenus en remplaçant dans Ψ_0 une ou plusieurs spinorbitales occupées $\chi_a, \chi_b \dots$ par une ou plusieurs spinorbitales virtuelles $\chi_r, \chi_s \dots$ et portent le nom de configurations mono, bi, tri... excitées. Les coefficients ainsi que l'énergie sont calculés en s'appuyant sur le principe variationnel. Cela consiste à construire la matrice d'interaction de configuration $\langle \Psi_{IC} | H | \Psi_{IC} \rangle$ et à trouver les valeurs propres de cette matrice. La valeur propre la plus basse représente la limite supérieure de l'énergie de l'état fondamental tandis que les autres sont des limites supérieures des énergies des états excités du système.

Dans le cas où la fonction d'onde Ψ_{IC} prend en compte la totalité des déterminants pouvant être construits à partir des excitations multiples dans Ψ_0 , on parle d'*interaction de configurations complète* (Full CI en anglais). En principe, si on utilisait une base complète, on obtiendrait les propriétés exactes du système étudié. Des théorèmes permettent de s'affranchir du calcul de certains éléments de la matrice d'interaction de configurations. Ainsi, le théorème de Brillouin¹⁷ établit qu'il n'existe aucun couplage direct entre la fonction d'onde Ψ_0 et les déterminants issus des simples excitations. De plus, tous les éléments $\langle \Psi_a | H | \Psi_b \rangle$ de la matrice pour lesquels les déterminants Ψ_a et Ψ_b diffèrent par plus de deux spinorbitales sont nuls.

Néanmoins, lorsque l'on dépasse un certain nombre de fonctions de base, un calcul Full CI s'avère trop coûteux. Il est alors nécessaire de tronquer la fonction d'onde totale et d'utiliser seulement une fraction des déterminants possibles. Par exemple, si l'on considère une fonction d'onde ne contenant que les déterminants qui diffèrent de Ψ_0 par au plus deux spinorbitales, on entre dans le formalisme CISD (Configuration Interaction Single Double).¹⁸

1.4. La théorie de la fonctionnelle de densité (DFT)

La théorie de la fonctionnelle de la densité est basée sur le théorème Hohenberg-Kohn¹⁹ qui établit que l'énergie d'un système dans son état fondamental est une fonctionnelle de la densité électronique de ce système, $\rho(r)$, et que toute densité, $\rho'(r)$, autre que la densité réelle conduit nécessairement à une énergie supérieure. Ainsi, contrairement aux méthodes décrites précédemment, la théorie de la fonctionnelle de la densité ne consiste pas à chercher une fonction d'onde complexe, Ψ , à 3N-dimensions décrivant le système à étudier, mais plutôt une simple fonction à trois dimensions : la densité électronique totale ρ .^{20,21}

1.4.1. Les équations de Kohn-Sham

Les équations permettant d'obtenir la densité électronique totale dans un système moléculaire proviennent des travaux de Kohn et Sham.²² Dans leur approche, la fonctionnelle énergie $E[\rho(r)]$ est subdivisée de la manière suivante :

$$E[\rho(r)] = U[\rho(r)] + T[\rho(r)] + E_{xc}[\rho(r)] \quad (1.23)$$

où $U[\rho(r)]$ est l'énergie électrostatique classique, exprimée simplement comme la somme des attractions électrons-noyaux et des répulsions électron-électron :

$$U[\rho(r)] = - \sum_A \int \frac{Z_A \rho(r)}{|r - R_A|} + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r - r'|} dr dr' \quad (1.24)$$

Le deuxième terme, $T[\rho(r)]$, est défini comme l'énergie cinétique d'un système de même densité $\rho(r)$ mais dans lequel les électrons n'interagiraient pas entre eux. Enfin, le terme final, $E_{xc}[\rho(r)]$, contient à la fois les contributions de l'échange et de la corrélation électronique à l'énergie et la différence entre $T[\rho(r)]$ et la vraie énergie cinétique électronique du système.

Suivant Kohn et Sham, la densité électronique d'un système à N électrons, contenant N^α électrons de spin haut et N^β électrons de spin bas, peut être exprimée comme la somme des carrés des modules d'orbitales moléculaires orthonormales entre elles et occupées par un seul électron. Ces orbitales moléculaires sont appelées orbitales moléculaires de Kohn-Sham.

$$\rho(r) = \rho^\alpha(r) + \rho^\beta(r) = \sum_i^{N^\alpha} |\psi_i^\alpha(r)|^2 + \sum_i^{N^\beta} |\psi_i^\beta(r)|^2 \quad (1.25)$$

De cette manière, $T[\rho(r)]$ est défini par :

$$T[\rho(r)] = \sum_{\sigma=\alpha,\beta} \sum_i^{N^\sigma} \int \psi_i^\sigma(r) \frac{-\Delta}{2} \psi_i^\sigma(r) dr \quad (1.26)$$

En établissant que la fonctionnelle énergie est minimisée selon la densité de l'état fondamental $\rho(r)$, la fonctionnelle énergie $E[\rho(r)]$ doit être stationnaire par rapport à n'importe quelle variation d'une ou l'autre des densités de spin, soit :

$$\frac{\delta E[\rho(r)]}{\delta \rho^\alpha(r)} = \frac{\delta E[\rho(r)]}{\delta \rho^\beta(r)} = 0 \quad (1.27)$$

Cette condition aboutit aux équations de Kohn-Sham relatives à un électron :

$$\left\{ -\frac{\Delta}{2} - \left(\sum_A \frac{Z_A}{|r - R_A|} \right) + \int \frac{\rho'(r')}{|r - r'|} dr' + \frac{\delta E_{xc}[\rho(r)]}{\delta \rho^\sigma(r)} \right\} \psi_i^\alpha(r) = \epsilon_i \psi_i^\alpha(r) \quad (1.28)$$

avec $\sigma = \alpha$ ou β . Ces équations sont résolues de manière auto-cohérente, comme dans le cas des équations de Hartree-Fock. A partir d'une densité électronique initiale, les équations de Kohn-Sham sont construites et leur résolution aboutit à un jeu de spin-orbitales de Kohn-Sham, $\psi_i^\sigma(r)$, qui est utilisé pour générer un nouveau jeu de densité de spin totale $\rho^\alpha(r)$ et $\rho^\beta(r)$. Cette procédure est répétée jusqu'à ce que le système ait atteint sa cohérence interne.

1.4.2. Les fonctionnelles énergies d'échange-corrélation

Trois types de fonctionnelles énergies d'échange-corrélation existent :

- *Les fonctionnelles locales (LDA)* permettent de dériver des expressions approchées tirées de la théorie du gaz d'électrons de densité uniforme. Dans le cas des systèmes réels où la densité n'est pas uniforme, cette approximation n'est que localement valable et les fonctionnelles (S,²³ X_α ,²³ VMN²⁴) ne sont plus guère utilisées toutes seules.
- *Les fonctionnelles à correction du gradient (GGA)* permettent de représenter les régions de grande fluctuation et, de ce fait, elles corrigent les défauts des fonctionnelles locales en prenant en compte le gradient de la densité électronique. Les fonctionnelles les plus employées sont : Becke88,²⁵ PW91,²⁶ P86²⁷ et LYP.²⁸
- *Les fonctionnelles hybrides* traitent la partie échange de la fonctionnelle comme un mélange d'échange Hartree-Fock et d'échange DFT. La partie corrélation reste purement DFT. Elles permettent d'avoir une meilleure représentation énergétique de l'énergie d'échange-corrélation. Nous citerons la fonctionnelle hybride B3LYP.^{28,29}

L'approche DFT possède l'avantage d'introduire les effets de corrélation électronique à un coût moindre par rapport aux méthodes *ab initio* traditionnelles. Cependant, les résultats obtenus en DFT sont très dépendants des systèmes étudiés et de la qualité de la fonctionnelle d'échange-corrélation utilisée. Ainsi, il est souvent nécessaire d'appuyer des calculs DFT par des calculs de type MP2 ou autre, quand cela est possible, afin de valider les résultats DFT.

1.5. Les méthodes semi-empiriques

Les calculs *ab initio* au niveau Hartree-Fock, et surtout post Hartree-Fock, sont très demandeurs en temps de calcul et ceci augmente très rapidement avec le nombre d'atomes, ou plus exactement avec le nombre de fonctions de base. En réponse à ce problème ont été développées des *méthodes semi-empiriques*^{30,31} qui réduisent de manière importante le nombre des intégrales à calculer, tout en utilisant, en compensation, des données tirées de l'expérience. Ces méthodes sont fondées sur les approximations suivantes :

- seuls les orbitales de la couche de valence, représentées par des orbitales de Slater, sont utilisées ;

- les intégrales de recouvrement sont négligées dans la résolution des équations SCF ;
- toutes les intégrales biélectroniques, à trois ou quatre centres, sont supposées nulles. De plus, selon la nature de la méthode utilisée, certaines intégrales biélectroniques à un ou deux centres sont également négligées ;
- les termes non-diagonaux de la matrice de l'hamiltonien de cœur, supposés proportionnels à l'intégrale de recouvrement entre les orbitales atomiques concernées, sont déterminés au moyen de relations empiriques ;
- la plupart des intégrales mono- ou biélectroniques à un centre sont (souvent) estimées à partir de données tirées de spectres électroniques expérimentaux.

Parmi les méthodes semi-empiriques existantes, nous pouvons citer les méthodes de type NDDO³² (Neglect of Diatomic Differential Overlap) comme AM1³³ ou PM3,^{34,35} dans lesquelles toutes les intégrales faisant intervenir le recouvrement différentiel de deux orbitales centrées sur deux atomes différents sont négligées, ou encore la méthode CNDO³⁶ (Complete Neglect of Differential Overlap) dans laquelle les recouvrements différentiels sont complètement négligés.

1.6. Prise en compte de l'effet du solvant

1.6.1. La méthode dite du "continuum"

La possibilité d'intégrer les effets dus au solvant pour le calcul des différentes propriétés des systèmes chimiques reste un défi en chimie quantique, car cela implique l'intervention de la mécanique statistique et donc l'ajout de difficultés d'ordre supérieur. La majorité des réactions chimiques et biologiques ont cependant lieu en solution, et le désir du chimiste théoricien est donc de pouvoir posséder et utiliser des modèles permettant de tenir compte des effets dus au solvant.

L'idée de modéliser les interactions électrostatiques dues au solvant en plaçant le soluté dans une cavité de taille définie date des travaux de Kirkwood³⁷ et Onsager sur les effets de la solvation sur les molécules polaires.³⁸ A partir de l'équation de Poisson, et sous certaines conditions limites, plusieurs modèles ont été par la suite proposés.^{39,40} Dans cette approche, le soluté, traité de manière quantique, est placé dans une cavité entourée du solvant considéré comme un continuum. Ce modèle de continuum simple est le "modèle de la cavité d'Onsager", souvent dénommé "modèle SCRF", pour "Self Consistent Reaction Field".

Les modèles de type "continuum" impliquent toute sorte de formes de cavité contenant le soluté, et le solvant se trouvant en-dehors est traité comme un milieu continu, caractérisé par quelques unes seulement de ses propriétés comme sa constante diélectrique, par exemple. Le champ électrique produit par les particules chargées comprenant le soluté interagit alors avec ce milieu, produisant une polarisation, ce qui se reflète sur les fonctions d'onde du soluté.

Le modèle de solvant selon Onsager est implémenté en standard dans les programmes comme *Gaussian* en utilisant les particularités suivantes :

- utilisation d'une cavité sphérique.
- le potentiel électrostatique du soluté est représenté par sa charge (dans le cas d'un ion) ou par son moment dipolaire.

Une méthode plus sophistiquée, dénommée "Polarizable Continuum Model" (PCM) a été développée par Tomasi et ses collaborateurs⁴¹⁻⁴³ ; celle-ci permet de travailler avec des cavités de forme plus réaliste, avec une surface découpée en une sorte de mosaïque constituée de petits polygones à courbure sphérique. L'interaction électrostatique entre le soluté et le solvant est dans ce cas décrite par un ensemble de charges ponctuelles, placées au centre de chaque petit élément de surface. Ce modèle permet donc une description plus réaliste de la cavité et plus précise en ce qui concerne l'énergie due à l'interaction électrostatique entre le soluté et le milieu environnant.

La méthode PCM place ainsi le soluté dans une cavité formée par l'union de sphères centrées sur chaque atome et le potentiel électrostatique du soluté est décrit par la production d'une charge apparente (de surface) sur la surface de la cavité, ce qui implique un plus grand réalisme pour l'interaction électrostatique. Le traitement par ordinateur divise la surface en de petits morceaux sur lesquels la charge (et sa contribution au gradient) est évaluée. Sur la base de différentes études, on a défini la taille de ces sphères comme ayant un volume équivalent à environ 1,2 fois le rayon de Van der Waals.^{40,41}

Le modèle COSMO-PCM (CPCM) représente quant à lui une approche différente basée sur l'implémentation du *Conductor like Screening Model (COSMO)*.^{39,40} Dans le modèle COSMO, des charges de polarisation apparaissent aussi à la surface de la cavité. Mais celles-ci sont définies de manière à annuler sur la surface le potentiel électrostatique total. C'est cette condition limite qui fait l'originalité et la simplicité de ce modèle.

Il est généralement reconnu que les erreurs de cavité sont plus faibles dans la méthode COSMO-PCM (CPCM) que dans la méthode PCM seule, ceci étant dû à l'utilisation, dans COSMO, de conditions limites exprimées en termes de potentiel électrostatique plutôt qu'en termes de champ électrique.⁴⁴ Ces modèles ont cependant de nombreuses limitations ; l'une des plus importantes étant qu'ils ne permettent pas de tenir compte de l'aspect dynamique des effets entre le soluté et le solvant (liaisons hydrogène, par exemple). Malgré cela, ces méthodes de solvation peuvent être utilisées (approche du continuum, méthodes SCRF et PCM) afin d'améliorer les énergies et les géométries des espèces chimiques intervenant dans les mécanismes réactionnels, par exemple.

1.6.2. Modèle à cavité de Nancy

Le modèle à cavité de Nancy a été mis au point dans notre laboratoire en 1973, il n'a cessé d'évoluer jusqu'à ce jour. Ce modèle est basé sur celui proposé par Kirkwood³⁷ et Onsager.³⁸ Dans ce modèle, le solvant est considéré comme un milieu isotrope continu caractérisé uniquement par la constante diélectrique relative macroscopique. La molécule de soluté est placée à l'intérieur d'une cavité (formée dans le continuum diélectrique), dont la forme s'adapte au mieux à la géométrie du soluté. La distribution de charge (électrons + noyaux) du soluté est représentée par un développement multipolaire mono ou multicentrique. La distribution de charge va polariser le continuum, créant ainsi un champ électrique appelé champ de réaction. Ce champ va agir en retour sur la distribution de charge du soluté qui repolarisera le continuum etc... Ce processus est traité de manière auto-cohérente dans la résolution des équations SCRF (Self Consistent Reaction Field).⁴⁵⁻⁴⁸

2. L'Urate Oxydase

2.1. Fonction biologique

L'Urate Oxydase, ou Uricase (EC 1.7.3.3), est une enzyme que l'on retrouve dans de nombreux organismes allant des bactéries aux mammifères. Cette protéine intervient dans la transformation de l'acide urique en allantoïne. Cette réaction réalise en même temps la réduction du dioxygène triplet en peroxyde d'hydrogène.

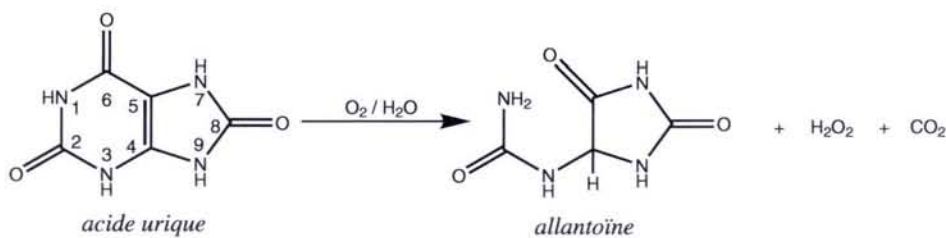


FIG. 2.1.: Réaction globale de l'acide urique avec O₂.

L'urate oxydase existe dans la plupart des procaryotes, champignons, poissons, amphibiens, oiseaux, et mammifères.⁴⁹⁻⁵³ Ainsi, chez certaines plantes tropicales légumineuses, la réaction faisant intervenir l'urate oxydase est une étape essentielle du cycle de l'urée qui assure le transport d'azote au sein de la plante.⁵⁴ Chez les mammifères, l'urate oxydase participe au métabolisme des bases puriques libérées lors des processus de mort cellulaire. Elle facilite ainsi l'expulsion d'excès d'azote dans l'organisme en facilitant la dégradation des purines en allantoïne composé plus soluble. Ceci permet d'éviter la précipitation des purines dans les reins.^{55,56}

Deux mutations dans sa séquence codante empêchent l'expression de l'urate oxydase chez l'homme et chez d'autres primates supérieurs.⁵⁷ Par conséquent, chez ces animaux supérieurs, l'acide urique est le produit terminal du métabolisme des purines. L'accumulation d'acide urique au sein de l'organisme humain a des effets positifs et négatifs sur la santé. L'acide urique a en effet des propriétés antioxydantes plus importantes que l'acide ascorbique aux concentrations physiologiques. La présence d'acide urique réduit ainsi la formation de radicaux qui peuvent être à l'origine de l'apparition de certains cancers.⁵⁸ En plus, plusieurs groupes ont montré que l'acide urique protège les globules rouges par sa capacité à éliminer les radicaux hydroxyles⁵⁹ et l'oxygène singulet.⁵⁸

L'absence d'urate oxydase chez les animaux supérieurs peut donc être considérée comme un avantage dû à l'évolution. Des taux élevés d'acide urique dans le corps, dus à la très faible

solubilité de ce produit dans l'eau au pH physiologique, peuvent entraîner l'apparition de calculs rénaux ou encore d'inflammations articulaires telles que la goutte.⁶⁰ De même, lors de chimiothérapies de certains cancers (leucémies, ...), la mort rapide d'un très grand nombre de cellules cancéreuses provoque une hyperuricémie importante pouvant entraîner des insuffisances rénales par précipitation.^{58,61-63} Pour palier ces problèmes, l'urate oxydase peut être utilisée comme médicament. Sanofi-Synthélabo commercialise l'urate oxydase extraite d'*Aspergillus flavus* sous le nom *Uricozyme*® ainsi que sa forme recombinante sous le nom de Rasburicase ou *Fasturtec*®. L'*Uricozyme*® a été enregistrée en France et en Italie par l'entreprise pharmaceutique Sanofi en 1975 et 1984 respectivement, et est considérée comme l'une des protéines thérapeutiques les plus anciennes. Sanofi-Aventis a produit ces dernières années 1 kg/an d'enzyme pour environ 15000 patients.

2.2. Données expérimentales

L'urate oxydase possède des propriétés remarquables car, même si elle peut lier des atomes de cuivre, elle n'a pas besoin d'ions métalliques, pour assurer son activité, ni même d'un cofacteur. Ainsi elle ne présente pas d'analogie mécanistique avec la plupart des autres enzymes redox.⁶⁴

D'autre part, Simic et Jovanovic ont montré que les pKas de l'acide urique sont autour de 5.4 et 9.8.⁶⁵ Laboureur et Langlois ont montré que l'urate oxydase peut être active à pH 7 mais le pH optimum de cette enzyme est de 8.5.⁶⁶ Les études de la réaction de l'urate oxydase ont commencé dans les années 30.^{67,68} Bien que l'allantoïne semble être le produit final de la réaction de l'oxydation de l'urate oxydase, la spectroscopie d'absorption et la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) montrent que l'enzyme catalyse la conversion de l'urate en une espèce métastable qui se transforme sans l'effet de l'enzyme en allantoïne.^{69,70}

Plusieurs intermédiaires ont été proposés mais c'est seulement ces dernières années que le groupe de Tipton a montré, de manière définitive par des expériences de cinétiques couplées à des études RMN, que le vrai produit de la réaction catalysée par l'urate oxydase est le 5-hydroxyisourate,⁷¹⁻⁷³ qui ensuite, s'hydrolyse spontanément en allantoïne ou dans certains organismes par une autre enzyme⁷⁴ (voir Figure 2.2).

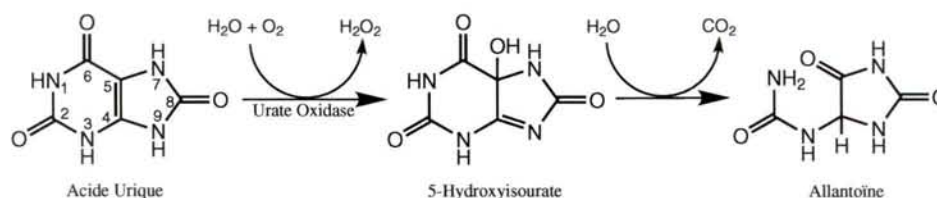
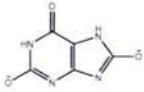
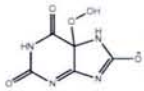
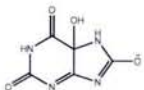
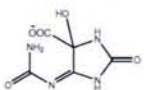


FIG. 2.2.: Détail de la réaction de transformation de l'acide urique en allantoïne par l'urate oxydase.

Modric *et al.* en 1992 ont montré par marquages isotopiques que la molécule d'eau présente au début de la réaction a permis la formation du groupement OH en position 5 dans le 5-hydroxyisourate puis H_2O_2 en fin de réaction.⁷⁰ Ces mêmes auteurs ont montré que le dioxygène

2.2. DONNÉES EXPÉRIMENTALES

Type	Structure	λ_{max} (nm)
INT I		295-297
INT II		298
HIU		302
OHCU		<240

TAB. 2.1.: Longueurs d'onde maximales des intermédiaires proposées par Tipton *et al.* (INT I : forme dianionique de l'acide urique dans l'urate oxydase ; INT II : intermédiaire 5-hydroperoxyisourate ; HIU : intermédiaire 5-hydroxyisourate ; OHCU : allantoïne).

présent au début de la réaction est à l'origine de la formation de H_2O_2 . La fonction CO en position 6 dans l'acide urique devient CO_2 en fin de réaction.⁷⁵

Le groupe de Tipton a aussi montré que cette réaction enzymatique ne fait intervenir aucun cofacteur, au contraire des réactions impliquant d'autres oxydases. Pour la plupart des oxydases, c'est en effet le cofacteur qui oxyde le substrat, le dioxygène réagissant avec le cofacteur pour le réoxyder. Dans le cas de l'urate oxydase, le dioxygène agit directement sur l'acide urique.⁷²

Par ailleurs, dans les conditions d'action de l'urate oxydase, l'acide urique se fixe sous forme de monoanion, la déprotonation étant effectuée sur l'azote 3,^{72,73} le groupe hydroxyle fixé sur le carbone 5 du produit provenant de l'eau.⁷³ Il est connu depuis longtemps que les atomes d'oxygène présents dans le peroxyde d'hydrogène produit par la réaction proviennent du dioxygène réactif.⁷⁵

En interprétant des expériences d'absorption et de fluorescence UV-Visible (voir Tableau 2.1), Tipton *et al.* ont montré que la réaction transformant l'acide urique en 5-hydroxyisourate se produit via deux intermédiaires d'absorbance et de cinétique différentes.⁷⁶ Ainsi, ils ont déterminé trois vitesses de réaction. La première est de $31.6 \pm 0.7 \text{ s}^{-1}$, qui est la plus rapide, conduisant à l'intermédiaire réactionnel appelé INT II. La deuxième vitesse qui est de $6.60 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ correspond à la formation du produit final (HIU) de la réaction catalysée par l'urate oxydase. La troisième vitesse, beaucoup plus lente, de $0.0490 \pm 0.0003 \text{ s}^{-1}$, correspond à la formation spontanée en milieu aqueux de la molécule nommée OHCU dans le Tableau 2.1. Tipton *et al.* ont montré que HIU et OHCU correspondent respectivement au 5-hydroxyisourate et à l'allantoïne. Ils suggèrent de plus que les intermédiaires INT I et INT II seraient respectivement le dianion 3-9 de l'acide urique et, par analogie avec le mécanisme des flavines oxydases,⁷⁷ le 5-hydroperoxyisourate. Ainsi, le vrai produit de la réaction catalysée par l'urate oxydase est le 5-hydroxyisourate qui se décompose spontanément en allantoïne. Dans certains organismes, cette dernière réaction peut être catalysée par une autre enzyme : l'hydroxyisourate hydrolase.⁷⁸

2.3. Structure cristallographique

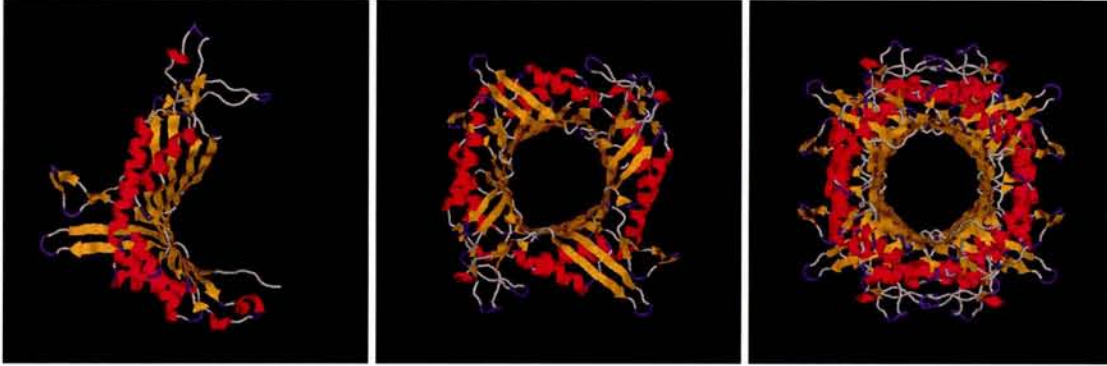


FIG. 2.3.: Structure tridimensionnelle de l'urate oxydase (a. monomère; b. dimère et c. tétramère).

La première structure tridimensionnelle dans la famille de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* a été résolue en présence d'un inhibiteur, la 8-azaxanthine (voir Figure 2.4), au Laboratoire de Minéralogie-Cristallographie de Paris (LMCP) par Nathalie Colloc'h *et al.* en 1997.⁷⁹ L'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* fournie par Sanofi-Synthélabo a été cristallisée au bout de plusieurs mois en chambre froide. Ces cristaux ont été diffractés sous une forme orthorhombique I222 jusqu'à une résolution de 2.05Å. La Figure 2.3 montre que l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* est un tétramère, chacun des monomères ayant une masse d'environ 34 kDa et étant constitué de 301 acides aminés sans pont disulfure.

Le tétramère de l'urate oxydase a des dimensions externes comprises entre 60Å et 85Å. Chacun des monomères comprend deux domaines équivalents appelés domaines T-fold.⁸⁰ Le domaine T-fold est constitué de quatre feuillets β ainsi que d'une paire d'hélices α antiparallèles située du côté concave des feuillets. Les monomères s'assemblent en dimères, liés par un axe cristallographique d'ordre 2, qui forment alors un tonneau $\alpha_8\beta_{16}$, les hélices formant l'extérieur du tonneau. Le tunnel a une longueur d'environ 50Å et un diamètre d'environ 15Å. Le tétramère résulte de la superposition face à face des dimères, liés par un axe cristallographique d'ordre 2.⁷⁹

Récemment, le complexe avec la 8-azaxanthine a été obtenu à une résolution de 1.7 Å.⁸¹ Cependant, dans la nouvelle structure, l'inhibiteur a été mis dans une orientation différente de ce qui a été montré dans la structure cristallographique initiale. En outre, des structures avec deux autres inhibiteurs l'acide 9-méthyl urique (MUA) et l'acide oxonique (OXC) dans le même groupe d'espace, I222, ont été obtenus à une résolution équivalente (1.8 Å et 1.65 Å respectivement).

Il est à noter que, outre la 8-azaxanthine,⁶⁶ l'acide 9-méthyl urique⁷⁶ et l'acide oxonique,⁸² il existe de nombreux autres inhibiteurs connus de l'urate oxydase (voir Figure 2.4).

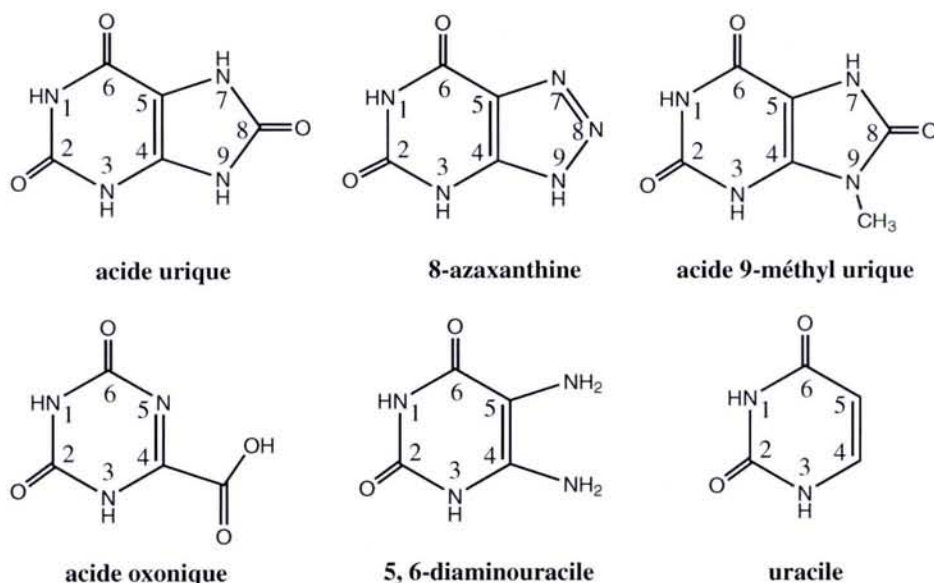


FIG. 2.4.: Structure de l'acide urique et de quelques inhibiteurs connus de l'urate oxydase.

2.3.1. Description du site actif

L'urate oxydase possède 4 sites actifs. Chacun des sites actifs n'est formé que par la présence de deux monomères. Ceci signifie qu'il est nécessaire que l'enzyme s'associe au minimum en dimère pour pouvoir avoir un effet catalytique.

Les 8 résidus (Lys10, Thr57, Asp58, Lys61, Phe159, Arg176, Gln228 et Asn254) présents dans le site actif sont conservés dans l'ensemble de la famille des urates oxydases. Ceci montre que leur rôle dans le mécanisme d'action de l'urate oxydase est primordial. De récentes expériences de mutagenèses dirigées sur la Thr57, la Lys10 ou encore sur Asp58 et Arg176 ont montré que l'activité de l'urate oxydase était considérablement réduite en l'absence de ces acides aminés confirmant ainsi leur rôle essentiel dans le mécanisme d'action.^{71,83}

2.3.2. Positionnement des molécules d'eau dans le site actif

Deux molécules d'eau en interaction avec la 8-azaxanthine dans le site actif de l'urate oxydase (annotées W1 et W2) sont visibles par diffraction de rayons X, donc fixes dans le site actif (voir Fig. 2.5). Ces molécules au voisinage de la 8-azaxanthine pourraient jouer un rôle primordial dans le mécanisme enzymatique. Une première molécule d'eau W1 se situe à la verticale de la liaison C5-C6, stabilisée par la présence de Asn254 et Thr57, résidu lui-même en interaction avec Lys56. Cette molécule d'eau est retrouvée avec l'acide 9-méthyl urique et avec l'acide oxonique, ce qui incite à penser qu'elle est aussi présente avec l'acide urique. Une seconde molécule d'eau W2 en interaction par liaison hydrogène avec l'azote N9 est identifiée dans la structure cristallographique contenant la 8-azaxanthine. Cette molécule disparaît logiquement dans la structure

cristallographique avec l'acide 9-méthyl urique à cause du groupement méthyle.⁸¹ On peut supposer naturellement que cette molécule d'eau se retrouve dans le site actif dans le cas d'une interaction de l'acide urique avec l'urate oxydase. Ces deux molécules d'eau ne sont plus visibles en absence d'inhibiteur ce qui confirme qu'elles sont en interaction forte avec l'inhibiteur et donc très probablement avec l'acide urique.⁷⁹

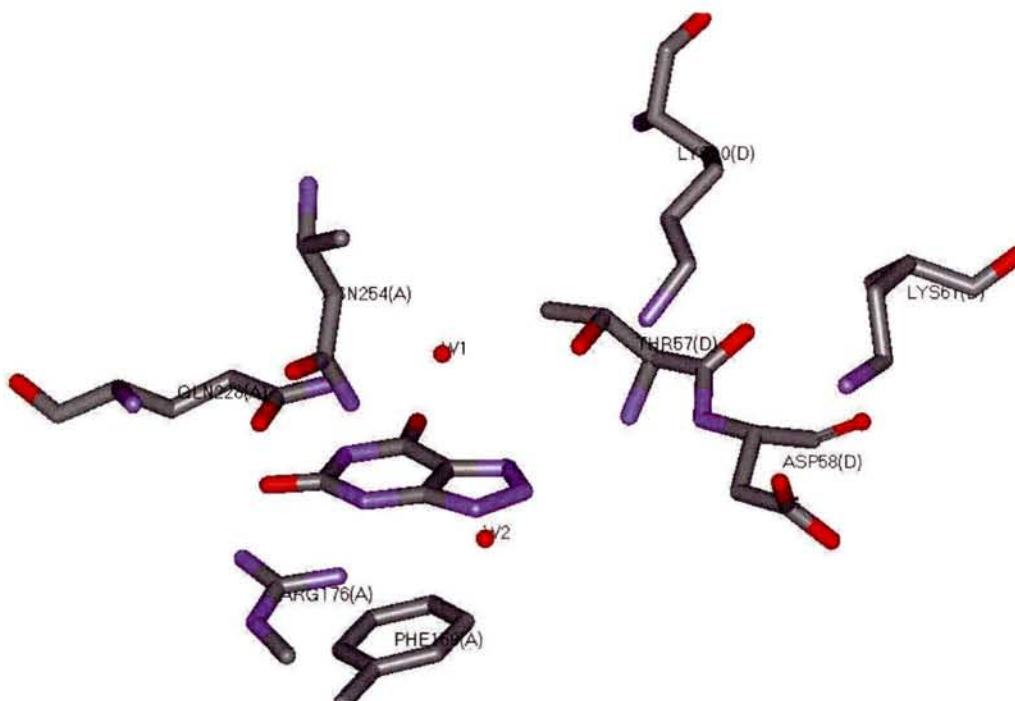


FIG. 2.5.: Position de la 8-azaxanthine et des molécules d'eau dans le site actif de 2UOX.

2.3.3. Forme du substrat dans le site actif

D'un point de vue structurel, puisque l'acide urique est proche de l'acide 9-méthyl-urique, ou de la 8-azaxanthine, il est possible d'établir un modèle du site actif avec le substrat placé dans une position similaire à celle des inhibiteurs. Quelques points sont remarquables dans ce modèle (voir Figure 2.6) :

- Des expériences sur le *Bacillus subtilis* ont montré que Thr69 et Lys9 (qui correspondent respectivement à Thr57 et Lys10 dans l'Urate Oxydase d'*Aspergillus flavus*) sont essentiels pour l'activité de l'enzyme. Cependant, les mutants T69A ou K9M ne sont pas actifs.⁷¹
- La distance entre N3 et l'azote de Arg176 ($\sim 3 \text{ \AA}$) ne permet de laisser de la place que pour un proton. De même la distance entre l'oxygène qui est lié au C2 et l'autre azote de la même chaîne latérale d'Arg176 ne permet de laisser la place que pour un proton. En supposant que le résidu Arg176 est protoné normalement, l'acide urique est ionisé en position 3.

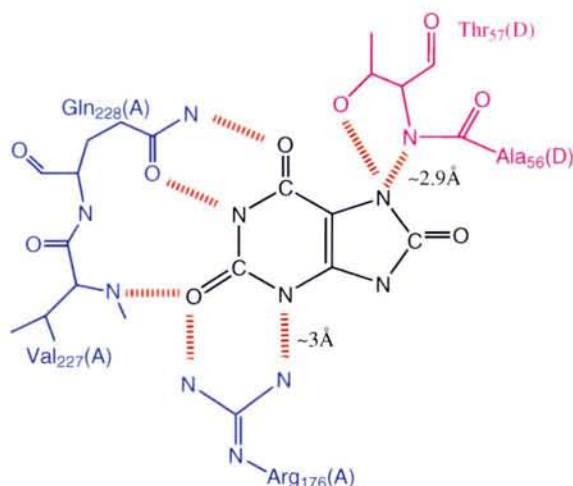


FIG. 2.6.: Les liaisons hydrogènes entre l'acide urique et le site actif de l'urate oxydase d'après 2UOX.

- la distance entre l'azote 7 et l'azote de la chaîne principale de Thr57 ($\sim 2.9 \text{ \AA}$) permet également de laisser la place pour un proton. Ce proton appartient nécessairement à la chaîne principale de l'enzyme. Par conséquent, l'acide urique devrait avoir une charge négative en position 7.
- Ainsi, le substrat est maintenu essentiellement au sein du site actif via son cycle à 6 par Arg176, Gln228 et Phe159; le résidu Thr57 se liant au cycle à 5. La présence de Thr57 ainsi que Arg176 implique que le substrat est sous forme dianionique, les charges étant sur les atomes N3 et N7.

2.4. Mécanisme proposé dans la littérature

Tipton *et al.* ont proposé deux intermédiaires entre le dianion urate et le 5-hydroxyisourate.^{71,76,84} Selon eux, la fixation du dioxygène réactif sur le même carbone C5 du dianion donnerait le 5-hydroperoxyisourate qui, après libération du peroxyde d'hydrogène, conduirait à la formation du déhydrourate. En interprétant des expériences d'absorption et de fluorescence UV-Visible (Tableau 2.1) ainsi qu'en observant la première structure cristallographique 1UOX de Colloc'h *et al.*,⁷⁹ ces mêmes auteurs suggèrent que les deux intermédiaires (INT I et INT II) sont respectivement l'acide urique sous forme dianionique (en N3 et N9) et le 5-hydroperoxyisourate^{76,85} (voir Figure 2.7).

Malheureusement, ce mécanisme a été proposé à partir de la structure 1UOX publiée de l'urate oxydase. Or, en 2004, une nouvelle structure plus fiable (2UOX⁸¹) a montré que le dianion urate inséré à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase ne pouvait être que le dianion 3-7 et non le dianion 3-9. De plus, une visualisation rapide du nouveau site actif de l'enzyme montre que l'intermédiaire II proposé par Tipton (le 5-hydroperoxyisourate) ne peut s'y insérer facile-

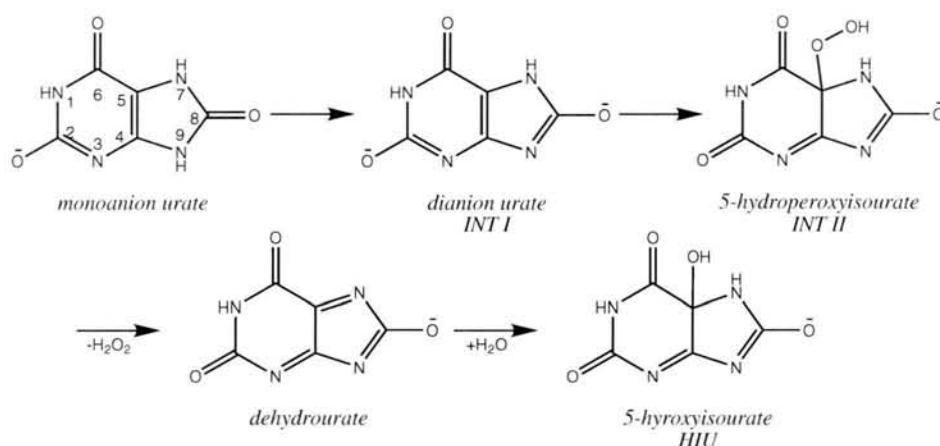


FIG. 2.7.: Mécanisme réactionnel proposé par Tipton *et al.*^{76,85}

ment*. Ainsi, les dernières données expérimentales ne semblent pas être en accord avec le chemin mécanistique proposé par Tipton.

2.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les propriétés principales de l'urate oxydase, les données expérimentales obtenues sur la réaction d'oxydation de l'acide urique et les structures cristallographiques de l'urate oxydase évoquées dans la littérature. Cependant, le mécanisme réactionnel de l'acide urique reste à l'état d'hypothèse. Ainsi, nous allons, dans les chapitres suivants, nous intéresser à l'étude théorique du mécanisme réactionnel de l'urate oxydase. Dans cette étude nous utiliserons la nouvelle structure cristallographique de l'urate oxydase de résolution 1.7Å.⁸¹

*Nous montrerons ce résultat d'un point de vue énergétique au Chapitre 5.

3. Etude théorique de l'acide urique et de ses anions

L'acide urique est un composé biologique important. Il est naturellement produit par le catabolisme des purines.⁸⁶ Son accumulation dans le sang peut produire des maladies diverses telles que la goutte. Notre intérêt pour la compréhension du mécanisme de l'urate oxydase nous a d'abord mené à modéliser précisément son substrat principal qui est l'acide urique. Généralement, les composés dérivés des purines peuvent exister sous plusieurs formes tautomères.⁸⁷ Nous nous intéressons donc, dans ce chapitre, à l'application des approches quantiques pour étudier les diverses formes tautomères dans le vide et dans le solvant de l'acide urique afin de découvrir la forme tautomère la plus stable. Par la suite, nous nous concentrerons sur la description de la structure électronique de la forme la plus stable dans les deux milieux.

D'autre part, Simic et Jovanovic ont montré que les pKas de l'acide urique sont autour de 5 et 10.^{65,73,88} Cela veut dire que l'acide urique existe principalement sous sa forme anionique au pH physiologique. Pour déterminer la forme anionique la plus stable de l'acide urique nous avons étudié son état de protonation dans le vide et dans le solvant.

Par ailleurs, Dougherthy *et al.*,⁸⁹ ont déterminé expérimentalement les potentiels d'ionisation de diverses purines, et ils ont montré que l'acide urique était un bon donneur d'électrons. Parce que l'acide urique est impliqué dans une réaction d'oxydo-réduction au sein de l'urate oxydase, nous avons déterminé également les potentiels d'ionisation de l'acide urique et de ses anions pour savoir quelle est la forme la plus favorable susceptible de fournir un électron à un possible accepteur.

Enfin, des études de spectroscopie UV-Visible de l'acide urique ont été effectuées par Bergmann *et al.*⁹⁰ et Shukla *et coll.*⁹¹ Ces auteurs ont montré que la longueur d'onde maximale d'absorption de l'acide urique change en fonction du pH. Par ailleurs Tipton *et al.* ont montré que la réaction d'oxydation de l'acide urique en 5-hydroxyisourate se produit via deux intermédiaires par une étude de fluorescence UV-Visible.⁷⁶ Nous avons donc modélisé les spectres UV-Visible de l'acide urique et de ses anions afin de les comparer avec ces résultats expérimentaux.

3.1. Etude des formes tautomères de l'acide urique

Les purines peuvent exister généralement sous plusieurs formes tautomères.⁸⁷ Une étude quantique nous a permis de considérer chacune de ces structures afin d'en évaluer la forme la plus probable et étudier la possibilité d'avoir un équilibre entre plusieurs formes à température ambiante. De plus, la modélisation de l'effet du solvant sur les propriétés de ces composés chimiques est maintenant possible,^{48,93} et il semble intéressant d'analyser l'influence possible de

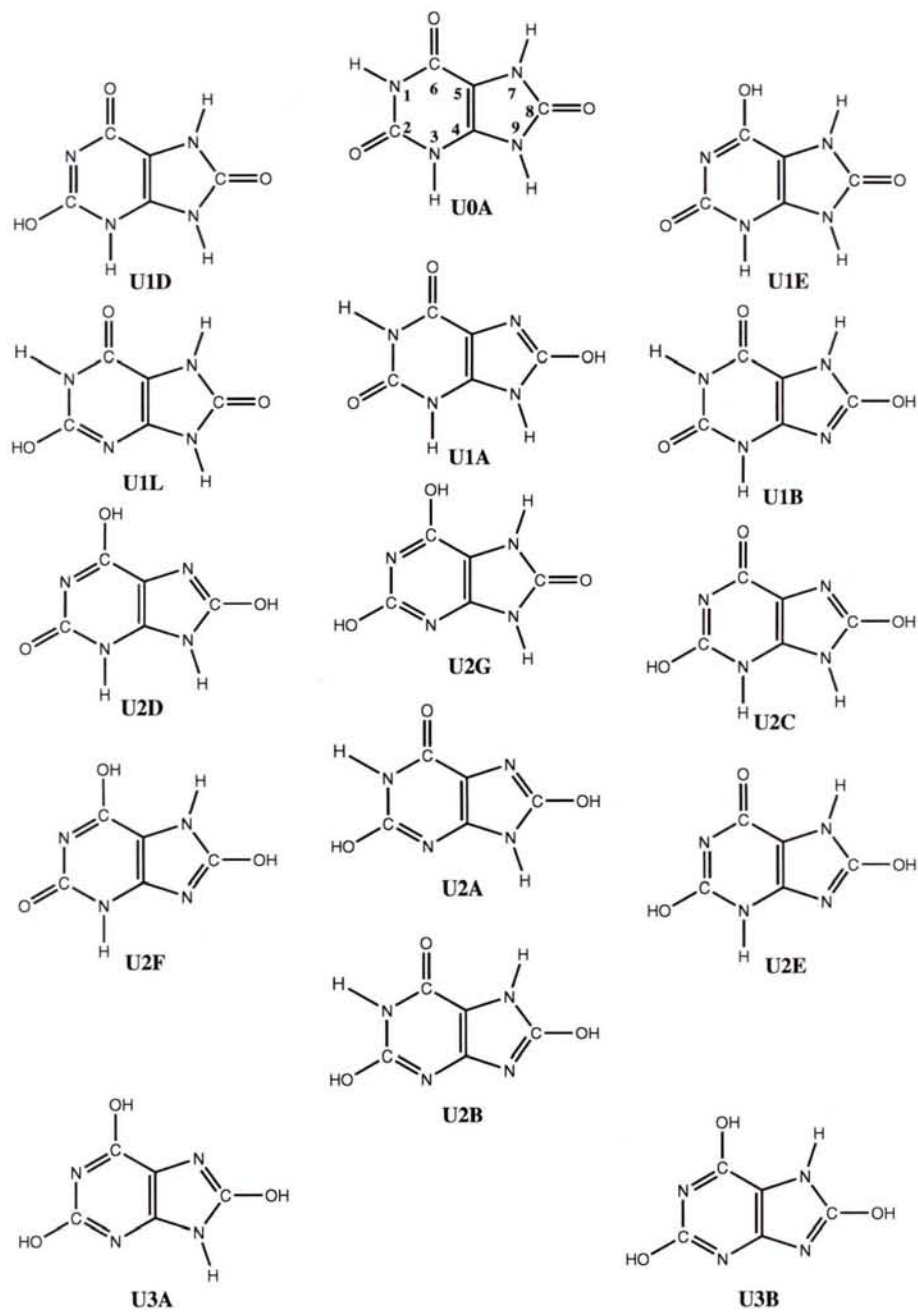


FIG. 3.1.: Les quinze formes tautomères de l'acide urique. L'indexation de ces formes est celle de Chen *et al.*⁹²

l'environnement, en particulier l'eau, sur ces propriétés.

D'une part, une étude théorique pour les formes tautomères a été réalisée par Chen *et al.*,⁹² en utilisant un niveau de calcul bas et sans prendre en compte l'effet du solvant. Elle a montré que la forme la plus stable de l'acide urique est le tautomère de tricabonyl (U0A). D'autre part, Demir *et al.*⁹⁴ ont étudié les formes tautomères de l'acide urique dans le solvant par des méthodes semi-empiriques. Leurs conclusions étaient semblables à celles de Chen *et al.*⁹² De plus, Allen *et al.*⁹⁵ ont effectué une étude sur les propriétés tautomériques de l'acide urique et ses différents anions au niveau MP2 et en DFT, en tenant compte de l'effet de solvant. Ils ont aussi montré que la forme U0A est la forme tautomère la plus stable parmi tous les tautomères envisageables. Enfin, une étude cristallographique de l'acide urique a aussi montré l'existence privilégiée de la structure planaire triketo.⁹⁶

3.1.1. Détails des calculs

Tous les calculs ont été réalisés avec le programme Gaussian98.⁹⁷ Cinq méthodes de calculs ont été comparées afin de vérifier la justesse des résultats en ce qui concerne la méthodologie utilisée. Deux études ont été réalisées par la méthode de Hartree-Fock avec les bases 6-31G**⁹⁸⁻¹⁰⁰ (HF/6-31G**) et 6-31+G**⁹⁸⁻¹⁰¹ (HF/6-31+G**), et des calculs par la méthode DFT en utilisant la fonctionnelle B3LYP^{28,29} et les mêmes bases qu'en HF. Ces calculs sont respectivement référencés dans ce qui suit comme B3LYP/6-31G** et B3LYP/6-31+G**. Une autre étude a été effectuée en utilisant des calculs d'énergie simple selon la méthode MP2 avec la base 6-31G** sur des géométries optimisées en B3LYP (MP2/6-31G**//B3LYP/6-31G**). L'effet du solvant a été considéré au niveau de B3LYP/6-31G** à l'aide du modèle de Nancy⁴⁸ mis en application dans le programme Gaussian98. L'eau a été modélisée par un continuum de constante diélectrique 78.54. Cette étude est notée B3LYP/6-31G**(S). En plus, des calculs de thermochimie ont été réalisés pour les différentes formes isolées, sauf au niveau de MP2.

3.1.2. Résultats et discussion

Calculs réalisés dans le vide

Parmi toutes les structures possibles de tautomères de l'acide urique, nous avons considéré 15 tautomères résultant de la tautomérisation de groupes CO et NH adjacents (voir Figure 3.1).

Toutes les énergies totales et relatives en ce qui concerne la forme la plus stable, et les valeurs des moments dipolaires sont indiquées dans le tableau 3.1.

En comparant les énergies relatives de chaque forme tautomère, nous avons constaté que l'acide urique sous sa forme triketo (U0A) est la forme la plus stable parmi toutes. Trois autres tautomères notés U1B, U1L et U2G sont relativement proches en énergie de U0A (entre 2 et 6 kcal/mol suivant les méthodes quantiques employées et les tautomères considérés). Il pourrait donc exister un équilibre thermodynamique entre ces quatre espèces, U0A étant l'espèce largement majoritaire. Tous les autres tautomères ont des énergies de plus de 10 kcal/mol au-dessus de U0A, et par conséquent, leur probabilité d'existence semble nulle. Les stabilités relatives de U1B et U1L par rapport aux autres U1s (*i.e.*, les tautomères construits à partir d'une

CHAPITRE 3. ETUDE THÉORIQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

		HF/ 6-31G**	HF/ 6-31+G**	B3LYP/ 6-31G**	B3LYP/ 6-31+G**	MP2// 6-31G**	B3LYP/ 6-31G**(S)
U0A	E	-634.14027	-634.15740	-637.68574	-637.71677	-635.94425	-637.69801
	ΔE	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	μ	3.20	3.31	3.04	3.23	3.49	3.92
U1A	E	-634.12039	-634.13763	-637.66363	-637.69488	-635.92669	-637.67856
	ΔE	14.47	12.40	13.87	13.73	11.02	12.20
	μ	6.57	6.77	6.31	6.62	6.85	8.02
U1B	E	-634.13709	-634.15471	-637.67910	-637.71088	-635.94021	-637.68659
	ΔE	1.99	1.69	4.18	3.69	2.53	7.17
	μ	4.97	5.14	4.70	4.96	5.17	5.74
U1D	E	-634.10837	-634.12657	-637.65510	-637.68740	-635.91463	-637.67082
	ΔE	20.01	19.35	19.23	18.49	18.59	17.06
	μ	6.98	7.23	6.40	6.79	7.25	8.18
U1E	E	-634.11620	-634.13364	-637.66429	-637.69550	-635.92089	-637.67746
	ΔE	15.10	14.91	13.46	13.35	14.66	12.90
	μ	1.94	1.99	2.06	2.14	2.11	2.80
U1L	E	-634.13449	-634.15220	-637.68049	-637.71203	-635.93976	-637.68840
	ΔE	3.62	3.25	3.29	2.97	2.82	6.03
	μ	5.74	5.97	4.86	5.20	5.83	5.95
U2A	E	-634.11489	-634.13264	-637.65902	-637.69070	-635.92305	-637.66790
	ΔE	15.92	15.54	16.76	16.36	13.30	18.90
	μ	5.36	5.54	4.97	5.27	5.55	6.28
U2B	E	-634.11863	-634.13693	-637.66233	-637.69462	-635.92455	-637.67106
	ΔE	13.57	12.85	14.75	13.90	12.36	16.91
	μ	1.47	1.60	1.36	1.55	1.60	1.52
U2C	E	-634.08502	-634.10332	-637.62955	-637.66203	-635.89325	-637.64201
	ΔE	34.67	33.94	35.26	34.35	32.00	35.14
	μ	8.58	8.85	8.12	8.54	8.87	10.54
U2D	E	-634.09770	-634.11552	-637.64357	-637.67525	-635.90438	-637.65916
	ΔE	26.71	26.28	26.47	26.05	25.02	24.38
	μ	6.31	6.59	6.00	6.32	6.59	7.65
U2E	E	-634.10635	-634.12496	-637.64987	-637.68276	-635.91226	-637.65862
	ΔE	21.28	20.36	22.51	21.34	20.08	24.72
	μ	5.14	5.36	4.82	5.16	5.38	6.06
U2F	E	-634.10926	-634.12723	-637.65413	-637.68615	-635.91331	-637.66335
	ΔE	19.45	18.94	19.83	19.21	19.42	21.75
	μ	7.05	7.30	6.50	6.85	7.10	8.23
U2G	E	-634.13205	-634.14943	-637.67596	-637.70718	-635.93572	-637.68242
	ΔE	5.15	5.01	6.14	6.01	5.35	9.78
	μ	1.85	1.97	1.39	1.55	1.77	1.61
U3A	E	-634.11195	-634.12975	-637.65481	-637.68650	-635.91853	-637.66241
	ΔE	17.77	17.35	19.41	18.99	16.14	22.34
	μ	2.91	2.97	2.91	3.02	3.13	3.68
U3B	E	-634.11053	-634.12862	-637.65329	-637.68543	-635.91550	-637.66176
	ΔE	18.06	18.06	20.36	19.67	18.04	22.75
	μ	3.52	3.60	3.36	5.57	3.54	4.41

TAB. 3.1.: Energies totales (E, en hartrees), énergies relatives (ΔE , en kcal/mol), et moments dipolaires (μ , en Debye) de l'acide urique et de ses formes tautomères en phase gazeuse et en solution.

3.1. ETUDE DES FORMES TAUTOMÈRES DE L'ACIDE URIQUE

seule tautomérisation d'un groupement CONH) peuvent être expliquées en remarquant que les hydrogènes en position 1 et 7 sont chacun entourés par deux groupements carbonyles. Ainsi les charges partielles négatives de chaque oxygène de ces deux groupements CO stabilisent la charge partielle positive de l'hydrogène placé sur les azotes 1 ou 7. Il y a ainsi une stabilisation électrostatique des hydrogènes en 1 et 7 dans U0A, U1B et U1L qui n'existent pas dans U1A, U1D et U1E. Dans le cas d'une double tautomérisation (forme U2s), la stabilité relative de U2G par rapport à U2A, U2B, U2C, U2D, U2E et U2F peut s'expliquer par l'apparition d'un cycle à 6 aromatique dans U2G.

Par l'analyse des moments dipolaires des tautomères, nous avons trouvé que l'acide urique ne présente pas le moment dipolaire le plus faible parmi tous les tautomères possibles. Par contre, les formes U2B et U2G ont les moments dipolaires les plus faibles, ce qui pourrait être dû à la différence de direction entre les moments dipolaires des groupements CO et NH dans ces deux formes. Par ailleurs, nous avons trouvé que U2C présente le moment dipolaire le plus grand parmi tous les tautomères. Ceci peut encore être expliqué en regardant les directions des moments dipolaires partiels des CO et NH : dans U2C ces moments dipolaires ont la même direction.

Afin d'obtenir des données thermodynamiques plus précises, nous avons calculé la correction d'énergie de point zéro (ZPE), l'entropie (S) et l'énergie libre relative (ΔG) pour toutes les formes. Ces résultats sont indiqués dans le Tableau 3.2. Comparativement aux résultats présentés auparavant sur les énergies relatives entre les formes tautomères, on constate dans le cas des énergies libres relatives que la forme U0A est encore plus stable par rapport aux autres formes.

De plus, nous pouvons constater que l'ordre de stabilité ne varie pas entre les Tableaux 3.1 et 3.2. Ceci nous permet de confirmer les conclusions présentées précédemment qui montrent que l'acide urique est la forme la plus stable.

D'une manière générale, nos résultats sont en concordance qualitative et quantitative avec les résultats publiés par Chen *et al.*,⁹² et également en accord avec les résultats de Dimer *et al.*⁹⁴ au niveau semi empirique et avec Allen *et al.*⁹⁵ qui ont utilisé les méthodes DFT et MP2 à haut niveau. Ceci confirme également les résultats obtenus par l'étude cristallographique de l'acide urique qui a montré qu'il est sous forme cristalline ayant une structure planaire triketo.⁹⁶

Calculs réalisés dans le solvant

Pour analyser l'influence possible de l'environnement moléculaire, une étude de l'effet électrostatique du solvant a été réalisée au niveau B3LYP/6-31G** qui semble être un bon compromis entre exactitude et coûts des calculs. Ici, le solvant utilisé est l'eau.

Le Tableau 3.3 présente les résultats des calculs réalisés dans l'eau. La présence d'un solvant ne modifie pas l'ordre de stabilité des tautomères, par contre la différence d'énergie entre la forme la plus stable et les trois autres formes (U1B, U2G, U1L) augmente légèrement d'environ 3 kcal/mol. Bien que les calculs d'énergies libres n'ont pas été réalisés dans ce cas, nous pouvons prévoir un équilibre dû au solvant déplacé vers la forme la plus stable U0A. De plus, le Tableau 3.3 rapporte une analyse détaillée de l'effet du solvant. L'énergie de solvation (c.à.d. la différence énergétique entre la phase gazeuse et les structures optimisées dans le solvant) est décomposée en deux contributions : *i*) l'interaction soluté—solvant qui représente l'interaction entre les structures optimisées dans le solvant et le continuum diélectrique, *ii*) l'énergie de polari-

CHAPITRE 3. ETUDE THÉORIQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

		HF/6-31G**	HF/6-31+G**	B3LYP/6-31G**	B3LYP/6-31+G**
U0A	ZPE	74.32	73.89	68.43	68.15
	ΔG	0.00	0.00	0.00	0.00
	S	92.85	93.56	95.12	95.29
U1A	ZPE	74.57	74.18	68.36	68.07
	ΔG	12.91	13.19	16.13	13.74
	S	91.89	92.37	94.62	94.87
U1B	ZPE	74.92	74.53	68.82	68.53
	ΔG	2.86	2.63	5.57	4.32
	S	91.22	91.68	93.73	93.91
U1D	ZPE	74.11	73.76	68.03	67.78
	ΔG	19.87	19.31	21.84	18.15
	S	92.74	93.23	95.27	95.39
U1E	ZPE	73.14	73.76	68.17	67.92
	ΔG	14.94	14.77	15.42	13.21
	S	92.66	93.46	94.62	94.78
U1L	ZPE	74.70	74.31	68.67	68.39
	ΔG	4.30	4.00	4.46	3.50
	S	91.15	91.67	93.33	93.47
U2A	ZPE	75.01	74.65	68.65	68.37
	ΔG	17.10	16.87	20.21	17.02
	S	90.08	90.40	92.70	92.91
U2B	ZPE	74.97	74.62	68.71	68.45
	ΔG	14.68	14.12	17.92	14.64
	S	90.29	90.60	92.76	92.91
U2C	ZPE	74.20	73.86	67.81	67.56
	ΔG	34.67	34.09	40.19	33.78
	S	90.94	91.43	92.93	93.08
U2D	ZPE	74.53	74.19	68.21	67.93
	ΔG	27.26	26.96	30.72	26.07
	S	92.43	92.83	95.30	95.50
U2E	ZPE	74.80	74.46	68.51	68.26
	ΔG	22.12	21.35	26.53	21.76
	S	90.92	91.26	93.54	93.70
U2F	ZPE	74.70	74.33	68.47	68.21
	ΔG	20.12	19.73	23.35	19.53
	S	91.13	91.53	93.60	93.79
U2G	ZPE	74.61	74.24	68.67	68.39
	ΔG	5.79	5.75	7.85	6.67
	S	91.04	91.45	93.76	94.06
U3A	ZPE	75.01	74.68	68.75	68.46
	ΔG	19.06	18.83	23.52	19.87
	S	89.51	89.81	92.03	92.27
U3B	ZPE	74.80	74.47	68.61	68.36
	ΔG	19.64	19.24	24.39	20.38
	S	90.12	90.40	92.45	92.60

TAB. 3.2.: Correction d'énergie de point zéro (ZPE), énergie libre relative (ΔG) et entropie (S) pour l'acide urique et ses tautomères dans le vide (en kcal/mol).

3.1. ETUDE DES FORMES TAUTOMÈRES DE L'ACIDE URIQUE

	ΔE		Energie totale de Solvatation	Interaction Soluté-Solvant	Energie de Polarization	Moment Dipolaire	$\Delta \mu$ ($g \rightarrow s$)
	phase gazeuse	solvant					
U0A	0.00	0.00	-7.7	-8.6	0.9	3.92	0.88
U1A	13.87	12.20	-9.4	-11.0	1.6	8.02	1.71
U1B	4.18	7.17	-4.7	-5.2	0.5	5.74	1.04
U1D	19.23	17.06	-9.9	-11.7	1.8	8.18	1.78
U1E	13.46	12.90	-8.3	-9.4	1.1	2.80	0.74
U1L	3.29	6.03	-5.0	-5.6	0.6	5.95	1.09
U2A	16.76	18.90	-5.6	-6.6	1.0	6.28	1.31
U2B	14.75	16.91	-5.5	-6.0	0.5	1.52	0.16
U2C	35.26	35.14	-7.8	-15.2	7.4	10.54	2.42
U2D	26.47	24.38	-9.8	-11.4	1.6	7.65	1.65
U2E	22.51	24.72	-5.5	-6.4	0.9	6.06	1.24
U2F	19.83	21.75	-5.8	-6.9	1.1	8.23	1.73
U2G	6.14	9.78	-4.1	-4.4	0.3	1.61	0.22
U3A	19.41	22.34	-4.8	-5.2	0.4	3.68	0.77
U3B	20.36	33.75	-5.3	-5.9	0.6	4.31	0.95

TAB. 3.3.: Energie relative en phase gazeuse et dans l'eau, énergie totale de solvatation, interaction soluté-solvant, énergie de polarisation et moment dipolaire en solution pour l'acide urique et ses tautomères au niveau de B3LYP/6-31G** (énergies en kcal/mol, moments dipolaires en Debye).

sation qui explique la modification supplémentaire de la structure électronique et de la géométrie de la phase gazeuse sous l'influence du solvant. Ainsi, nous pouvons remarquer que, en première approximation, ces espèces se comportent selon la valeur de leur moment dipolaire : plus leur moment dipolaire est grand, plus l'énergie de polarisation et la valeur absolue de l'énergie de solvatation sont grandes. Ce comportement peut être lié au modèle simple d'Onsager³⁸ où l'énergie de solvatation est directement exprimée en fonction du moment dipolaire.

Analyse détaillée de la forme la plus stable

Les propriétés de la forme U0A en phase gazeuse ou dans le solvant peuvent être analysées à l'aide des données des Tableaux 3.4 et 3.5 qui représentent respectivement les charges atomiques¹⁵ et les ordres de liaisons¹⁰² dans U0A. Dans le solvant, H₃ et H₉ sont les hydrogènes les plus chargés positivement. Selon la charge de Mülliken, H₃ et H₉ perdent 0,025 et 0,026 électrons respectivement par rapport à l'état isolé. Ce fait peut être relié aux propriétés acides de la molécule résultant de la déprotonation des NH. Le tableau 3.5 montre que les ordres des liaisons ne varient pas de la phase gazeuse à la phase aqueuse. Les groupements carbonyles possèdent un comportement fort de liaison double, tandis que la liaison C₄-C₅ est uniquement double par la délocalisation relative des électrons entre les atomes C₄, C₅, C₆ et O₆.

Pour conclure, cette étude prouve qu'avec l'aide de calculs quantiques nous pouvons effectuer une analyse détaillée de quelques phénomènes complexes qui sont difficilement étudiables expérimentalement. Dans notre cas, nos résultats prouvent qu'il n'y a aucune ambiguïté concernant la structure la plus probable de l'acide urique, dans la phase gazeuse ou dans le solvant. En

CHAPITRE 3. ETUDE THÉORIQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

	Charges atomiques de Mülliken		Charges atomiques de Löwdin	
	phase gazeuse	solvant	phase gazeuse	solvant
C ₄	0.617	0.631	0.100	0.110
C ₅	0.229	0.228	-0.068	-0.069
N ₁	-0.623	-0.622	-0.159	-0.157
N ₃	-0.671	-0.668	-0.139	-0.124
N ₇	-0.652	-0.655	-0.125	-0.123
N ₉	-0.649	-0.642	-0.150	-0.133
C ₂	0.747	0.753	0.199	0.201
O ₂	-0.495	-0.520	-0.296	-0.317
C ₆	0.603	0.604	0.163	0.163
O ₆	-0.508	-0.538	-0.292	-0.320
C ₈	0.752	0.757	0.185	0.186
O ₈	-0.508	-0.540	-0.299	-0.327
H ₁	0.297	0.299	0.219	0.220
H ₃	0.287	0.312	0.220	0.234
H ₇	0.293	0.296	0.222	0.226
H ₉	0.281	0.307	0.218	0.231

TAB. 3.4.: Charges atomiques selon Mülliken et Löwdin en *u.a.* pour l'acide urique naturel (UOA) en phase gazeuse et dans le solvant au niveau de B3LYP/6-31G**.

	Ordres de liaisons	
	phase gazeuse	solvant
C ₄ —C ₅	1.45	1.44
C ₅ —C ₆	1.08	1.09
N ₁ —C ₂	1.02	1.02
N ₁ —C ₆	0.87	0.88
N ₃ —C ₂	0.97	0.99
N ₃ —C ₄	0.91	0.92
N ₇ —C ₅	0.88	0.87
N ₇ —C ₈	1.06	1.06
N ₉ —C ₄	0.97	0.98
N ₉ —C ₈	0.93	0.95
C ₂ —O ₂	1.86	1.84
C ₆ —O ₆	1.80	1.78
C ₈ —O ₈	1.86	1.83
N ₁ —H ₁	0.89	0.87
N ₃ —H ₃	0.89	0.88
N ₇ —H ₇	0.89	0.89
N ₉ —H ₉	0.89	0.88

TAB. 3.5.: Ordres de liaisons pour l'acide urique naturel (UOA) en phase gazeuse et dans le solvant au niveau de B3LYP/6-31G**.

outre, les calculs quantiques réalisés dans le solvant nous ont permis de corrélérer simplement les propriétés acides de la molécule avec les résultats obtenus par calculs.

3.2. Stabilités relatives des anions urates

Nous avons prouvé précédemment que la forme la plus stable de l'acide urique présente quatre centres d'acidité qui peuvent libérer un proton en solution (N1, N3, N7 et N9). Les pKas expérimentaux de l'acide urique ont été évalués expérimentalement autour de 5 et 10.^{65,73,88} Ainsi, à pH neutre, l'acide urique existe sous une forme monoanionique, en solution ou dans le corps humain.^{60,103-105}

De plus, Laboureur et Langlois⁶⁶ ont montré que l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* agit entre pH 6 et 11, avec un optimum à 8.5. La stabilité de l'urate oxydase d'*Aspergillus flavus* a été étudiée entre pH 6 et 10; l'enzyme est instable en pH acide; inversement, sa stabilité augmente avec l'alcalinité; elle est maximale entre pH 8 et 9, et diminue à partir de 10. Ces diverses données expérimentales sur les pKas et les pH optimums de l'enzyme nous conduisent à envisager que c'est un acide urique sous forme d'anion urate qui interagit *in vivo* avec l'urate oxydase. Cependant nous n'avons aucune indication expérimentale sur la nature de cet anion (charge totale et structure). Ainsi, il est important de se demander quel est le monoanion et/ou le dianion le plus stable en solution. Quatre monoanions différents suivant la position de la charge négative peuvent être envisagés à partir de U0A (voir Figure 3.2). Six dianions différents peuvent être construits à partir de ces quatre monoanions (voir Figure 3.3)

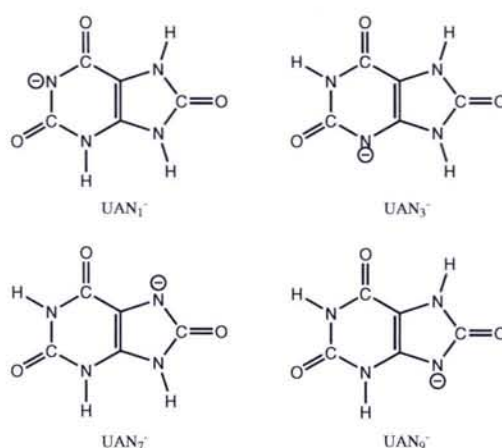


FIG. 3.2.: Structures des monoanions de l'acide urique.

L'ordre de déprotonation de l'acide urique a été suggéré par plusieurs auteurs. Bergmann et Dikstein⁹⁰ ont utilisé la spectroscopie d'absorption UV et ont conclu que tous les acides uriques substitués avec les positions 9 libres sont les premiers à être dissociés. Ils ont également proposé que l'acide urique ne possède pas plus de deux constantes de dissociation puisque seulement des sels disodiques et dipotassiques de l'acide urique peuvent être préparés.

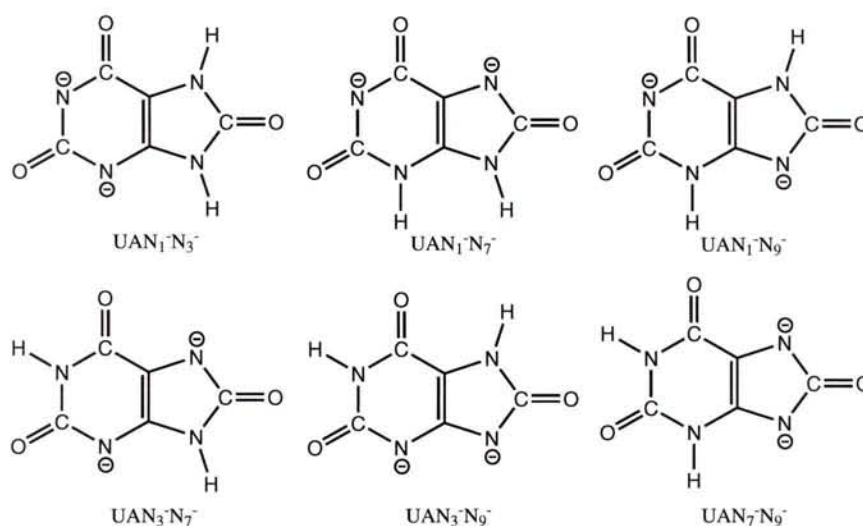


FIG. 3.3.: Structures des dianions de l'acide urique.

D'autre part, Shukla et Mishra⁹¹ ont associé expérience spectrométrique et calcul théorique par la méthode semi-empirique CNDO pour conclure que, en conditions acides, l'acide urique existe sous la forme cétonique (U0A), tandis qu'en conditions basiques le monoanion urate est déprotoné en position N3. Cependant, à proximité d'un pH neutre, l'acide urique existerait comme un mélange de la forme cétonique et anionique. Par ailleurs, Kahn *et al.*,¹⁰⁶ en utilisant des méthodes de calculs *ab initio* et une analyse de ¹³C en RMN, ont conclu que le monoanion de l'acide urique vient de la déprotonation de la position N3.

Par ailleurs, une étude théorique a été réalisée par Allen *et al.*⁹⁵ en utilisant un haut niveau de calcul et en tenant compte de l'effet du solvant. Cette étude a montré que, parmi tous les monoanions possibles de l'acide urique, l'espèce obtenue par la déprotonation du N3 est la plus stable. Enfin, parmi les six dianions possibles, l'espèce obtenue par la déprotonation de N3 et N9 est la plus stable dans la phase gazeuse et dans l'eau.

3.2.1. Mise en œuvre des calculs

Les géométries des différentes espèces anioniques de l'acide urique ont été optimisées en utilisant différentes méthodes quantiques (PM3, HF, DFT) et selon plusieurs bases. Deux autres calculs ont été effectués en utilisant la méthode MP2 avec les bases 6-31G** et 6-31+G** sur les espèces anioniques optimisées au niveau B3LYP. De plus, pour estimer l'effet du solvant sur la stabilité relative des anions d'acide urique, nous avons appliqué le modèle PCM de Tomasi^{42,107,108} mis en application dans le programme G03⁹³ et le modèle réalisé par l'Equipe de chimie et Biochimie Théoriques de Nancy.⁴⁸

3.2.2. Résultats et discussion

Stabilités relatives des monoanions de l'acide urique

Les énergies relatives des monoanions sont reportées dans le Tableau 3.6. Le monoanion 3 obtenu par la déprotonation de la position N₃-H de l'acide urique est la forme la plus stable parmi toutes. Ceci est en concordance avec les résultats obtenus par Allen *et al.*⁹⁵ La stabilité relative des monoanions suit l'ordre : $AUN_3^- > AUN_9^- > AUN_7^- > AUN_1^-$.

Cependant, le monoanion 9 est moins stable que le monoanion 3 avec une différence d'énergie de 1.1 kcal/mol au niveau de B3LYP/6-31+G** et environ de 1.5 kcal/mol au niveau MP2/6-31G**//B3LYP/6-31G**. Nous avons aussi effectué les mêmes calculs dans le solvant au niveau B3LYP/6-31G** et nous avons eu les mêmes résultats qui confirment que le monoanion 3 est la forme la plus stable avec le même ordre de stabilisation. Par ailleurs, le monoanion 9 est très proche énergétiquement du monoanion 3. Par conséquent, les deux formes de monoanions (AUN_3^- et AUN_9^-) sont susceptibles d'exister en milieu aqueux, la concentration de AUN_3^- devant être plus importante que celle de la forme AUN_9^- . Par contre, les monoanions AUN_7^- et AUN_1^- étant énergétiquement beaucoup plus haut que AUN_3^- et AUN_9^- , ces monoanions ne devraient pas exister en solution.

Méthode	Urate Monoanions			
	1	3	7	9
PM3	16.3	0.0	17.6	3.6
HF/6-31G**	23.5	0.0	24.6	2.6
B3LYP/6-31G**	21.1	0.0	18.7	1.3
B3LYP/6-31+G**	20.3	0.0	18.7	1.1
MP2//HF/6-31G**	17.2	0.0	18.6	1.6
MP2//B3LYP/6-31G**	20.9	0.0	17.4	1.5
PM3(Nancy)	7.7	0.0	11.4	3.3
B3LYP/6-31G**(Nancy)	12.6	0.0	10.8	2.1
MP2/6-31G**//B3LYP/6-31G**(PCM)	12.2	0.0	8.9	1.6
MP2/6-31G**//B3LYP/6-31G**(Nancy)	13.1	0.0	10.0	2.2

TAB. 3.6.: Energies relatives des monoanions dérivés de l'acide urique par rapport au monoanion 3 (en kcal/mol).

Stabilités relatives des dianions de l'acide urique

Le Tableau 3.7 reporte les stabilités relatives des six dianions de la Figure 3.3. Le dianion $AUN_3^-N_9^-$ obtenu par la déprotonation de N₉-H d' AUN_3^- est le plus stable parmi tous les dianions. La stabilité relative des dianions suit l'ordre : $AUN_3^-N_9^- > AUN_3^-N_7^- > AUN_1^-N_9^- > AUN_7^-N_9^- > AUN_1^-N_7^- > AUN_1^-N_3^-$.

Au niveau de MP2/6-31G**//B3LYP/6-31G**, l'énergie relative du dianion $AUN_3^-N_7^-$ est 0.3 kcal/mol au-dessus de $AUN_3^-N_9^-$. Ceci montre que le dianion $AUN_3^-N_7^-$ est énergétiquement très proche en phase gazeuse par rapport au dianion $AUN_3^-N_9^-$. Un calcul par la méthode DFT au

niveau B3LYP/6-31+G** dans le solvant a été fait en utilisant le modèle à cavité de Nancy et a donné des résultats quasi-identiques, confirmant ainsi que le dianion $\text{AUN}_3^-\text{N}_7^-$ est très proche du dianion $\text{AUN}_3^-\text{N}_9^-$ d'un point de vue énergétique. Ces résultats sont conformes à ceux de Shukla et Mishra⁹¹ et de Kahn *et al.*¹⁰⁶ Ils sont également en accord avec ceux de Allen *et al.*⁹⁵ excepté pour les dianions dont l'énergie relative est plus élevée dans leur cas. De manière générale, l'ensemble de ces résultats suggère que la formation de l'état anionique de l'acide urique nécessite la déprotonation de $\text{N}_3\text{-H}$, puis celle de $\text{N}_9\text{-H}$ ou de $\text{N}_7\text{-H}$.

Méthode	Urate Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	15.1	14.2	0.6	4.6	0.0	24.7
HF/6-31G**	24.2	24.8	5.3	4.5	0.0	25.9
B3LYP/6-31G**	22.9	21.8	5.3	2.3	0.0	19.3
B3LYP/6-31+G**	20.8	21.8	4.6	2.9	0.0	18.5
MP2//HF/6-31G**	22.3	20.4	4.9	0.5	0.0	24.6
MP2//B3LYP/6-31G**	22.1	19.9	4.4	0.3	0.0	17.9
PM3(Nancy)	20.6	16.9	2.4	5.4	0.0	26.7
B3LYP/6-31G**(Nancy)	11.1	13.6	6.5	2.7	0.0	13.0
MP2//B3LYP/6-31G**(PCM)	12.5	12.1	5.1	0.6	0.0	10.6
MP2//B3LYP/6-31G**(Nancy)	13.7	12.0	4.5	-0.4	0.0	11.0

TAB. 3.7.: Energies relatives des dianions dérivés de l'acide urique par rapport au dianion 3-9 (en kcal/mol).

3.3. Potentiels d'ionisation de l'acide urique et de ses anions

3.3.1. Potentiels d'ionisation

Le potentiel d'ionisation d'une molécule est lié directement à sa capacité de donner un électron. Dougherty *et al.*⁸⁹ ont déterminé expérimentalement les potentiels d'ionisation verticaux de diverses purines et ont montré que l'acide urique était un bon donneur d'électron avec un potentiel d'ionisation vertical de 197 ± 3 kcal/mol.

En plus, une étude théorique a été faite par Allen *et al.*⁹⁵ pour déterminer les potentiels d'ionisation verticaux et adiabatiques de l'acide urique. Ils ont obtenu des potentiels d'ionisation verticaux de 192.8 et 138.7 kcal/mol respectivement dans le vide et dans le solvant, et des potentiels d'ionisation adiabatiques de 186.1 et 132.8 kcal/mol respectivement dans le vide et dans le solvant. Ce travail a été réalisé par la méthode DFT.

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à étudier les potentiels d'ionisation de toutes les formes anioniques des anions urates. Nous avons réalisé nos calculs par différentes méthodes quantiques qui ont été décrites précédemment.

3.3. POTENTIELS D'IONISATION DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

Méthode	Acide Urique	Monoanions			
		1	3	7	9
PM3	168.0	66.0	56.7	46.4	54.4
HF/6-31G**	162.1	56.5	42.1	26.3	39.5
B3LYP/6-31G**	177.4	67.5	60.5	48.7	58.6
B3LYP/6-31+G**	185.9	81.5	74.6	63.1	72.9
MP2//B3LYP/6-31G**	182.1	71.2	66.4	56.2	63.7
B3LYP/6-31G** (Nancy)	130.4	107.3	102.3	93.1	100.7

TAB. 3.8.: Potentiels d'ionisation (IP) de l'acide urique et de ses monoanions (en kcal/mol).

Résultats et discussion

Pour vérifier la précision de nos méthodes de calcul, nous avons déterminé au préalable les potentiels d'ionisation verticaux de l'acide urique. Les potentiels d'ionisation verticaux de l'acide urique ont été calculés par la différence entre l'énergie de l'état excité (Urate⁺) et celle de l'état fondamental (Urate), les deux molécules ayant une même géométrie : celle de l'état fondamental optimisée. Ces potentiels d'ionisation sont respectivement de 192.3 and 199.0 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31+G** et MP2/6-31+G**//B3LYP/6-31+G**. Les valeurs obtenues par le calcul sont comparables à celles trouvées expérimentalement par Dougherty *et al.*. En effet, nous avons obtenu des potentiels d'ionisation verticaux de l'acide urique très proches de ceux de Dougherty *et al.*⁸⁹ et également en accord avec ceux de Allen *et al.*⁹⁵

Ensuite, à partir des méthodes utilisées pour déterminer les potentiels d'ionisation verticaux, nous avons réalisé l'étude des potentiels d'ionisation adiabatiques de l'acide urique et de ses anions. Les potentiels d'ionisation adiabatiques ont été calculés par la détermination des énergies relatives des deux états ayant chacun une géométrie optimisée. Dans le cas de l'acide urique et des monoanions, la réaction permettant de donner un électron demande une énergie croissante en allant de AUN₇⁻, AUN₉⁻, AUN₃⁻ à AUN₁⁻ (voir Tableau 3.8).

Méthode	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	-46.9	-44.5	-38.7	-54.1	-44.1	-68.1
HF/6-31G**	-74.1	-69.0	-64.2	-77.3	-65.6	-93.0
B3LYP/6-31G**	-55.5	-55.2	-49.4	-60.4	-50.8	-70.3
B3LYP/6-31+G**	-32.7	-33.3	-27.4	-38.4	-28.9	-48.0
MP2//B3LYP/6-31G**	-47.2	-51.9	-48.8	-57.8	-49.2	-68.3
B3LYP/6-31G** (Nancy)	76.5	70.8	75.0	66.2	75.3	62.8

TAB. 3.9.: Potentiels d'ionisation (IP) des dianions de l'acide urique (en kcal/mol).

Par contre dans le cas des dianions, le potentiel d'ionisation devient négatif en phase gazeuse. En effet, la réaction permettant de donner un électron, dans le cas des dianions, est plus favorable. L'ordre de réactivité des dianions permettant de donner un électron est : AUN₇⁻N₉⁻, AUN₃⁻N₇⁻, AUN₁⁻N₃⁻, AUN₁⁻N₇⁻, AUN₃⁻N₉⁻ et AUN₁⁻N₉⁻ (voir Tableau 3.9). En comparant les potentiels d'ionisation des dianions, nous pouvons constater que le dianion 7-9 est la forme la

plus favorable pour donner un électron. Cependant nous avons conclu de l'étude précédente sur la stabilité relative des dianions que ce dianion 7-9 n'existe pas en solution. Donc c'est le dianion 3-7 qui présente la forme la plus favorable, parce qu'il existe en solution et possède un potentiel d'ionisation inférieur à celui des autres dianions qui peuvent exister.

Pour étudier l'influence possible de l'environnement, un calcul de l'effet électrostatique du solvant a été réalisé au niveau B3LYP/6-31G**. Nous avons constaté que la présence de solvant ne modifie pas l'ordre de probabilité des réactions à donner un électron. Toutefois, nous pouvons remarquer que les potentiels d'ionisation des dianions sont positifs. Ceci montre que le solvant a un effet important sur les potentiels d'ionisation. Les résultats ainsi obtenus pour l'acide urique sont en accord avec ceux trouvés par Allen *et al.*⁹⁵

3.3.2. Affinité électronique du dioxygène

Sachant que l'oxydation de l'acide urique est favorisée par la présence d'O₂ et que l'acide urique est un bon donneur d'électron, quelle est donc la capacité de l'O₂ de capter un électron ? Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des calculs de l'affinité électronique dans le vide et dans le solvant par des méthodes quantiques.

Expérimentalement, Travers *et al.*^{109,110} ont montré que l'affinité électronique de l'O₂ est de 10.4 kcal/mol. Par ailleurs, Ding *et al.*¹¹¹ ont réalisé un calcul théorique sur l'affinité électronique par la méthode DFT avec les fonctionnelles B3LYP et PW91, et ils ont trouvé des affinités électroniques de 11.3 et 10.2 kcal/mol respectivement. Le Tableau 3.10 représente l'affinité électronique de l'O₂ que nous avons calculée par différentes méthodes quantiques dans le vide et dans le solvant.

Méthode	O ₂
PM3	9.1
HF/6-31G**	33.8
B3LYP/6-31G**	12.7
B3LYP/6-31+G**	-13.7
MP2//B3LYP/6-31G**	20.9
MP2//B3LYP/6-31+G**	-2.8
B3LYP/6-31G**(Nancy)	-60.4

TAB. 3.10.: Affinité électronique (EA) du dioxygène (en kcal/mol).

L'affinité électronique obtenue par la méthode HF dans le vide est la plus élevée (33.8 kcal/mol) et celle par PM3 est la plus faible (9.1 kcal/mol). La présence de la fonction diffuse donne une affinité électronique négative, cela est dû à une trop grande stabilisation, dans ce cas, de la charge négative dans O₂⁻. De plus, les calculs réalisés dans le solvant montrent que ce dernier a aussi un effet important de stabilisation sur l'affinité électronique (-60.4 kcal/mol). Les résultats obtenus, sans tenir compte des effets de fonctions diffuses et du solvant sont comparables à ceux obtenus expérimentalement^{109,110} et également en accord avec les résultats théoriques trouvés par Ding *et al.*¹¹¹

3.4. Spectroscopie UV-Visible de l'acide urique et de ses anions

Nous avons montré dans le deuxième chapitre que l'acide urique réagit avec le dioxygène pour former le 5-hydroxyisourate dans l'urate oxydase. Une étude spectroscopique UV-Visible a été faite par Tipton *et al.*⁷⁶ pour déterminer la variation de l'absorbance et identifier les intermédiaires de cette réaction. Ces auteurs ont montré que la réaction transformant l'acide urique en 5-hydroxyisourate se produit via deux intermédiaires (voir Tableau 2.1). Peut-on reproduire les résultats de Tipton *et al.*⁷⁶ ? Pour cela, nous devons utiliser des méthodes quantiques permettant de calculer des spectres UV-Visible.

Ces méthodes ont été testées sur un petit système qui est l'acide urique et ses anions. Expérimentalement, Bergmann et Dikstein⁹⁰ ont étudié le changement de la longueur d'onde de l'acide urique en solution en fonction du pH. Cette étude a montré que la longueur d'onde de l'acide urique à pH 2 est de 285 nm. En modifiant le pH à 8, la longueur d'onde dans ce cas est de 292 nm qui représente la longueur d'onde maximale pour les monoanions. Pour les dianions les longueurs d'onde maximales à pH 12 sont de 294 nm.

Shukla et Mishra⁹¹ ont également étudié l'absorption électronique de l'acide urique à différents pH. Ils ont identifié deux pics d'absorbance dans l'intervalle 200-300 nm. A pH 2.7, l'acide urique présente deux longueurs d'onde d'absorption à 283 et 230 nm. A pH 7, ces pics d'absorbance se situent à 290 et 233 nm. A pH 10.6, l'acide urique possède deux longueurs d'onde d'absorption à 293 et 220 nm. Dans cette même publication, Shukla et Mishra ont calculé théoriquement les transitions électroniques de l'acide urique et d'un de ses monoanions (le monoanion 3) en utilisant la méthode CIS-CNDO sur une géométrie optimisée par les méthodes AM1 et PM3. Ils ont trouvé des concordances relativement bonnes entre leurs spectres théoriques et expérimentaux.

Cependant, nous avons observé précédemment qu'une solution d'acide urique à pH neutre est composée d'un mélange de deux monoanions : une majorité de monoanion 3 avec une minorité de monoanion 9, alors qu'à pH élevé, la solution d'acide urique se compose de trois dianions (dianion 3-9 en majorité avec un peu de dianion 3-7 et dianion 1-9).⁹⁵

Les méthodes quantiques que nous avons choisies de tester sont les suivantes : ZINDO,¹¹² CIS¹¹³ et TD-DFT¹¹⁴⁻¹¹⁷ en utilisant différentes bases (3-21G, 6-31G, 6-31G**, 6-31++G** et aug-cc-pvdz¹¹⁸) et en les testant sur la reproduction du spectre UV-Vis de l'acide urique. Pour toutes les méthodes utilisées, nous présentons les longueurs d'onde maximales d'absorption entre 200-340 nm avec les forces d'oscillateur correspondantes.

3.4.1. Méthodologie

D'un point de vue quantique, il est important de déterminer quel niveau de théorie et quel type de base sont nécessaires pour déterminer les spectres UV. Pour déterminer les spectres UV de nos molécules, les méthodes ZINDO (Zerners's intermediate neglect of differential overlap),¹¹² CIS (Configuration Interaction Singles)¹¹³ et TD-DFT (Time-dependent density-functional)¹¹⁴⁻¹¹⁷ ont été utilisées. Les effets du solvant ont été regardés pour chaque méthode. Pour les molécules

en phase gazeuse, aucune comparaison avec des données expérimentales n'est possible car ces dernières ne sont disponibles que dans le solvant. La méthode ZINDO est une méthode semi-empirique spécialisée dans le calcul des spectres UV-Visibles. Des spectres UV suivant cette méthode ont été calculés à partir de géométries optimisées par PM3. Les calculs de spectre UV par la méthode CIS avec et sans effet de solvant ont été effectués sur des géométries optimisées par la méthode HF en phase gazeuse. Enfin les longueurs d'onde maximales selon la théorie de la TD-DFT^{114,115} ont été déterminées après l'optimisation des géométries par la méthode DFT correspondante en phase gazeuse.

3.4.2. Résultats et discussion

Dans une première étude, nous avons essayé d'évaluer la performance de la méthode ZINDO¹¹² en présence de nos substrats (acide urique neutre, monoanion 3 et dianion 3-7) dans le vide et dans l'eau (constante diélectrique 78) en tenant compte des différents modèles de solvant disponibles dans Gaussian 03 (PCM,¹⁰⁸ IPCM¹¹⁹ et COSMO^{44,107,120}). Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 3.11, où nous avons présenté dans la première ligne les longueurs d'onde maximales expérimentales de l'acide urique, des monoanions et des dianions. Les lignes suivantes représentent les résultats obtenus (λ_{max} et forces d'oscillateur correspondantes) théoriquement par la méthode ZINDO dans le vide et dans le solvant selon différents modèles de solvant. Pour chaque méthode et chaque molécule, nous avons présenté les deux transitions électroniques les plus élevées dans l'intervalle 200-340 nm (c.-à-d., les deux transitions électroniques ayant les forces d'oscillateur les plus hautes).

	Acide Urique	Monoanions	Dianions
Expérimentalement	283 230	290 233	293 220
Méthode	Acide Urique	AUN ₃ ⁻	AUN ₃ N ₇ ⁻
ZINDO	318(0.337) 258(0.313)	303(0.187) 253(0.213)	296(0.465) 206(0.429)
ZINDO(PCM)	318(0.099) 252(0.313)	314(0.104) 269(0.283)	308(0.119) 237(0.391)
ZINDO(IPCM)	298(0.373) 252(0.337)	296(0.213) 240(0.278)	284(0.534) 249(0.044)
ZINDO(COSMO)	271(0.339) 211(0.481)	248(0.488) 201(0.398)	248(0.473) —

TAB. 3.11.: Longueurs d'onde maximales d'absorption de l'acide urique et de ses anions entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode ZINDO en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).

Dans le cas de l'étude de ces espèces dans le vide, les longueurs d'onde maximales de l'acide urique, du monoanion 3 et du dianion 3-7 sont respectivement de 318, 303 et 296 nm. Nous avons constaté que les déplacements des longueurs d'onde maximales sont complètement différents de ceux obtenus expérimentalement. Malgré cette différence au niveau des déplacements de longueurs d'onde par la méthode ZINDO dans le vide, nous avons essayé de suivre la variation de

3.4. SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

ces longueurs d'onde entre l'acide urique, le monoanion et le dianion. Les expériences montrent une variation de +7 nm entre l'acide urique et les monoanions, et de +3 nm entre ces derniers et la solution dianionique.^{90,91} En comparant ces variations avec nos résultats, nous pouvons constater qu'avec la méthode ZINDO en phase gazeuse cet ordre est inversé. Pour essayer d'obtenir des résultats théoriques plus conformes avec l'expérience, nous avons testé l'influence du solvant en utilisant différents modèles. Avec le premier modèle (PCM), nous avons constaté que les déplacements des longueurs d'onde ne sont pas non plus en accord avec les résultats expérimentaux. De plus les variations qui ont été calculées par ce modèle ne correspondent pas aux valeurs expérimentales. Pour les modèles IPCM et COSMO, nous sommes arrivés aux mêmes conclusions que précédemment.

Ainsi, d'après l'ensemble de nos résultats en phase gazeuse et dans le solvant, nous constatons que la méthode ZINDO ne parvient pas à reproduire par le calcul les spectres UV-Visible de l'acide urique obtenus expérimentalement.

C'est pour cette raison que nous avons utilisé, dans une seconde étude, une autre méthode spectroscopique : la méthode CIS. Les résultats UV obtenus par la méthode CIS¹¹³ basés sur des géométries optimisées par la méthode HF sont indiqués dans le Tableau 3.12. Cette méthode a permis également de tester l'effet de la taille de la base sur les longueurs d'onde maximales d'absorption.

	Acide Urique	Monoanions	Dianions
Expérimentalement	283	290	293
	230	233	220
Méthode	Acide Urique	AUN ₃ ⁻	AUN ₃ N ₇ ⁻
HF/3-21G	201(0.233)	214(0.268)	236(0.243)
HF/6-31G	206(0.239)	211(0.250)	239(0.250)
HF/6-31G**	209(0.228)	225(0.236)	237(0.235)
HF/6-31++G**	212(0.245)	221(0.159)	243(0.250)
HF/6-31++G** (COSMO)	218(0.320)	222(0.281)	237(0.251)

TAB. 3.12.: Longueurs d'onde maximales d'absorption de l'acide urique et de ses anions entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode CIS en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).

Dans le cas où nous avons utilisé la base 3-21G, nous avons trouvé que les longueurs d'onde maximales sont de 201, 214 et 236 nm pour l'acide urique, le monoanion 3 et le dianion 3-7 respectivement. En comparant ces longueurs d'onde avec les valeurs expérimentales, nous constatons que cette méthode ne permet pas d'obtenir les valeurs absolues des longueurs d'onde obtenues expérimentalement. Par contre, cette méthode permet de connaître l'ordre de l'état de protonation de l'acide urique, résultat qui était impossible avec la méthode ZINDO.

Toutefois, nous n'avons pas obtenu la même variation de longueurs d'onde (+13 et +35 nm entre l'acide urique et le monoanion et le dianion respectivement) qu'expérimentalement (+7 et +3 nm entre l'acide urique, et le monoanion et le dianion respectivement).

Pour diminuer ces différences nous avons regardé l'effet d'un changement de base sur les résultats. En utilisant la base 6-31G, nous avons obtenu de meilleurs résultats mais toujours

loin de ceux obtenus expérimentalement. En tenant compte des effets des fonctions de polarisation et des fonctions diffuses, nous avons encore diminué l'écart entre les valeurs théoriques et expérimentales jusqu'à 71, 69 et 50 nm pour l'acide urique, le monoanion 3 et le dianion 3-7, respectivement. Ceci représente des erreurs énergétiques dans les transitions électroniques entre 1.0 et 1.3 eV, un écart par rapport à l'expérience qui semble courant avec la méthode CIS.

L'utilisation du modèle de solvant COSMO permet d'améliorer encore les déplacements et la variation de longueurs d'onde mais ces résultats restent loin de l'expérience. Comme avec la méthode ZINDO, les calculs UV par la méthode CIS ne donnent pas de résultats assez intéressants en vue de reproduire les résultats expérimentaux UV de l'acide urique et ses anions.

Enfin, dans une autre étude, nous avons réalisé des calculs spectroscopiques avec la méthode TD-DFT. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le Tableau 3.13 en utilisant différentes bases et différentes fonctionnelles d'échange corrélation. Ici, seulement le modèle solvant COSMO a été pris en compte.

Avec la méthode TD-DFT, les fonctionnelles BLYP^{25,28} et BPW91²⁶ ont été testées avec la base aug-cc-pvdz pour améliorer nos résultats. Les résultats obtenus montrent que le déplacement et la variation de longueurs d'onde théoriques sont différents de ceux obtenus expérimentalement dans le vide et dans le solvant.

Expérimentalement	Acide Urique	Monoanions	
	283 230	290 233	
Méthode TD-DFT	Acide Urique	AUN ₃ ⁻	AUN ₉ ⁻
B3LYP/6-31G**	266(0.131) 223(0.162)	270(0.125) 230(0.124)	275(0.215) 259(0.090)
B3LYP/6-31G** (COSMO)	268(0.197) 226(0.220)	270(0.177) 224(0.247)	277(0.293) 233(0.109)
B3LYP/6-31++G**	270(0.148) 229(0.177)	276(0.147) 229(0.179)	283(0.261) 264(0.091)
B3LYP/6-31++G** (COSMO)	274(0.237) 233(0.255)	278(0.360) 230(0.335)	285(0.360) 246(0.133)
BLYP/aug-cc-pvdz	309(0.093) 271(0.103)	313(0.091) 270(0.076)	308(0.194) 275(0.042)
BLYP/aug-cc-pvdz (COSMO)	305(0.110) 271(0.120)	307(0.101) 263(0.117)	304(0.171) 286(0.076)
BPW91/aug-cc-pvdz	305(0.094) 267(0.108)	308(0.093) 261(0.037)	303(0.183) 270(0.082)
BPW91/aug-cc-pvdz (COSMO)	301(0.114) 266(0.124)	303(0.101) 258(0.121)	301(0.171) 282(0.075)

TAB. 3.13.: Longueurs d'onde maximales d'absorption de l'acide urique et de ses monoanions entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode TD-DFT en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).

En faisant les calculs avec la méthode TD-DFT (6-31++G** (COSMO)), nous avons obtenu les valeurs de variation les plus proches des résultats expérimentaux. En ce qui concerne les

3.4. SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

Expérimentalement	Dianions		
		293	220
Méthode	AUN ₃ ⁻ N ₉ ⁻	AUN ₃ ⁻ N ₇ ⁻	AUN ₁ ⁻ N ₉ ⁻
TD-DFT			
B3LYP/6-31G**	275(0.137)	302(0.094)	290(0.046)
	233(0.042)	243(0.215)	243(0.133)
B3LYP/6-31G**	280(0.191)	293(0.139)	284(0.344)
(COSMO)	214(0.064)	239(0.288)	222(0.112)
B3LYP/6-31++G**	281(0.161)	291(0.082)	288(0.035)
	221(0.157)	243(0.114)	270(0.136)
B3LYP/6-31++G**	289(0.242)	290(0.181)	282(0.368)
(COSMO)	222(0.126)	246(0.359)	210(0.200)
BLYP/aug-cc-pvdz	320(0.086)	347(0.067)	
	253(0.147)	286(0.111)	
BLYP/aug-cc-pvdz	319(0.114)	335(0.077)	
(COSMO)	249(0.286)	281(0.139)	
BPW91/aug-cc-pvdz	315(0.051)	349(0.058)	
	248(0.176)	286(0.089)	
BPW91/aug-cc-pvdz	314(0.116)	329(0.079)	
(COSMO)	245(0.260)	277(0.149)	

TAB. 3.14.: Longueurs d'onde maximales d'absorption des dianions de l'acide urique entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode TD-DFT en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).

longueurs d'onde maximales les plus basses, nous avons observé que l'absorbance maximale de l'acide urique est de 233 nm selon B3LYP/6-31++G**(COSMO), et de +3 nm par rapport au spectre expérimental. Dans le cas monoanionique, le monoanion 3 a une absorbance de 230 nm d'après nos calculs, alors que le monoanion 9 qui est le deuxième monoanion le plus stable de l'urate est situé à 246 nm. Nous avons montré précédemment que le monoanion 3 de l'acide urique devrait être la forme la plus abondante et en comparant les forces d'oscillateur des monoanions 3 et 9 (valeurs qui sont liées directement à l'absorbance), nous avons remarqué que la force d'oscillateur du monoanion 9 est très inférieure à celle du monoanion 3 (0.133 et 0.335 a.u. respectivement). Ainsi, il est possible que la longueur d'onde maximale du monoanion 9 ne soit pas détectée expérimentalement en raison de la concentration faible du monoanion 9 en solution. Le dianion 3-9 a une absorbance maximale de 222 nm, qui est très proche de la valeur expérimentale (220 nm). Les absorbances maximales des dianions 3-7 et 1-9 sont respectivement de 246 et 210 nm.

Dans le cas de l'absorbance maximale la plus élevée, expérimentalement, Shukla et Mishra⁹¹ ont trouvé que la longueur d'onde maximale de l'acide urique est de 283 nm. En utilisant la méthode TD-DFT avec la base 6-31++G**(COSMO), nous avons obtenu une longueur d'onde maximale de l'acide urique de 274 nm. Ce décalage de -9 nm correspond à une erreur raisonnable d'un point de vue énergétique (0.14 eV).^{117, 121}

Le monoanion 3 a sa longueur d'onde d'absorption la plus élevée à 278 nm avec une force

d'oscillateur de 0.360 a.u, alors que le monoanion 9 a une longueur d'onde d'absorption à 285 nm avec la même force d'oscillateur. Ces monoanions (monoanion 3 et 9) ont la même force d'oscillateur, et ils sont les monoanions les plus stables en solution. La proportionnalité entre ces deux monoanions peut être calculée en faisant l'hypothèse que leurs pics théoriques sont déviés de -9 nm comme dans le cas de l'acide urique. Ceci donne une proportion d'environ 56% pour le monoanion 3 et de 43% pour le monoanion 9. Cela représente une différence d'énergie de 0.33 kcal/mol, en accord avec nos résultats et ceux obtenus par Allen *et al.*⁹⁵

Dans le cas du dianion de l'urate, et si nous appliquons le même décalage de +9 nm, nous trouvons pour les longueurs d'onde maximales des trois dianions les plus stables en solution un barycentre situé à 294 nm presque identique au 293 nm du pic expérimental. Ceci nous conforte dans l'idée qu'une solution d'urate à pH 10 est composée de plusieurs espèces dianioniques.

Ainsi, le calcul réalisé par B3LYP/6-31++G**(COSMO) reproduit correctement les variations de longueurs d'onde maximales de l'acide urique obtenues expérimentalement en solution à différents pH. Cependant, nos résultats montrent que les absorbances maximales qui ont été obtenues expérimentalement ne peuvent être interprétées que si nous considérons qu'à pH 7, une solution d'urate se compose d'un mélange de monoanions 3 et 9, et qu'à pH 10.6, elle se compose d'un mélange de dianions 3-9, 3-7 et 1-9.

3.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié les propriétés chimiques et spectroscopiques de l'acide urique et de ses anions. Cette étude prouve qu'avec des calculs quantiques, nous pouvons corréler simplement les propriétés acides de la molécule avec les résultats obtenus par le calcul. Nous avons montré que l'acide urique est la forme la plus stable parmi toutes les formes tautomères qui ont été étudiées. Aussi, nous avons montré que le monoanion 3 et le dianion 3-9 présentent les formes les plus stables parmi toutes. Cependant, le monoanion 9 et les dianions 3-7 et 1-9 sont proches énergétiquement par rapport aux formes anioniques les plus stables. De plus, nous avons montré que le dianion 3-7 présente la forme la plus favorable pour donner un électron (potentiel d'ionisation).

Les études théoriques des spectres de l'acide urique ont montré que i) seule une méthode de type TD-DFT associée à un effet de solvant est en mesure de reproduire correctement les spectres UV-Visible expérimentaux de l'acide urique et de ses anions ; ii) les solutions d'anions urates sont très probablement composées de mélanges d'espèces anioniques : un mélange de monoanions 3 et 9 autour de pH 7 et un mélange de dianions 3-9, 3-7 et 1-9 au-delà de pH 10.

Sur la base de ces résultats, nous nous intéresserons dans le chapitre suivant à l'étude des réactivités intrinsèques de l'acide urique et de ses anions dans le vide par différentes méthodes quantiques.

4. Réactivité intrinsèque de l'acide urique et de ses anions

L'objectif de ce chapitre est d'étudier plusieurs mécanismes de formation du 5-hydroxyisourate qui est le produit de la réaction enzymatique de l'urate oxydase avec l'oxygène.⁷¹⁻⁷³ Cette réaction n'a été étudiée théoriquement que par une seule équipe. En effet, Kahn *et al.*¹⁰⁶ ont étudié le mécanisme réactionnel de l'acide urique dans le vide, mais leurs travaux demeurent largement incomplets car certains chemins possibles du mécanisme réactionnel n'ont pas été pris en compte.¹⁰⁶ De plus une seule forme anionique de l'acide urique a été étudiée. Ainsi, dans ce chapitre nous avons repris des réactions qui ont été déjà proposées dans la littérature,¹⁰⁶ ainsi que toutes les autres réactions qui nous paraissent envisageables.

4.1. Mise en œuvre

Pour déterminer la réactivité intrinsèque de l'acide urique, nous avons utilisé les méthodes semi-empiriques, *ab initio* et DFT décrites précédemment. Dans cette étude, nous ne nous sommes intéressés qu'au bilan énergétique global sans insister sur les états de transitions. L'optimisation des intermédiaires a été faite sur chaque structure pour ensuite faire le calcul des énergies de l'ensemble. Les fréquences ont également été calculées pour vérifier la nature des minima.

4.2. Résultats et discussion

4.2.1. Initiation de la réaction

L'urate oxydase est une protéine intervenant dans la transformation de l'acide urique en allantoiné. Notons que, en même temps, cette réaction réalise la réduction du dioxygène triplet en peroxyde d'hydrogène.

Avant de s'intéresser à la réactivité intrinsèque de l'acide urique, nous avons essayé de comprendre quel type de réaction redox est réalisée par l'urate oxydase : anionique, cationique ou radicalaire ? Ces trois hypothèses peuvent être résumées par ces trois différents mécanismes (voir Figure 4.1) :

- Une réaction anionique initiée par la formation d'un intermédiaire HO_2^\ominus (Hyp1)
- Une réaction cationique initiée par la formation d'un intermédiaire HO_2^\oplus (Hyp2)
- Une réaction radicalaire initiée par la formation d'un intermédiaire HO_2^\bullet (Hyp3)

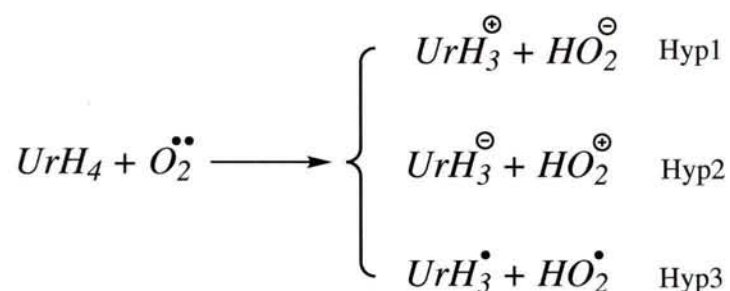


FIG. 4.1.: Trois hypothèses envisageables concernant l'initiation de la réaction d'oxydoréduction de l'acide urique par O_2 .

Pour réaliser ce travail, nous avons effectué des études théoriques par les différentes méthodes qui ont été décrites précédemment. L'effet de solvant a été pris en compte avec les méthodes semi-empiriques PM3 et DFT (B3LYP/6-31G**). Les trois hypothèses (Hyp1, Hyp2 et Hyp3, voir Figure 4.1) ont été supposées dans le cas de l'acide urique, du monoanion 3 (*i.e.*, le monoanion le plus stable à pH neutre) et du dianion 3-7 (*i.e.*, le dianion qui s'insère le plus probablement dans le site actif de l'urate oxydase). Les résultats obtenus sont indiqués dans le Tableau 4.1, où la première colonne présente les énergies obtenues pour l'acide urique, la deuxième colonne présente les résultats obtenus pour le monoanion 3 et la troisième colonne présente les résultats obtenus pour le dianion 3-7, et ceci en utilisant les trois hypothèses.

Méthode	Acide Urique			Monoanion 3			Dianion 3-7		
	Hyp1	Hyp2	Hyp3	Hyp1	Hyp2	Hyp3	Hyp1	Hyp2	Hyp3
PM3	198.5	225.9	24.0	87.9	312.3	25.9	-33.2	416.2	12.5
HF/6-31G**	254.9	262.9	28.7	111.2	372.1	32.8	-17.3	483.2	17.3
B3LYP/6-31G**	219.3	246.3	30.4	100.0	356.2	31.6	-26.5	468.1	19.0
MP2//B3LYP/6-31G**	218.4	257.1	51.7	97.9	352.3	48.0	-24.7	462.7	36.7
PM3 (Nancy)	73.4	94.0	23.8	53.9	105.7	22.5	20.6	120.9	13.2
B3LYP/6-31G**(Nancy)	101.3	132.6	29.9	66.8	152.6	26.3	25.2	176.2	15.2

TAB. 4.1.: Energies relatives des réactions de transfert d'hydrure (Hyp1), de proton (Hyp2) et d'hydrogène (Hyp3) pour l'acide urique, le monoanion 3 et le dianion 3-7 (en kcal/mol).

En ce qui concerne l'acide urique, les résultats obtenus par la première hypothèse (Hyp1), qui consiste à transférer un hydrure, montrent que les intermédiaires correspondants ont une énergie de déstabilisation de 219.3 et 218.4 kcal/mol en utilisant les méthodes DFT et MP2, respectivement. Par ailleurs, pour la deuxième hypothèse qui consiste à transférer un proton de l'acide urique vers O_2 , nous avons constaté que cette réaction a des énergies de 246.3 et 257.1 kcal/mol aux niveaux DFT et MP2, respectivement. D'autre part, nous avons constaté que la réaction de transfert d'hydrogène de l'acide urique neutre (Hyp3) a des énergies de 30.4 et 51.7 kcal/mol par les méthodes DFT et MP2, respectivement. En comparant les trois hypothèses, nous

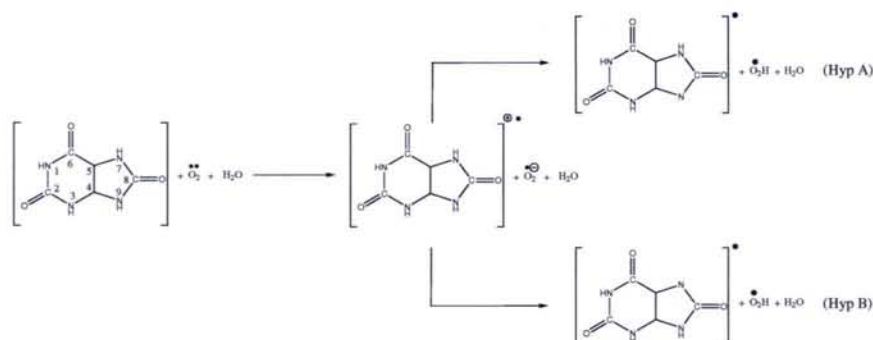


FIG. 4.2.: Deux transferts possibles de proton de l'acide urique vers O_2 .

constatons que le premier et le deuxième mécanisme sont difficilement réalisables. Par contre le troisième mécanisme demande moins d'énergie que les deux autres, donc il est le plus favorable et il s'agit bien d'une réaction radicalaire. Les calculs réalisés par toutes les méthodes donnant les mêmes résultats qui confirment que la réaction de transfert d'hydrogène est plus favorable que les autres réactions. Une étude par les méthodes DFT et PM3 en tenant compte de l'effet de solvant a été également entreprise, et a montré que la troisième hypothèse est aussi la plus favorable (29.9 et 23.8 kcal/mol, respectivement). Dans le cas du monoanion 3, la première hypothèse qui consiste à transférer un hydrure du substrat vers O_2 nécessite une énergie de 100.0 kcal/mol par la méthode DFT. La deuxième hypothèse nécessite une énergie de 356.2 kcal/mol. Par contre, en ce qui concerne le transfert d'hydrogène (Hyp3), nous avons trouvé que cette réaction nécessite une énergie de 48.0 kcal/mol. Ainsi, la conclusion déjà obtenue avec l'acide urique reste valable en présence du monoanion 3. En faisant le même calcul dans le solvant, nous avons confirmé nos résultats qui montrent que la troisième hypothèse, qui consiste à transférer un hydrogène est la plus favorable. En ce qui concerne le dianion 3-7, la réaction de transfert d'hydrure (Hyp1) donne des énergies de 26.5 et 24.7 kcal/mol selon les méthodes DFT et MP2, respectivement. D'un autre côté, la réaction de transfert de proton du substrat vers O_2 nécessite une énergie très élevée (468.1 kcal/mol selon la méthode DFT). Dans le cas du transfert d'hydrogène, ce dernier nécessite une énergie de 19.0 kcal/mol selon la méthode DFT. En comparant les résultats du dianion 3-7, nous avons constaté que la première hypothèse est la plus favorable parmi toutes. Cependant, en faisant le calcul dans le solvant, nous avons trouvé que le transfert d'hydrure n'est pas le plus favorable, parce que cette réaction nécessite une énergie de 25.2 kcal/mol (DFT) alors que le transfert d'hydrogène nécessite une énergie de 15.2 kcal/mol. Ainsi, le mécanisme de la réaction avec le dianion 3-7 semble aussi radicalaire (Hyp3).

4.2.2. Transfert de proton de l'acide urique vers le dioxygène

Dans le cas où nous prenons le mécanisme en totalité, nous pouvons décomposer l'hypothèse 3 précédente, consistant en un transfert d'hydrogène, en deux étapes successives mais qui pourraient parfaitement être simultanées : un transfert d'électron de l'acide urique vers O_2 puis un

transfert de proton de l'acide urique vers O_2^- . Lors de cette deuxième étape, le proton peut provenir soit de l'azote 7 soit de l'azote 9 (voir Figure 4.2).

Première possibilité : transfert de N9 sur O_2 (Hyp A)

Si nous nous intéressons à la première possibilité, qui consiste à transférer un proton de l'azote 9 sur O_2 , nous constatons la présence de trois réactivités possibles (voir Figure 4.3).

La première réactivité consiste à transférer un électron de l'acide urique vers O_2 (intermédiaire II), suivi de celui du proton de l'azote 9 vers O_2 (intermédiaire III). Ceci donne OOH radical qui sera déplacé directement sur le carbone 5 (V), après il y aura passage de l'état triplet à l'état singulet pour donner le 5-hydroperoxyisourate et une molécule d'eau (IX). Ensuite, il y aura élimination du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à partir du produit obtenu pour donner un dehydrourate (XII). Enfin, ce dernier s'hydrate pour former le produit 5-hydroxyisourate et une molécule d' H_2O_2 directement dans son état singulet (XV). Ce chemin réactionnel possible est celui présenté par Kahn (1999).¹⁰⁶

Dans la deuxième réactivité, la première étape du chemin est la même que pour la première réactivité (I→II→III). Ensuite, nous pouvons supposer un transfert du deuxième proton de l'azote 7 (X) et passage de l'état triplet à l'état singulet pour former le dehydrourate (XII). Ce dernier s'hydrate pour former le produit 5-hydroxyisourate et une molécule d' H_2O_2 (XV).

Enfin, la troisième réactivité que nous envisageons consiste en un déplacement de l'hydrogène de l' H_2O vers OOH pour donner H_2O_2 et OH^\bullet (VI). Le OH se fixe sur le carbone 5 permettant d'obtenir le 5-hydroxyisourate dans son état triplet (XII). La fin du chemin réactionnel consiste en un passage à l'état singulet.

Deuxième possibilité : transfert de N7 vers O_2 (Hyp B)

Une deuxième possibilité de mécanisme global consiste à transférer un proton de l'azote 7 sur O_2 , les mêmes réactivités peuvent être alors observées, mais le produit trouvé est dans ce cas le 4-hydroxyisourate au lieu du 5-hydroxyisourate (voir Figure 4.4) car la fixation d'un groupement OH ou OOH ne pourra s'effectuer que sur le carbone 4.

A partir de toutes ces hypothèses de réactivités présentées ci-dessus, il est possible par exemple d'envisager pour l'acide urique six chemins réactionnels représentés dans les Figures 4.3 et 4.4 pages 53 et 54. Nous avons étudié toutes les variations d'énergies totales le long de ces différents chemins pour l'acide urique, ses 4 monoanions et ses 5 dianions (le dianion 7-9 ne peut réagir selon aucun des chemins envisagés).

Nous ne présentons en détails ci-dessous que les réactivités intrinsèques du monoanion 3 et du dianion 3-7 car ce sont les plus intéressants dans les cas ultérieurs de la réactivité avec l'UOX. Les résultats concernant les autres réactivités sont regroupés dans l'Annexe A.

4.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

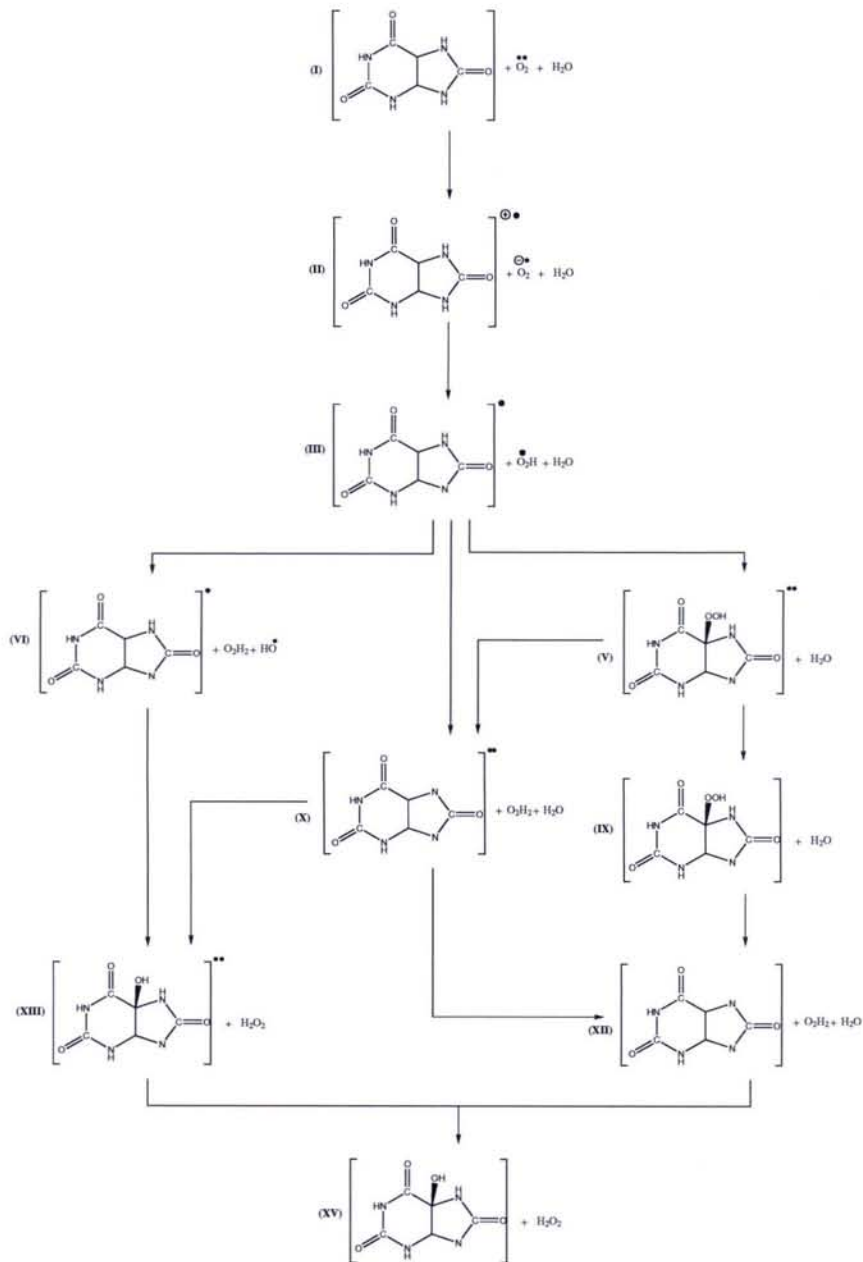


FIG. 4.3.: Hypothèse A : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 . (Par commodité, les représentations des composés dérivés de l'acide urique ne contiennent pas ici des ordres de liaisons correctes selon Lewis.)

CHAPITRE 4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

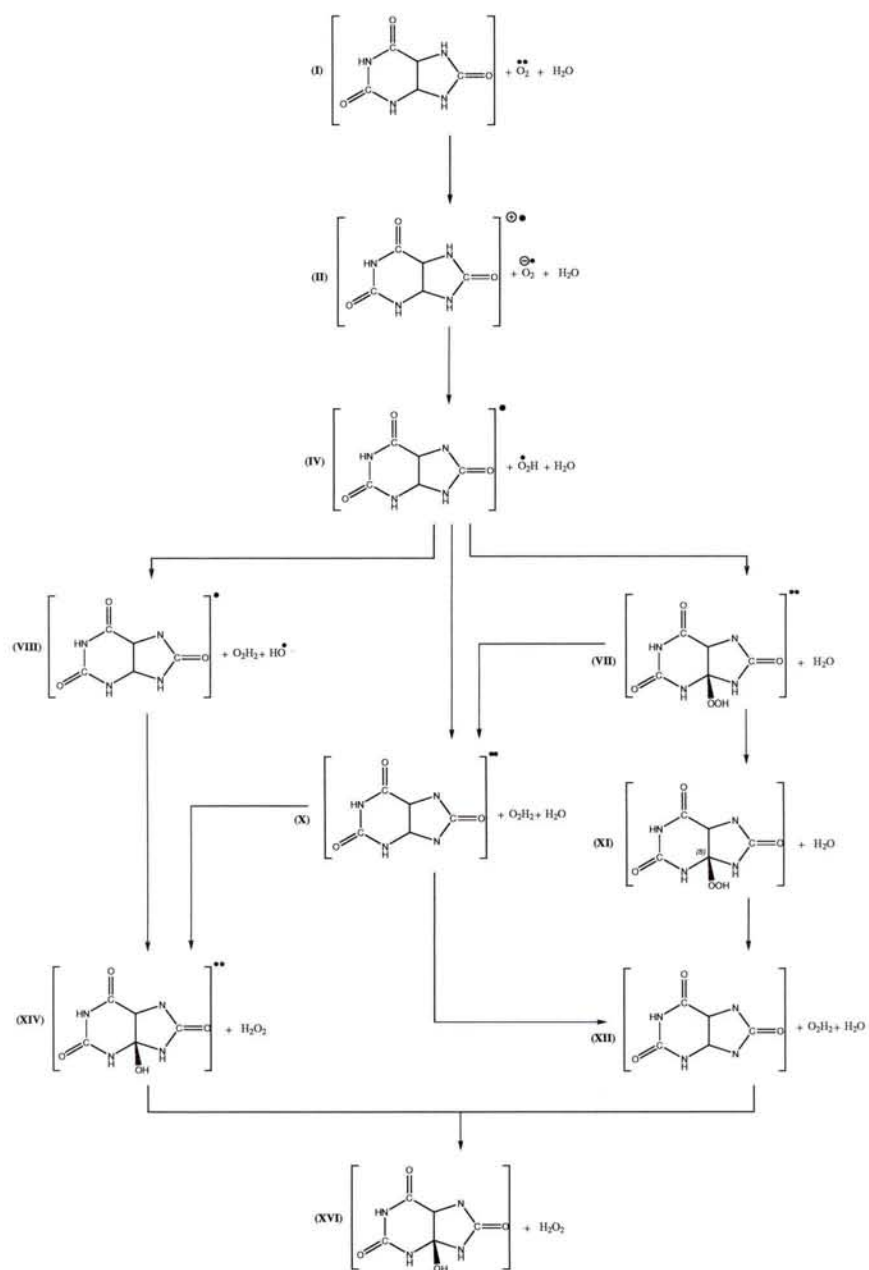


FIG. 4.4.: Hypothèse B : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O₂.

4.2.3. La réactivité intrinsèque du monoanion 3 dans le vide

Energies relatives

En ce qui concerne la réactivité intrinsèque du monoanion 3 dans le vide, les énergies relatives qui ont été calculées par différentes méthodes sont indiquées dans les Tableaux 4.2 et 4.3.

AUN ₃ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	65.8	65.8	65.8	75.9	75.9	75.9	73.2	73.2	73.2	87.3	87.3	87.3
III	25.9	25.9	25.9	32.8	32.8	32.8	31.6	31.6	31.6	48.0	48.0	48.0
V	—	—	30.5	—	—	81.5	—	—	58.5	—	—	72.6
VI	44.1	—	—	54.7	—	—	64.2	—	—	75.7	—	—
IX	—	—	-4.0	—	—	10.0	—	—	-7.0	—	—	-12.6
X	—	17.8	—	—	74.2	—	—	59.9	—	—	83.4	—
XII	—	5.0	5.0	—	31.3	31.3	—	16.3	16.3	—	15.0	15.0
XIII	24.5	—	—	73.1	—	—	65.7	—	—	81.6	—	—
XV	-10.9	-10.9	-10.9	13.1	13.1	13.1	-0.9	-0.9	-0.9	-3.4	-3.4	-3.4

TAB. 4.2.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 3 selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₃ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	65.8	65.8	65.8	75.9	75.9	75.9	73.2	73.2	73.2	87.3	87.3	87.3
IV	20.5	20.5	20.5	25.6	25.6	25.6	24.3	24.3	24.3	39.8	39.8	39.8
VII	—	—	40.7	—	—	55.1	—	—	48.4	—	—	58.1
VIII	38.7	—	—	47.5	—	—	57.0	—	—	67.4	—	—
X	—	17.8	—	—	74.2	—	—	59.9	—	—	83.4	—
XI	—	—	2.6	—	—	19.3	—	—	9.5	—	—	2.5
XII	—	5.0	5.0	—	31.3	31.3	—	16.3	16.3	—	15.0	15.0
XIV	35.9	—	—	58.2	—	—	54.1	—	—	66.0	—	—
XVI	-1.7	-1.7	-1.7	32.1	32.1	32.1	6.0	6.0	6.0	12.7	12.7	12.7

TAB. 4.3.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 3 selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

Selon le premier tableau qui consiste à transférer un proton de l'azote 9 vers O₂ (Hyp A), la première étape de la réaction commence par un transfert initial d'un électron du monoanion 3 vers O₂ (voir Figure 4.5). Cette étape donne l'intermédiaire (II) avec une énergie de 73.2 kcal/mol au-dessus du réactif (I) par la méthode B3LYP/6-31G**, et de 87.3 kcal/mol au niveau MP2 avec la même base. Ensuite, un transfert de proton peut se faire à partir de l'azote 9 formant ainsi un OOH radical. L'intermédiaire radical (III) est situé avec une énergie de 31.6 kcal/mol au-dessus du réactif (I) au niveau B3LYP/6-31G** et de 48.0 kcal/mol au niveau MP2. A partir de cet

CHAPITRE 4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

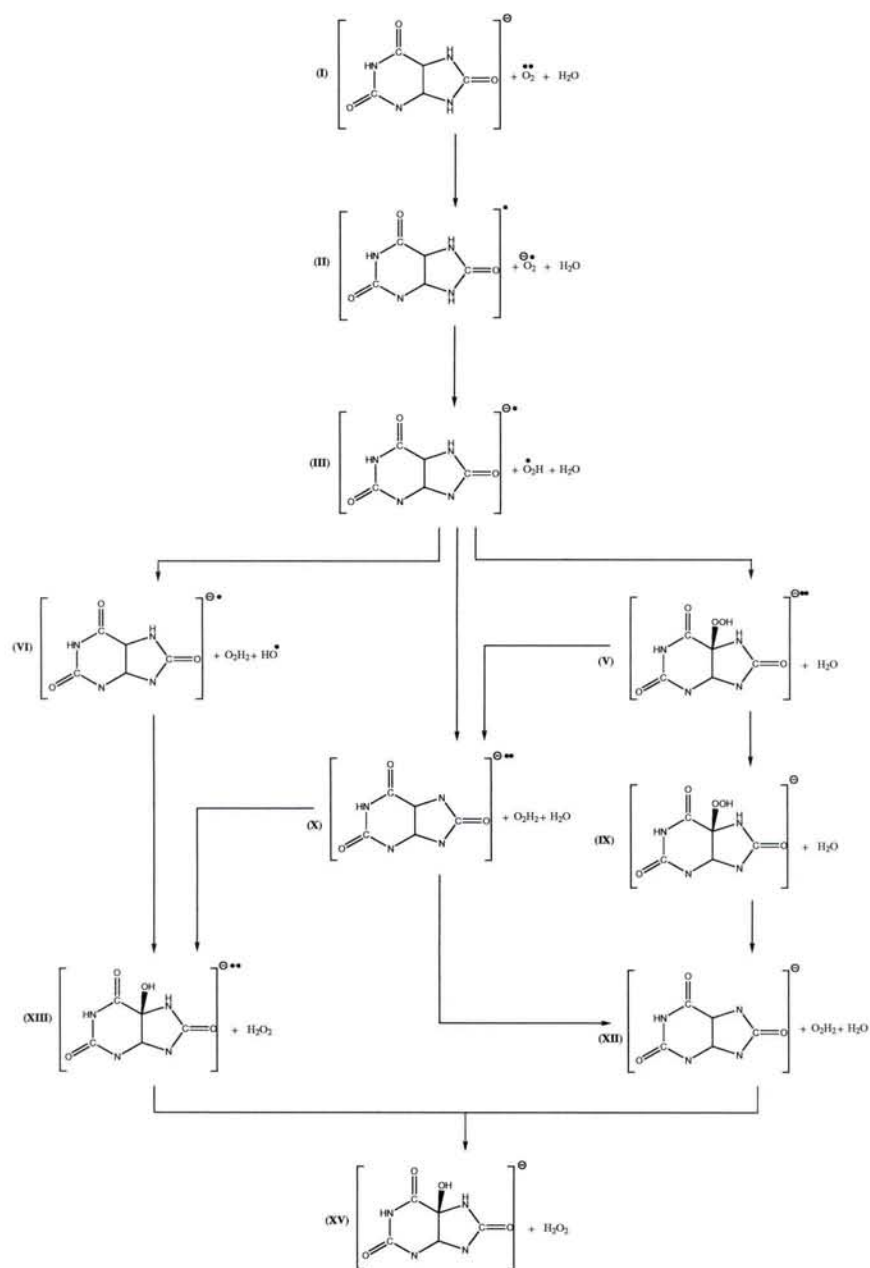


FIG. 4.5.: Réactivité du monoanion 3 de l'acide urique selon l'hypothèse A (transfert du proton H9 vers O_2).

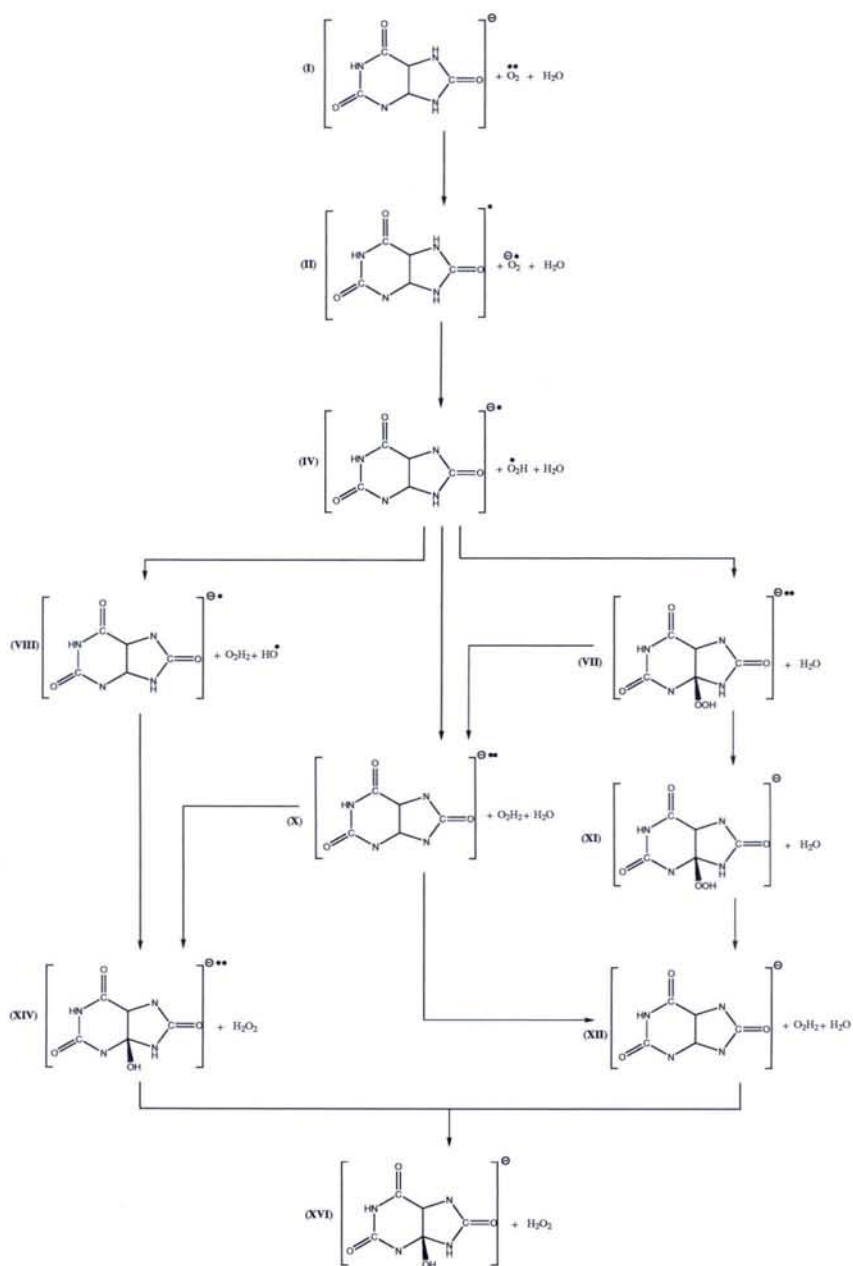


FIG. 4.6.: Réactivité du monoanion 3 de l'acide urique selon l'hypothèse B (transfert du proton H7 vers O_2).

intermédiaire et pour arriver jusqu'au produit final, il y a trois chemins possibles repérés par les trois colonnes par méthode du Tableau 4.2 :

- soit par un déplacement direct de la molécule OOH sur le carbone 5 (V) avec une augmentation d'énergie jusqu'à 58.5 kcal/mol au niveau DFT et 72.6 kcal/mol au niveau MP2 ; ensuite, il y aura passage de l'état triplet à l'état singulet pour donner le 5-hydroperoxyisourate (IX) et cet intermédiaire a une énergie de -7.0 kcal/mol au niveau DFT et de -12.6 kcal/mol au niveau MP2. Ultérieurement, à partir de ce produit, il y aura élimination d'une molécule d'H₂O₂ pour donner l'intermédiaire hydrourate (XII) avec une perte d'énergie de 23.3 kcal/mol au niveau DFT et de 27.6 kcal/mol au niveau MP2 par rapport à l'intermédiaire (IX). Enfin, l'hydrolyse de ce dernier permet la formation du 5-hydroxyisourate (XV) avec une énergie de -0.9 kcal/mol et de -3.4 kcal/mol selon les méthodes DFT et MP2, respectivement par rapport au réactif (I).

C'est cette réactivité qui a été étudiée théoriquement par Kahn *et al.*¹⁰⁶ et qui a montré que le 5-hydroperoxyisourate a une énergie plus faible que le 5-hydroxyisourate.

- soit en transférant un deuxième proton de l'azote 7 vers OOH radical (X) avec une augmentation d'énergie jusqu'à 59.9 et 83.4 kcal/mol au niveau DFT et MP2, respectivement. Ensuite le chemin va vers l'intermédiaire (XII) et continue dans la même direction que la première réactivité pour arriver au produit final.
- soit en transférant un hydrogène de la molécule d'eau vers OOH pour obtenir H₂O₂ et OH radical (VI). Cette étape de la réaction se passe avec une énergie de 64.2 kcal/mol au niveau DFT et 75.7 au niveau MP2. Puis le OH se fixe sur le carbone 5 pour former le 5-hydroxyisourate dans l'état triplet (XIII) avec des énergies de 65.7 et 81.6 kcal/mol aux niveaux DFT et MP2, respectivement. Enfin, il y a passage vers l'état singulet pour former le produit final (XV).

A travers le Tableau 4.2, nous pouvons constater que la réaction d'oxydation du monoanion 3 dans le premier chemin qui consiste à former le produit 5-hydroxyisourate est thermodynamiquement favorable (-0.9 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G** et -3.4 kcal/mol au niveau MP2). Nous avons aussi étudié ce chemin par les méthodes PM3 et HF/6-31G**. Nous avons obtenu les mêmes résultats qui confirment que la formation du produit 5-hydroxyisourate est favorable par rapport au monoanion 3.

La comparaison entre les trois chemins réactifs envisagés nous montre que le premier chemin (troisième colonne du Tableau 4.2) passe par un intermédiaire plus stable que le réactif et le produit : le 5-hydroperoxyisourate. Les énergies élevées des intermédiaires dans les deux autres chemins réactionnels s'interprètent par le fait que, dans la plupart des cas, ce sont des énergies d'états triplets plus hauts en énergie que les états singulets correspondants (intermédiaires (V) et (IX), intermédiaires (X) et (XII) et intermédiaires (XIII) et (XV)).

Concernant la deuxième hypothèse du mécanisme qui consiste à transférer un proton de l'azote 7 vers O₂ (voir Figure 4.6)(Hyp B), les mêmes types de réactivités peuvent être observés. Le produit obtenu est alors le 4-hydroxyisourate au lieu du 5-hydroxyisourate car nous avons montré dans le mécanisme général que la fixation du groupement OH ne pourra s'effectuer que sur le carbone 4. Le Tableau 4.3 regroupe les différences d'énergies selon les différents chemins envisagés de l'hypothèse B calculées avec les mêmes méthodes quantiques que pour l'hypothèse

A. Par ces résultats, nous pouvons constater que la première étape qui consiste à transférer un électron du substrat vers O₂ (II) est la même dans les deux cas (Hyp A et Hyp B). Ensuite il y a transfert de proton de l'azote 7 vers O₂ (III) par une énergie de 24.3 et 39.8 kcal/mol selon les méthodes DFT et MP2, respectivement. En comparant les énergies de transfert de proton soit de l'azote 7 soit de l'azote 9, nous avons constaté que le transfert de proton depuis l'azote 7 est plus favorable qu'à partir de l'azote 9.

Après le transfert de proton, il y a trois chemins réactionnels possibles comme dans le cas de l'hypothèse A. Le long de ces chemins, la fixation des groupements OOH et OH s'effectue sur le carbone 4. En comparant les deux hypothèses A et B, nous avons remarqué que la fixation des groupements OOH et OH (VII et XIV) sur le carbone 4 avec l'état triplet donne des intermédiaires plus stables que dans le cas de la fixation sur le carbone 5 (V et XIII). Cependant, le passage de l'état triplet vers l'état singulet et la fixation sur le carbone 4 donnent des intermédiaires (XI et XVI) moins stables que dans le cas de la fixation sur le carbone 5 (IX et XV). Finalement, en comparant les énergies de produits finaux que sont le 4-hydroxyisourate et le 5-hydroxyisourate, nous avons constaté que ce dernier est le produit le plus stable avec une énergie de 6.9 et 16.1 kcal/mol au niveau DFT et MP2, respectivement.

Analyse thermodynamique

AUN ₃ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	73.2	73.2	73.2	72.8	72.8	72.8	72.8	72.8	72.8	72.9	72.9	72.9
III	31.6	31.6	31.6	29.9	29.9	29.9	29.9	29.9	29.9	28.3	28.3	28.3
V	—	—	58.5	—	—	57.8	—	—	57.2	—	—	67.5
VI	64.2	—	—	62.1	—	—	62.1	—	—	60.9	—	—
IX	—	—	-7.0	—	—	-5.4	—	—	-5.9	—	—	6.0
X	—	59.9	—	—	56.6	—	—	56.6	—	—	54.9	—
XII	—	16.3	16.3	—	15.3	15.3	—	15.3	15.3	—	13.9	13.9
XIII	65.7	—	—	65.9	—	—	65.3	—	—	74.0	—	—
XV	-0.9	-0.9	-0.9	1.6	1.6	1.6	1.0	1.0	1.0	11.4	11.4	11.4

TAB. 4.4.: Énergies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

Nous nous sommes aussi intéressé, dans les cas des hypothèses A et B, aux données thermodynamiques relatives aux chemins envisagés. Nous avons ainsi calculé les corrections de l'énergie de point zéro (ZPE), les enthalpies relatives et les énergies libres relatives le long de chaque chemin réactionnel. Ces résultats donnés dans les Tableaux 4.4 et 4.5 montrent que la correction de ZPE a une influence négligeable sur les valeurs des énergies relatives. Par ailleurs, les valeurs des enthalpies relatives sont en accord avec les valeurs des énergies relatives. De plus, les valeurs des énergies libres relatives sont en concordance avec les énergies relatives. Ainsi, les résultats obtenus montrent que les énergies libres relatives permettent de confirmer les conclusions faites à partir des énergies relatives : le 5-hydroxyisourate est plus stable que le 4-hydroxyisourate.

CHAPITRE 4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₃ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	73.2	73.2	73.2	72.8	72.8	72.8	72.8	72.8	72.8	72.9	72.9	72.9
IV	24.3	24.3	24.3	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	23.0	21.6	21.6	21.6
VII	—	—	48.4	—	—	48.0	—	—	48.1	—	—	56.2
VIII	57.0	—	—	55.2	—	—	55.2	—	—	54.2	—	—
X	—	59.9	—	—	56.6	—	—	56.6	—	—	54.9	—
XI	—	—	9.5	—	—	-0.4	—	—	-1.0	—	—	10.9
XII	—	16.3	16.3	—	15.3	15.3	—	15.3	15.3	—	13.9	13.9
XIV	54.1	—	—	54.0	—	—	54.3	—	—	64.3	—	—
XVI	6.0	6.0	6.0	8.1	8.1	8.1	7.5	7.5	7.5	17.5	17.5	17.5

TAB. 4.5.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

Du fait de leur grande similarité, nous ne présenterons plus dans la suite de ce manuscrit de données thermodynamiques sur les chemins réactionnels intrinsèques.

Influence de fonctions diffuses

AUN ₃ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	60.9	60.9	60.9	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4
III	31.0	31.0	31.0	29.3	29.3	29.3	29.4	29.4	29.4	27.6	27.6	27.6
V	—	—	56.0	—	—	55.8	—	—	55.5	—	—	65.1
VI	63.7	—	—	61.6	—	—	61.6	—	—	60.3	—	—
IX	—	—	-4.9	—	—	-3.2	—	—	-3.8	—	—	8.0
X	—	48.4	—	—	46.2	—	—	46.2	—	—	44.1	—
XII	—	15.7	15.7	—	14.7	14.7	—	14.7	14.7	—	13.3	13.3
XIII	66.9	—	—	67.1	—	—	66.5	—	—	75.1	—	—
XV	1.3	1.3	1.3	3.8	3.8	3.8	3.2	3.2	3.2	13.4	13.4	13.4

TAB. 4.6.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

Pour analyser l'influence possible de l'ajout de fonctions diffuses dans le jeu de base d'orbitales atomiques, une étude au niveau B3LYP/6-31+G** a été réalisée. Les Tableaux 4.6 et 4.7 présentent les résultats des calculs réalisés avec cette base. La différence des énergies relatives entre les deux niveaux 6-31G** et 6-31+G** diminue de façon négligeable pour la première étape qui consiste à transférer un électron de monoanion 3 vers O₂. Par contre pour le reste du chemin, la fonction diffuse n'a quasiment aucun effet sur les énergies relatives. Ces résultats ont été confirmés aussi par les calculs de correction des énergies relatives et ceux des énergies libres présentés dans ces mêmes tableaux.

4.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

AUN ₃ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	60.9	60.9	60.9	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4	60.4
IV	24.4	24.4	24.4	23.2	23.2	23.2	23.2	23.2	23.2	21.6	21.6	21.6
VII	—	—	50.5	—	—	50.3	—	—	49.7	—	—	60.5
VIII	57.1	—	—	55.4	—	—	55.4	—	—	54.3	—	—
X	—	48.4	—	—	46.2	—	—	46.2	—	—	44.1	—
XI	—	—	9.3	—	—	9.2	—	—	9.2	—	—	9.0
XII	—	15.7	15.7	—	14.7	14.7	—	14.7	14.7	—	13.3	13.3
XIV	56.0	—	—	56.7	—	—	56.1	—	—	65.4	—	—
XVI	7.3	7.3	7.3	9.5	9.5	9.5	9.3	9.3	9.3	19.0	19.0	19.0

TAB. 4.7.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

Du fait de la faible influence des fonctions diffuses sur la réactivité intrinsèque présentée dans ce chapitre, nous n'interpréterons plus, dans la suite de ce manuscrit, nos résultats relatifs à des bases contenant des fonctions diffuses. Cependant, le lecteur pourra trouver dans l'Annexe A un ensemble de tableaux relatifs à ces bases contenant des fonctions diffuses.

4.2.4. La réactivité intrinsèque du dianion 3-7 dans le vide

Par ailleurs, nous avons étudié la réactivité intrinsèque du dianion 3-7. Les résultats obtenus par différentes méthodes quantiques sont résumés dans les Tableaux 4.8 et 4.9. Les réactivités possibles pour donner différents produits au niveau des C4 et C5 sont représentées dans les Figures 4.7 et 4.8, respectivement.

AUN ₃ N ₇ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-45.0	-45.0	-45.0	-43.5	-43.5	-43.5	-47.7	-47.7	-47.7	-36.9	-36.9	-36.9
III	12.5	12.5	12.5	17.3	17.3	17.3	19.0	19.0	19.0	36.7	36.7	36.7
IV	—	—	24.6	—	—	58.4	—	—	51.4	—	—	72.8
V	30.7	—	—	39.2	—	—	51.6	—	—	64.4	—	—
VII	—	—	-16.8	—	—	-1.1	—	—	-17.7	—	—	-21.4
VIII	—	-20.3	—	—	25.7	—	—	17.2	—	—	43.7	—
X	—	-33.2	-33.2	—	-17.2	-17.2	—	-26.5	-26.5	—	-24.7	-24.7
XI	—	-14.0	-14.0	—	11.3	11.3	—	0.2	0.2	—	1.5	1.5
XII	17.1	—	—	66.1	—	—	70.7	—	—	87.3	—	—
XIV	-17.4	-17.4	-17.4	10.7	10.7	10.7	-1.1	-1.1	-1.1	-2.4	-2.4	-2.4

TAB. 4.8.: Energies relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 3-7 et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

CHAPITRE 4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

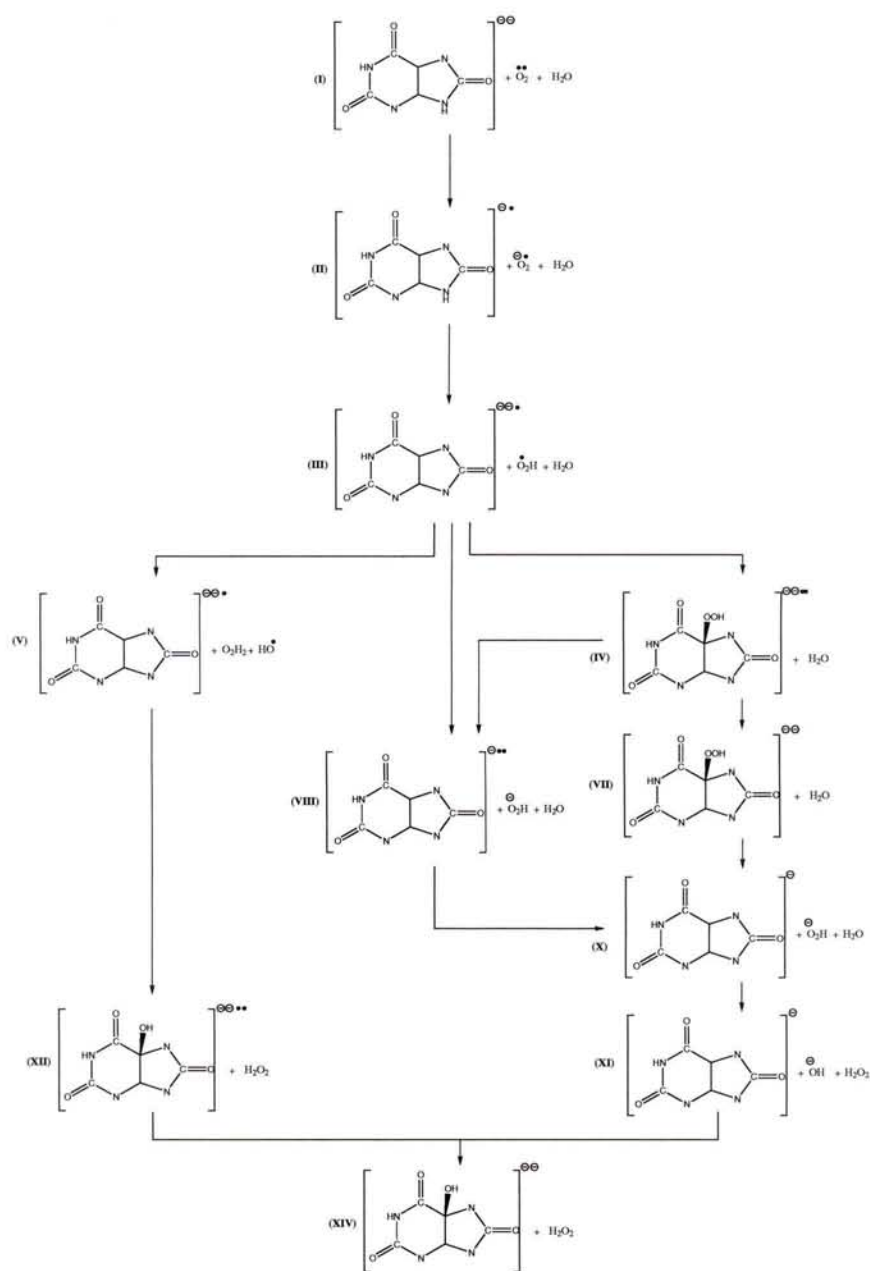


FIG. 4.7.: Réactivité du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A (transfert du proton H9 vers O₂ et obtention du 5-hydroxyisourate).

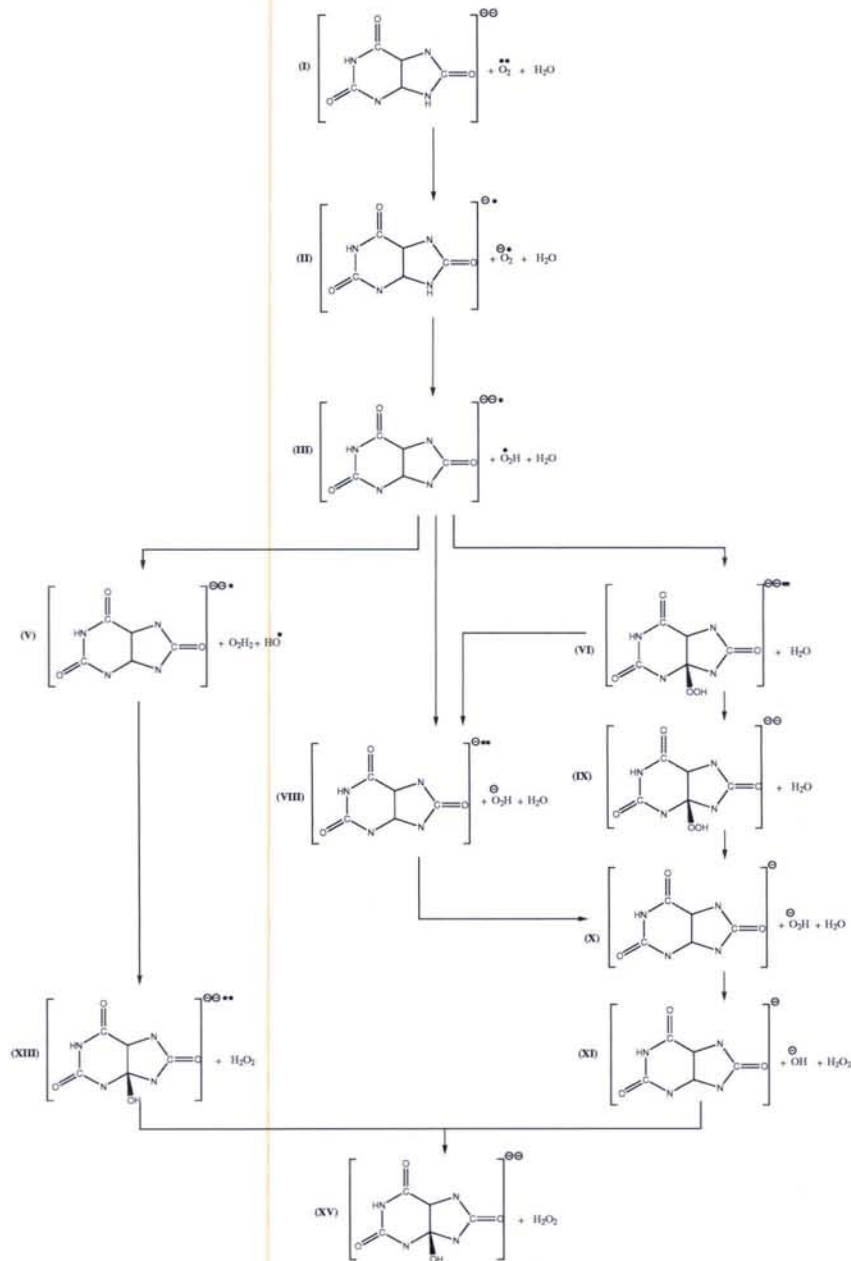


FIG. 4.8.: Réactivité du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' (transfert du proton H9 vers O_2 et obtention du 4-hydroxyisourate).

CHAPITRE 4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₃ N ₇ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-45.0	-45.0	-45.0	-43.5	-43.5	-43.5	-47.7	-47.7	-47.7	-36.9	-36.9	-36.9
III	12.5	12.5	12.5	17.3	17.3	17.3	19.0	19.0	19.0	36.7	36.7	36.7
V	30.7	—	—	39.2	—	—	51.6	—	—	64.4	—	—
VI	—	—	19.2	—	—	43.1	—	—	35.7	—	—	48.8
VIII	—	-20.3	—	—	25.7	—	—	17.2	—	—	43.7	—
IX	—	—	-7.4	—	—	14.2	—	—	-5.2	—	—	-11.4
X	—	-33.2	-33.2	—	-17.2	-17.2	—	-26.5	-26.5	—	-24.7	-24.7
XI	—	-14.0	-14.0	—	11.3	11.3	—	0.2	0.2	—	1.5	1.5
XIII	19.2	—	—	60.9	—	—	44.9	—	—	56.9	—	—
XV	-8.9	-8.9	-8.9	27.6	27.6	27.6	12.5	12.5	12.5	8.4	8.4	8.4

TAB. 4.9.: Energies relatives selon l'hypothèse A' pour le dianion 3-7 et en fonction différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

Parce que nous nous intéressons maintenant à un dianion et non à un monoanion comme précédemment, il n'y a qu'une seule possibilité de transfert d'hydrogène entre le dianion urate et le dioxygène : un transfert à partir de l'azote 9 pour aboutir à l'intermédiaire (III). Par contre, contrairement au monoanion 3, il existe deux hypothèses pour la fixation du groupement OH : en position C5 (hypothèse A de la Figure 4.7) ou en position C4 (hypothèse A' de la Figure 4.8). Ensuite, pour chaque hypothèse, il existe trois chemins différents comme dans le cas du monoanion : passage par un intermédiaire peroxy-, passage par un intermédiaire déhydro-, ou formation d'un radical hydroxyle.

Concernant la première étape de la réaction, identique dans les six chemins possibles, qui consiste à transférer un électron du dianion 3-7 vers l'oxygène (II), cette partie de la réaction est identique pour les deux réactivités et se passe avec un gain d'énergie de -47.7 et -36.9 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G** et MP2/6-13G**, respectivement. Ensuite, un transfert de proton de l'azote 9 (III) peut se faire pour atteindre une énergie de 19.0 kcal/mol au niveau DFT et 36.7 kcal/mol au niveau MP2.

En ce qui concerne l'hypothèse A, le déplacement direct de la molécule OOH sur le carbone 5 (IV) se fait avec une énergie de 51.4 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G** et avec une énergie de 72.8 kcal/mol par la méthode MP2 pour former le 5-hydroperoxyisourate. Le passage de l'état triplet à l'état singulet donne l'intermédiaire (VII) qui a une énergie de -17.7 et -21.4 kcal/mol aux niveaux DFT et MP2, respectivement. Ultérieurement, la molécule OOH prend la charge négative qui est sur l'azote 7 (X), et dans ce cas l'énergie devient plus basse que pour le dernier produit avec une énergie de -26.5 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G** et de -24.7 kcal/mol au niveau MP2. Un transfert de proton de H₂O a lieu pour obtenir H₂O₂ et OH (XI) avec une énergie respectivement de 0.2 et 1.5 kcal/mol selon les méthodes DFT ou MP2. Ainsi l'OH se fixe sur le carbone 5 permettant d'obtenir le 5-hydroxyisourate (XIV) qui a une énergie plus élevée que le 5-hydroperoxyisourate.

Pour le deuxième chemin réactionnel de l'hypothèse A, il s'agit d'un transfert de la charge négative qui était sur l'azote 7 vers OOH (VIII) avec une énergie de 17.2 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G**. Ensuite, le passage de l'état triplet vers l'état singulet donne l'intermédiaire

(X). Ce chemin réactionnel rejoint donc le premier chemin décrit ci-dessus, et la fin la réaction de formation du 5-hydroxyisourate est identique au chemin précédent.

Dans le troisième chemin réactionnel, il s'agit d'un transfert d'hydrogène de la molécule d'eau vers le OOH pour obtenir du H_2O_2 et OH radical (V). Cette étape de la réaction se passe avec une énergie de 51.6 kcal/mol au niveau DFT et 64.4 kcal/mol au niveau MP2. Puis le OH se fixe sur le carbone 5 pour former le 5-hydroxyisourate dans son état triplet (XII) avec des énergies de 70.7 et 87.3 kcal/mol aux niveaux DFT et MP2, respectivement. A la fin du chemin il y a passage de l'état triplet vers un état singulet pour donner la espèce la plus stable pendant cette réactivité (XIV).

Par une autre voie, nous avons examiné l'hypothèse A' qui permet d'obtenir le produit 4-hydroxyisourate. Ce produit est moins stable que le 5-hydroxyisourate d'une énergie de 13.6 et 10.8 kcal/mol aux niveaux B3LYP/6-31G** et MP2/6-31G**, respectivement.

En comparant les chemins réactionnels de l'hypothèse A, on constate que les deux premiers chemins évoqués font intervenir l'intermédiaire (X) qui est bien plus stable que le produit final (XIV). On peut alors se demander quel serait le rôle de l'urate oxydase, catalyseur de la réaction, vis-à-vis de cet intermédiaire (X) qui, selon Tipton,⁷³ est l'un des intermédiaires apparaissant lors de la réaction d'oxydation de l'acide urique. En effet, si cet intermédiaire existe et est aussi stable dans l'enzyme que dans la réactivité intrinsèque, il semble inenvisageable que la réaction ne s'arrête pas à la formation du 5-hydroperoxyisourate plutôt qu'elle ne se poursuive jusqu'à l'obtention d'un produit moins stable : le 5-hydroxyisourate.

4.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'initiation de la réaction d'oxydation de l'acide urique et de ses anions par O_2 . De plus, nous avons examiné la réactivité intrinsèque de l'acide urique et de ses anions. Au vu de la quantité importante de résultats, nous n'avons présenté dans ce chapitre que les réactivités intrinsèques du monoanion 3 et du dianion 3-7, le reste des résultats étant regroupé à l'Annexe A.

De manière générale, nos études montrent que :

- le mécanisme de la réaction redox de l'acide urique semble être initié par un transfert d'hydrogène (Hyp 3) de l'acide urique vers O_2 . Ceci a été observé notamment lors de la prise en compte de l'effet de solvant dans les cas de l'acide urique neutre, du monoanion 3 et du dianion 3-7. Dans ce dernier cas, il est aussi possible d'envisager la séparation de l'initiation en deux étapes : un transfert d'électron suivi d'un transfert de proton.
- les résultats obtenus par l'étude de la réactivité intrinsèque montrent que le produit 5-hydroxyisourate est plus stable que le 4-hydroxyisourate dans les cas monoanionique et dianionique.
- la première étape qui consiste à transférer un électron donne un intermédiaire plus stable que le réactif dans le cas du dianion 3-7. Par contre, dans le cas du monoanion 3, cette étape donne un intermédiaire moins stable que le réactif.
- l'utilisation de fonctions diffuses a un effet négligeable sur les résultats globaux de la réactivité intrinsèque.

CHAPITRE 4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

– *idem* lorsque l'on prend en compte les corrections thermodynamiques.

Pour pouvoir différencier les trois chemins réactionnels envisagés menant à la formation du 5-hydroxyisourate, et aussi pour évaluer l'influence de l'urate oxydase sur la très grande stabilité du 5-hydroperoxyisourate apparaissant dans la réactivité intrinsèque, il est nécessaire maintenant d'étudier les stabilités relatives des réactifs, intermédiaires et produits envisagés à l'intérieur du site actif de l'enzyme. C'est ce que nous présentons dans le chapitre suivant.

5. Modélisation du site actif de UOx

Après l'étude de la réactivité intrinsèque et des propriétés chimiques de l'acide urique et de ses anions dans le vide et dans le solvant, nous allons les étudier dans un modèle du site actif de l'urate oxydase.

5.1. Choix du site actif

Les huit résidus Lys10, Thr57, Asp58, Lys61, Phe159, Arg176, Gln228 et Asn254 existent dans le site actif dans l'ensemble de la famille des urates oxydases. Ceci montre que leur rôle dans le mécanisme d'action de l'urate oxydase est primordial. De récentes expériences de mutagenèse dirigée sur Thr57, Lys10 ou encore sur Asp58 et Arg176^{71,83} ont montré que l'activité de l'urate oxydase était considérablement réduite en l'absence de ces acides aminés confirmant ainsi leur rôle essentiel dans le mécanisme d'action.

Pour comprendre l'influence du site actif sur la réactivité de l'acide urique, un modèle a été construit à partir des données cristallographiques connues.⁸¹ Ce modèle contient des portions (généralement les chaînes latérales) des acides aminés suivants : Ala56(D), Thr57(D), Phe159(A), Arg176(A), Gln228(A) et Asn254(A) où les symboles A et D indiquent que ces résidus viennent des chaînes A et D respectivement. Ces acides aminés sont ceux qui, d'après la structure cristallographique, ont une interaction directe par liaison hydrogène avec le substrat ou avec l'une des deux molécules (cas de Asn254). Nous avons remplacé la 8-azaxanthine, qui était dans la structure cristallographique, par l'acide urique qui a une fonction carbonyle au lieu d'un azote en position 8. La Figure 5.1 représente le site actif et tous les résidus nécessaires pour stabiliser le substrat et réaliser la réactivité. La Figure 5.2, permet de visualiser la stabilité du substrat à travers ses liaisons hydrogène avec le site actif.

Le chapitre est divisé en 3 parties. La première partie est consacrée à l'étude de la stabilité relative des formes anioniques de l'acide urique dans le site actif ; la deuxième partie concerne l'évaluation des potentiels d'ionisation de ces formes anioniques à l'intérieur de notre modèle de site actif ; enfin, la troisième partie se penche sur la stabilité des différents intermédiaires de réaction dans ce site.

5.2. Mise en œuvre

Idéalement, cette étude devrait se faire en utilisant les méthodes quantiques les plus précises possibles comme, par exemple, les méthodes DFT ou MP2 employées précédemment. Cepen-

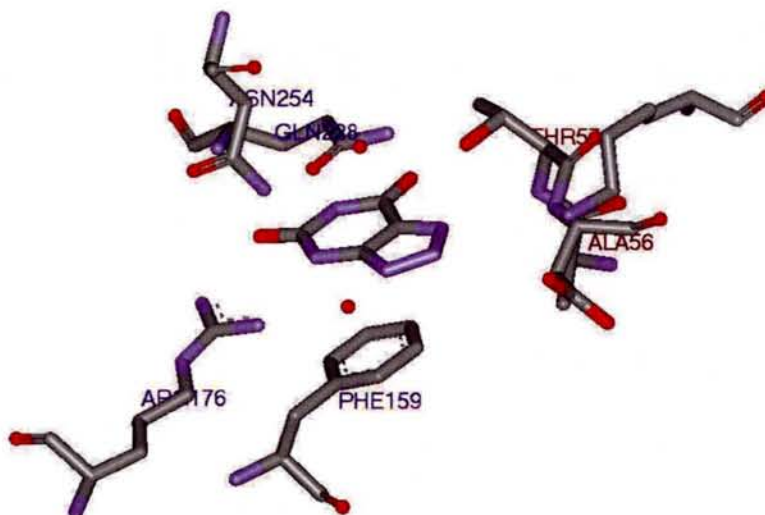


FIG. 5.1.: Position de la 8-azaxanthine et des molécules d'eau dans le site actif de 2UOX.

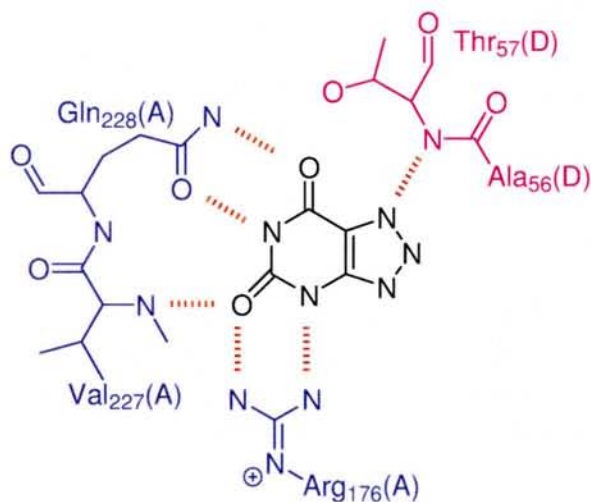


FIG. 5.2.: Les liaisons hydrogènes entre la 8-azaxanthine et le site actif de l'urate oxydase d'après 2UOX.

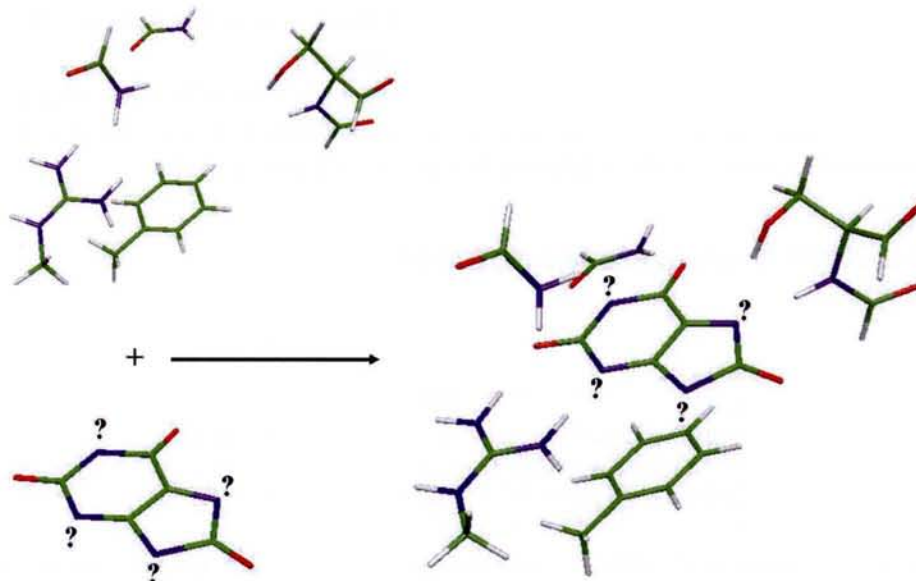


FIG. 5.3.: A la recherche des états de protonation de l'acide urique à l'intérieur du site actif de 2UOX.

dant, ceci n'est pas réalisable à cause des temps de calculs rédhibitoires dus aux tailles très importantes des systèmes envisagés.

Ainsi dans le reste du chapitre, nous présentons en majorité des résultats quantiques semi-empiriques utilisant la méthode PM3, seule méthode associant ici à la fois rapidité de calcul et précision raisonnable des résultats. Cependant, afin d'avoir une idée des erreurs engendrées par l'utilisation de la méthode PM3, nous avons, dans le cas de l'étude de la stabilité des formes anioniques dans le site actif, optimisé également nos structures à l'aide de la DFT. De plus, des calculs d'énergie simple DFT sur des géométries optimisées selon PM3 ont aussi été abordés.

Dans tous les calculs suivants, les optimisations de géométrie ont été effectuées en considérant tous les atomes lourds (C, N, O) provenant de l'enzyme comme fixes dans l'espace, alors que les protons, rajoutés à la construction du modèle, ainsi que le substrat et les molécules d'eau ont été laissés libre de se mouvoir.

5.3. Stabilité des formes anioniques dans le site actif

La structure cristallographique 2UOX de l'urate oxydase n'indiquant pas la position des hydrogènes, notamment ceux du substrat, nous avons entrepris l'étude des stabilités relatives des formes anioniques de l'acide urique à l'intérieur du site actif. Nous avons ainsi cherché quelle est la forme la plus stable du substrat dans le site actif afin de pouvoir identifier la forme initiale du substrat qui induira la réactivité de l'acide urique dans l'enzyme. La Figure 5.3 résume la problématique : en considérant notre modèle de site actif protoné, quel est l'état de protonation

de l'acide urique ? Dans cette figure, le substrat a été marqué avec les indices (?) aux quatre positions azotées car ce sont celles qui peuvent être protonées.

Le calcul de l'énergie d'interaction entre le substrat et le site actif pour chaque forme de monoanions et de dianions a été réalisé en évaluant la différence d'énergie entre le modèle de site actif contenant le substrat et le substrat et le site actif séparés à l'infini.

5.3.1. Insertion d'un urate monoanion

Méthode	Monoanions			
	1	3	7	9
PM3	13.0	00.0	17.2	19.8
B3LYP/6-31G**//PM3	18.8	00.0	18.3	21.8
B3LYP/6-31+G**//PM3	14.9	00.0	16.9	20.3
B3LYP/6-31G**	12.0	00.0	15.2	17.8

TAB. 5.1.: Energies relatives de stabilité des monoanions de l'acide urique dans le site actif de 2UOX par rapport au monoanion 3 (en kcal/mol).

Dans le cas du monoanion, nous pouvons remarquer que la charge totale du site actif est de +1 et la charge totale du substrat (monoanion) est de -1, ainsi que la charge totale du système modèle par le monoanion est de zéro. Les résultats obtenus pour la stabilité des urates monoanions sont indiqués dans le Tableau 5.1. D'un point de vue énergétique, le monoanion 3 est le plus stable dans le site actif par une énergie de 13.0 kcal/mol au niveau PM3 par rapport à la forme la plus proche qui est le monoanion 1. Cette conclusion a également été trouvée au niveau B3LYP/6-31G** et B3LYP/6-31+G** sur des géométries optimisées par la méthode PM3. Les résultats au niveau B3LYP/6-31G** avec l'optimisation complète de géométrie confirme que la conformation du monoanion 3 est la forme la plus stable de toutes. Cependant, en raison de l'interaction stérique entre le proton en position 7 et le proton de Thr57, une tautomerisation devrait probablement se faire pour stabiliser le substrat dans le site actif. Ceci sera traité dans le chapitre 8.

5.3.2. Insertion d'un urate dianion

Dans le cas du dianion, la charge totale du système modèle devient -1 au lieu de 0 comme dans le cas de monoanion. Le Tableau 5.2 permet de constater que le dianion 3-7 a une énergie plus faible que celle du dianion 3-9 et il est la forme la plus stable parmi toutes les formes dianions. En comparant ces valeurs avec celles obtenues lors de l'étude de stabilité des formes anioniques dans le solvant, nous remarquons que le dianion 3-7 est plus stable dans le site actif de l'enzyme alors que le dianion 3-9 l'est dans le vide et dans le solvant. En effet, dans le site actif, le dianion 3-7 est plus stable que le dianion 3-9 respectivement par une énergie de 7.9 et de 8.6 kcal/mol avec les méthodes PM3 et DFT. D'autre part, alors que le dianion 1-9 est énergétiquement très proche dans le vide et dans le solvant du dianion 3-7, celui-ci est moins stable par une énergie

5.4. POTENTIELS D'IONISATION DES FORMES ANIONIQUES

Méthode	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	12.5	43.6	46.0	00.0	7.9	30.9
B3LYP/6-31G**//PM3	14.8	43.1	47.7	00.0	9.0	25.0
B3LYP/6-31+G**//PM3	12.0	40.0	46.4	00.0	7.8	23.8
B3LYP/6-31G**	11.0	39.0	22.2	00.0	8.6	22.8

TAB. 5.2.: Energies relatives de stabilité des dianions de l'acide urique par rapport au dianion 3-7 (en kcal/mol).

de 42.2 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G**, ceci peut venir des interactions des protons entre la position N7 et le N-H de Thr57.

Par ailleurs, un calcul de BSSE¹²² a été fait dans le cas des dianions 3-7 et 3-9 pour comparer les résultats déjà obtenus. La correction obtenue est d'environ 1.2 kcal/mol pour chacun des dianions. Ainsi, il n'y a pas de changement dans les différences de stabilisations entre le dianion 3-7 et le dianion 3-9. Le dianion 3-7 est donc bien la forme la plus stable dans le site actif, et, même si les dianions 3-7 et 3-9 sont proches énergétiquement dans le vide et dans l'eau, l'enzyme urate oxydase possède une forte préférence pour le dianion 3-7.

5.4. Potentiels d'ionisation des formes anioniques

Nous avons montré dans le chapitre 3 que le potentiel d'ionisation d'une molécule est lié directement à sa capacité à donner un électron.⁸⁹ Nous avons aussi étudié précédemment cette propriété pour l'acide urique et ses formes anioniques dans le vide et dans le solvant. Cependant, ces résultats doivent être comparés à ceux obtenus par des calculs réalisés dans le site actif de l'urate oxydase.

Méthode	Monoanions			
	1	3	7	9
PM3	166.1	151.4	142.5	146.8
B3LYP/6-31G(d,p)//PM3	168.9	144.7	137.2	136.9
B3LYP/6-31+G(d,p)//PM3	173.4	154.2	147.2	149.8

TAB. 5.3.: Potentiels d'ionisation des formes monoanioniques de l'acide urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

Les méthodes décrites précédemment ont été utilisées pour déterminer les potentiels d'ionisation. Dans le cas du monoanion, la réaction permettant de donner un électron demande une énergie croissante en allant du AUN_7^- , AUN_9^- , AUN_3^- au AUN_1^- (voir Tableau 5.3). Ceci confirme les résultats que nous avons obtenus précédemment où nous avons étudié le potentiel d'ionisation dans le solvant.

Pour les dianions urates, la réaction qui permet de donner un électron demande un apport d'énergie, mais la valeur de ces énergies est plus faible que dans le cas des dianions dans le

Méthode	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	45.1	52.6	59.6	41.4	57.2	39.2
B3LYP/6-31G(d,p)//PM3	43.8	50.9	53.2	36.2	50.4	34.9
B3LYP/6-31+G(d,p)//PM3	51.8	61.9	68.4	50.7	65.1	50.6

TAB. 5.4.: Potentiels d'ionisation des formes dianioniques de l'acide urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

solvant eau. De plus, les calculs réalisés dans le site actif ne changent pas l'ordre de probabilité des réactions des dianions déjà trouvé dans le solvant : du $AUN_7^-N_9^-$, $AUN_3^-N_7^-$, $AUN_1^-N_3^-$, $AUN_1^-N_7^-$, $AUN_3^-N_9^-$ au $AUN_7^-N_9^-$. Pour conclure, nous pouvons constater que la présence du site actif ne modifie par l'ordre de probabilité des réactions à donner un électron. En conséquence, nous pouvons en conclure que le dianion 3-7, l'espèce qui s'insère le plus facilement dans le site actif de l'UOX, est aussi le meilleur candidat pour donner un électron à O_2 (voir Tableau 5.4).

5.5. Stabilité des intermédiaires et produits possibles

Nous présentons ici les différents produits et intermédiaires auxquels peuvent mener la réaction d'oxydation qui ont été étudiés lors de la réactivité intrinsèque dans chapitre précédent. Ces produits et intermédiaires possibles sont au nombre de quatre, en fonction de la position en C4 ou C5 d'un groupement OOH ou OH : soit le OOH se place sur le carbone 4 soit sur le carbone 5 pour former le 4-hydroperoxyisourate ou le 5-hydroperoxyisourate respectivement ; soit le OH se fixe sur le carbone 4, soit sur le carbone 5 pour construire le 4-hydroxyisourate ou le 5-hydroxyisourate.

5.5.1. L'intermédiaire 5-hydroperoxyisourate

Dans le cas du 5-hydroperoxyisourate, les formes anioniques (monoanion 9 et dianions 1-9, 3-9 et 7-9) ne permettent pas de former ce produit du fait de l'absence de proton sur l'azote 9 (voir Figure 5.4). Le Tableau 5.5 reporte les différences de stabilisation du 5-hydroperoxyisourate par rapport aux monoanions de l'urate qui peuvent être à l'origine de sa formation. En comparant les énergies relatives de chaque état par rapport à l'énergie d'interaction des monoanions et dianions, nous constatons que l'ordre de probabilité de formation de l'intermédiaire 5-hydroperoxyisourate est de AUN_3^- , AUN_7^- , à AUN_1^- . De plus, le 5-hydroperoxyisourate est un produit instable dans le cas du monoanion 7 (1.7 kcal/mol au niveau PM3) et du monoanion 1 (22.1 kcal/mol au niveau PM3) par rapport à la stabilité relative de ces monoanions dans le site actif.

Le Tableau 5.6 reporte les différences de stabilité du 5-hydroperoxyisourate par rapport aux dianions qui peuvent être à l'origine de sa formation. Nous constatons que l'intermédiaire 5-hydroperoxyisourate créé à partir de dianion 1-3 est instable (11.3 et 8.2 kcal/mol selon les méthodes PM3 et B3LYP/6-31G**, respectivement). Dans le cas du dianion 3-7, l'intermédiaire 5-hydroperoxyisourate s'associe avec l'enzyme avec une différence d'énergie de stabilisation de

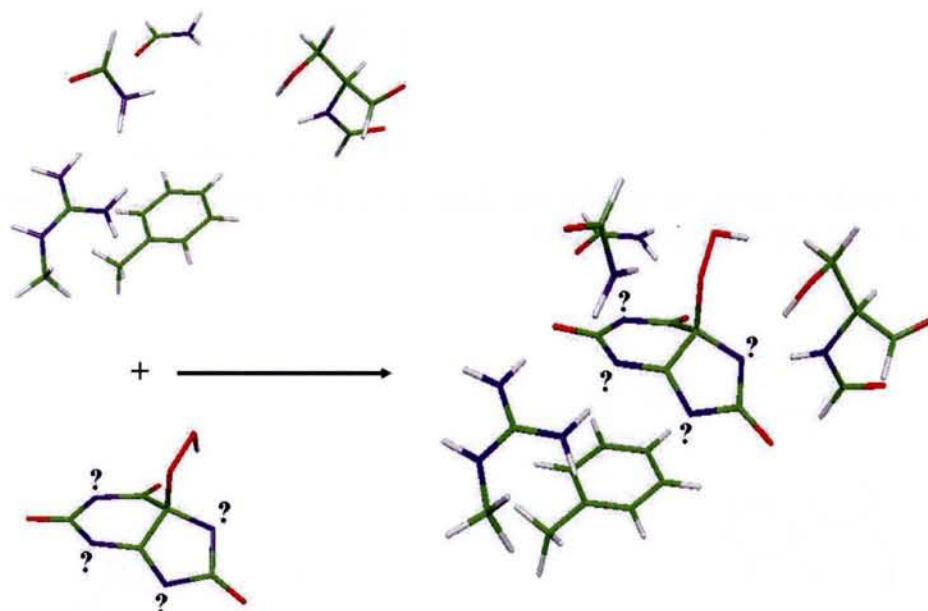


FIG. 5.4.: Positionnement de l'intermédiaire 5-hydroperoxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.

Méthode	Monoanions			
	1	3	7	9
PM3	22.1	-1.4	1.9	—
B3LYP/6-31G**//PM3	21.8	-2.7	1.1	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	21.0	-1.5	1.6	—

TAB. 5.5.: Energies relatives de stabilité des monoanions 5-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

9.3 kcal/mol au niveau PM3 et de 7.8 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G**. Ainsi, nous avons remarqué que l'ordre de stabilité relative dans le cas du dianion va du $\text{AUN}_1^- \text{N}_7^-$, $\text{AUN}_3^- \text{N}_7^-$ au $\text{AUN}_1^- \text{N}_3^-$. Ces résultats ont aussi été observés en tenant compte de l'ajout de fonctions diffuses par la méthode DFT, où nous avons constaté que la fonction diffuse a un effet négligable sur les énergies.

5.5.2. L'intermédiaire 4-hydroperoxyisourate

Ce produit ne peut se construire qu'avec le monoanion 7 et les dianions 1-7 et 3-7. Nous pensons simplement que ceci est dû au fait que, dans les autres formes anioniques, la double liaison entre le C5 et N7 ne se forme pas. Dans ce dernier cas le produit ne peut que rester dans un état triplet (voir Figure 5.5).

Nous donnons dans les Tableaux 5.7 et 5.8 les valeurs des énergies relatives de chacun de ces

Méthode	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	11.3	-1.4	—	9.3	—	—
B3LYP/6-31G**//PM3	8.2	-2.0	—	7.8	—	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	8.3	-2.2	—	7.7	—	—

TAB. 5.6.: Energies relatives de stabilité des dianions 5-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

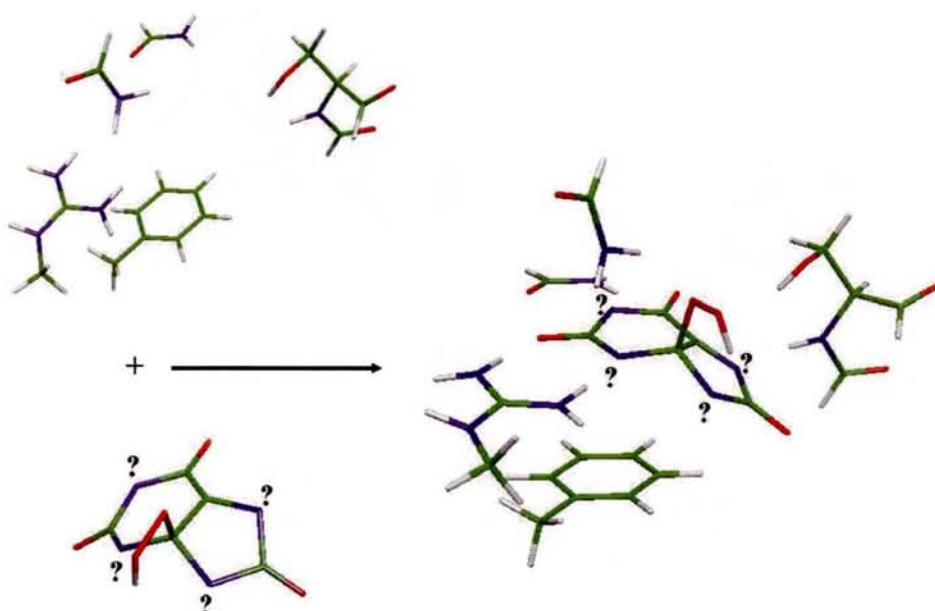


FIG. 5.5.: Positionnement de l'intermédiaire 4-hydroperoxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.

Méthode	Monoanions			
	1	3	7	9
PM3	—	—	0.7	—
B3LYP/6-31G**//PM3	—	—	4.9	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	—	—	4.0	—

TAB. 5.7.: Energies relatives de stabilité des monoanions 4-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

intermédiaires. L'étude de ces valeurs nous mène aux mêmes conclusions que celles que nous avons trouvées lors de l'étude du 5-hydroperoxyisourate, c'est-à-dire, dans le cas du monoanion 7, l'intermédiaire est thermodynamiquement instable par une énergie de déstabilisation de 4.9 et 4 kcal/mol aux niveaux de B3LYP/6-31G**//PM3 et B3LYP/6-31+G**//PM3, respectivement.

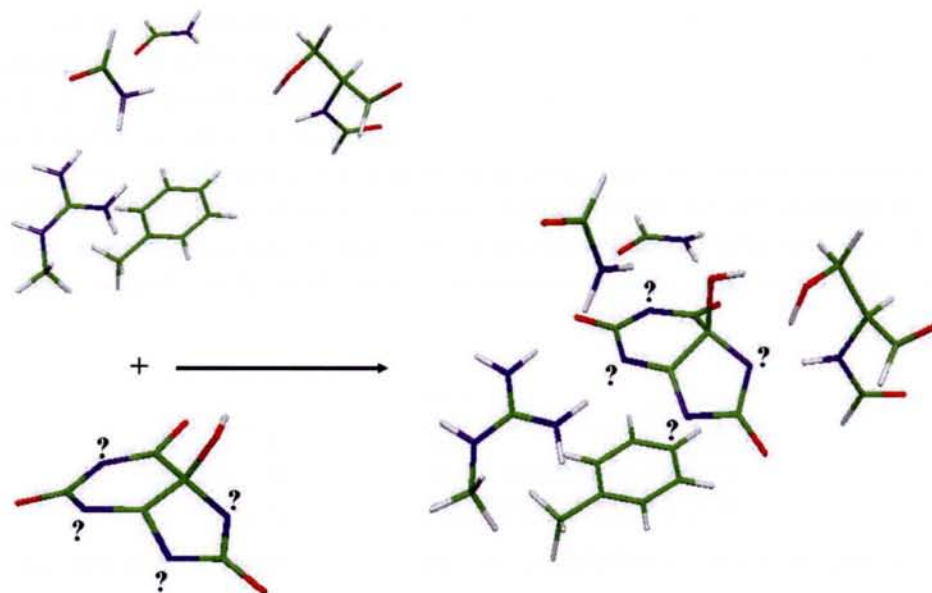


FIG. 5.6.: Positionnement du produit 5-hydroxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.

Par ailleurs, dans le cas des dianions, nous avons constaté que cet intermédiaire est aussi instable pour les deux dianions 1-7 et 3-7 par une énergie de 13.2 et 13.8 kcal/mol, respectivement au niveau B3LYP/6-31G**//PM3.

Méthode	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	—	10.1	—	10.4	—	—
B3LYP/6-31G**//PM3	—	13.2	—	13.8	—	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	—	12.5	—	13.3	—	—

TAB. 5.8.: Energies relatives de stabilité des monoanions 4-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

5.5.3. Le produit 5-hydroxyisourate

Après l'étude de la stabilité des intermédiaires 4-hydroperoxyisourate et 5-hydroperoxyisourate, nous avons examiné la stabilité des produits possibles qui sont le 5-hydroxyisourate et le 4-hydroxyisourate dans le site actif.

Les résultats obtenus sont reportés dans les Tableaux 5.9 et 5.10 et l'insertion du 5-hydroxyisourate dans le site actif est montrée dans la Figure 5.6. Dans le cas d'un produit formé à partir d'un monoanion, le 5-hydroxyisourate ne peut pas se former à partir d'un monoanion 9 à cause de l'absence de proton en position 9. Le Tableau 5.9 montre que le 5-hydroxyisourate est

thermodynamiquement stable par rapport au monoanion 3 par une énergie de -5.0 et -4.6 kcal/mol selon les méthodes PM3 et B3LYP/6-31G**//PM3, respectivement. Ceci a aussi été observé dans le cas d'une comparaison avec le monoanion 7 (-1.7 kcal/mol au niveau PM3 et -2.0 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G**//PM3). Par contre, le monoanion 1 forme un produit instable car le 5-hydroxyisourate en comparaison avec le monoanion 1 a une énergie 16.8 kcal/mol plus haute selon la méthode PM3 et 14.8 kcal/mol plus haute selon la méthode B3LYP/6-31G**. En comparant les énergies relatives du 5-hydroxyisourate dans le site actif de UOx avec celles des monoanions, nous remarquons que, le monoanion 3 donne le produit 5-hydroxyisourate le plus stable.

Méthode	Monoanions			
	1	3	7	9
PM3	16.8	-5.0	-1.7	—
B3LYP/6-31G**//PM3	14.8	-4.6	-2.0	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	17.5	-4.1	-2.1	—

TAB. 5.9.: Energies relatives de stabilité des monoanions 5-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

Dans le cas des dianions, nous constatons que le produit 5-hydroxyisourate ne peut être construit que par les dianions 1-3, 1-7, 3-7. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 5.10 qui montre que l'utilisation d'un dianion 1-3 donne un produit instable par une énergie de 15.7 et de 10.0 kcal/mol aux niveaux PM3 et B3LYP/6-31G**//PM3, respectivement. Par contre, les dianions 1-7 et 3-7 permettent d'obtenir un produit stable avec une énergie de -1.9 et de -8.0 kcal/mol, respectivement au niveau PM3. Ces résultats sont reproduits au niveau B3LYP/6-31G**//PM3 car le produit 5-hydroxyisourate a une énergie dans le site actif de UOx de -3.0 et de -9.0 kcal/mol par rapport aux dianions 1-7 et 3-7, respectivement. En comparant le produit 5-hydroxyisourate avec tous les dianions, nous constatons que c'est le dianion 3-7 qui donne le produit le plus stable.

Méthode	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	15.7	-1.9	—	-8.0	—	—
B3LYP/6-31G**//PM3	10.0	-3.0	—	-9.0	—	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	12.0	-2.6	—	-8.6	—	—

TAB. 5.10.: Energies relatives de stabilité des dianions 5-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

5.5.4. Le produit 4-hydroxyisourate

Le produit 4-hydroxyisourate ne peut se former seulement que dans le cas du monoanion 7 et du dianion 1-7 et 3-7 pour la même raison que pour la formation du produit 5-hydro-

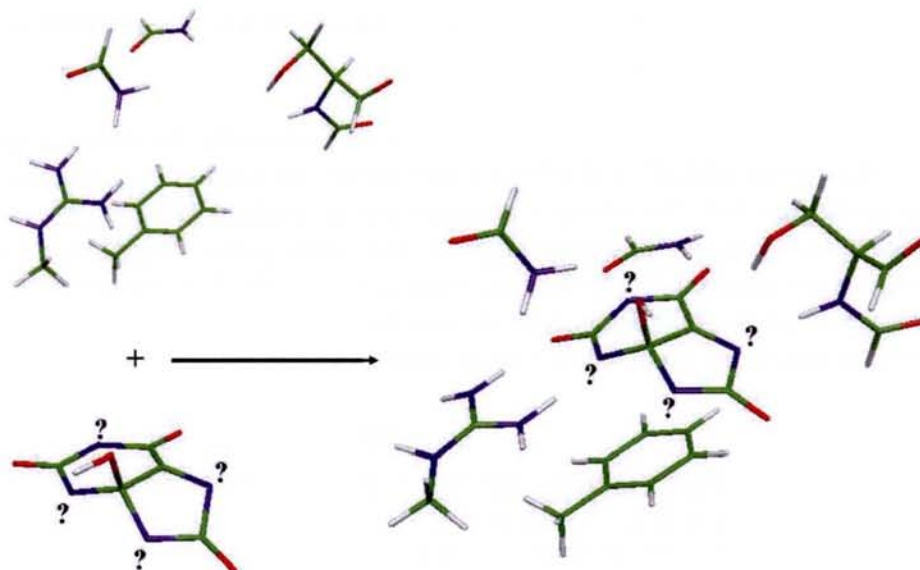


FIG. 5.7.: Positionnement du produit 4-hydroxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.

peroxyisourate (voir Figure 5.7). Avec le monoanion 7, nous avons constaté que le produit 4-hydroxyisourate est instable par une énergie de 1.1 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G**//PM3 (voir Tableau 5.11).

Méthode	Monoanions			
	1	3	7	9
PM3	—	—	-2.2	—
B3LYP/6-31G**//PM3	—	—	1.1	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	—	—	1.8	—

TAB. 5.11.: Energies relatives de stabilité des monoanions 4-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

Méthode	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
PM3	—	-6.5	—	5.6	—	—
B3LYP/6-31G**//PM3	—	-3.3	—	1.1	—	—
B3LYP/6-31+G**//PM3	—	-3.5	—	1.2	—	—

TAB. 5.12.: Energies relatives de stabilité des dianions 4-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).

Dans le cas des dianions, ce produit est instable par rapport au dianion 1-7 par une énergie de 1.2 kcal/mol au niveau B3LYP/6-31G**. Par contre, le produit 4-hydroxyisourate est stable par

rapport au dianion 1-3 par une énergie de -6.5 et de -3.3 kcal/mol aux niveaux PM3 et B3LYP/6-31G**//PM3, respectivement (voir Tableau 5.12).

Les Tableaux 5.13 et 5.14 rassemblent les énergies de l'ensemble des intermédiaires et des produits calculées par la méthode B3LYP/6-31+G**//PM3 par rapport respectivement au monoanion 3 et au dianion 3-7. Ces tableaux montrent que le produit 5-hydroxyisourate formé à partir du monoanion 3 présente la configuration la plus stable parmi toutes. De même, le dianion 3-7 est à l'origine du produit 5-hydroxyisourate le plus stable. Ceci montre que le site actif de l'enzyme urate oxydase semble construit de manière à former préférentiellement le produit 5-hydroxyisourate à partir du monoanion 3 ou du dianion 3-7, d'où la sélectivité de l'enzyme.

	Monoanions			
	1	3	7	9
5-hydroperoxyisourate	21.8	-2.7	1.1	—
4-hydroperoxyisourate	—	—	4.9	—
5-hydroxyisourate	14.8	-4.6	-2.0	—
4-hydroxyisourate	—	—	1.1	—

TAB. 5.13.: Energies relatives des produits par rapport aux réactifs monoanioniques dans le site actif de 2UOX et d'après le niveau B3LYP/6-31G**//PM3 (en kcal/mol).

	Dianions					
	1-3	1-7	1-9	3-7	3-9	7-9
5-hydroperoxyisourate	8.2	-2.0	—	7.8	—	—
4-hydroperoxyisourate	—	10.1	—	13.8	—	—
5-hydroxyisourate	10.0	-3.0	—	-9.0	—	—
4-hydroxyisourate	—	-3.3	—	1.1	—	—

TAB. 5.14.: Energies relatives des produits par rapport aux réactifs dianioniques dans le site actif de 2UOX et d'après le niveau B3LYP/6-31G**//PM3 (en kcal/mol).

5.6. Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre l'étude théorique des stabilités relatives des formes anioniques de l'acide urique et de leurs produits, et leur probabilité à donner un électron dans le site actif. Cette étude nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

- Le monoanion 3 présente la forme la plus stable dans le site actif parmi tous les monoanions possibles, cependant en raison des interactions des atomes hydrogènes de l'azote 7 et de Thr57, une tautomerisation peut être envisagée pour éviter ce problème. Ceci sera détaillé dans le chapitre 8. Parallèlement, le dianion 3-7 est la conformation la plus stable parmi tous les dianions.

- Parmi toutes les formes anioniques, la présence d'un dianion 3-7 à l'intérieur du site actif de UOx favorise la réaction permettant de donner un électron.
- Le 5-hydroxyisourate du dianion 3-7 est la configuration la plus stable parmi tous les produits possibles.

Ainsi d'après l'ensemble de nos résultats jusqu'ici, nous constatons que c'est le dianion 3-7, choisi par l'enzyme dans son site actif, qui est l'espèce anionique de l'acide urique la plus favorable pour son oxydation par O_2 . De plus, il est certain que le produit formé est le 5-hydroxyisourate car le plus stable dans le site actif par rapport au dianion 3-7.

A partir de l'ensemble de ces données, nous allons étudier dans le chapitre suivant, la réactivité du dianion 3-7 avec O_2 dans notre modèle de site actif de l'urate oxydase.

6. Chemins réactionnels de l'oxydation du dianion urate dans l'urate oxydase 2UOX

L'objectif de ce chapitre est d'étudier le chemin réactionnel de l'acide urique dans un modèle de site actif en présence de molécules d'eau qui sont impliquées dans la réaction. D'après les résultats obtenus aux chapitres précédents, la forme réactive de l'acide urique au sein du site actif de l'urate oxydase semble très probablement être le dianion 3-7. C'est pourquoi nous utiliserons cette molécule comme substrat dans le reste de ce chapitre.

Nous tenterons aussi de répondre, par une étude plus détaillée, à quelques questions concernant ce mécanisme d'action :

- La première question consiste à déterminer le nombre d'étapes nécessaires pour arriver au produit 5-hydroxisourate à partir de l'acide urique dans sa configuration dianion 3-7. Pour cela une étude du mécanisme réactionnel sera entreprise avec localisation des intermédiaires et des états de transition à l'intérieur de notre modèle de site actif.
- Nous savons que le dioxygène a deux électrons libres qui donnent un état triplet pour le réactif et que le produit final est dans un état singulet. La question qui se pose est comment le passage de l'état triplet à l'état singulet peut-il s'effectuer ? Pour répondre à cette question, nous déterminerons le chemin réactionnel dans les deux états électroniques.
- La structure cristallographique en présence de la 8-azaxanthine montre la présence de deux molécules d'eau. Cependant, avec un autre type de substrat tel que le 9-méthylurate, la présence d'une seule molécule d'eau est montrée présente par cristallographie.⁸¹ La question ici est de connaître combien de molécules d'eau (une ou deux) sont nécessaires pour le mécanisme ? Pour répondre à cette question, nous étudierons le mécanisme assisté (deux molécules d'eau) et le mécanisme non assisté (une molécule d'eau).

6.1. Système modèle

Pour le choix de notre système d'étude, nous avons pris en compte le même modèle de site actif qui a été considéré dans le chapitre précédant en tenant compte de la position des deux molécules d'eau qui peuvent être impliquées dans le mécanisme réactionnel et qui ont été identifiées par cristallographie. Pour modéliser notre réaction dans le site actif, le modèle est composé de (voir Figure 6.2) :

- Un ensemble d'atomes décrivant le site actif de l'enzyme provenant des acides aminés Ala56(D), Thr57(D), Phe159(A), Arg176(A), Gln228(A) et Asn254(A) comme indiqué Page 67 ;
- Le substrat dérivé de l'acide urique chargé négativement en deux positions : N₃ et N₇.
- Au choix une ou deux molécules d'eau :
 - dans une première étude, deux molécules d'eau ont été prises en compte, la première molécule d'eau est au dessus du substrat et la deuxième est en liaison hydrogène avec l'azote 9 du substrat, comme cela a été découvert dans la structure 2UOX⁸¹ ;
 - dans une deuxième étude, une seule molécule d'eau a été positionnée au dessus du substrat (mécanisme non-assisté).
- Une molécule de dioxygène a été placée entre les deux molécules d'eau dans la première étude ou en remplacement de la molécule d'eau en interaction avec N₉ dans la deuxième étude.

6.2. Méthodologie employée

La géométrie de départ du système est tirée de la structure cristallographique du site actif de 2UOX.⁸¹ Au total, 77 atomes sont considérés, et donc, dans un premier temps, la méthode PM3^{34,35} qui donne des résultats plus rapides que les autres méthodes quantiques a été privilégiée. Après chaque détermination des états de transition lors de la découverte du chemin réactionnel, une étude d'IRC (IRC : Intrinsic Reaction Coordinate)^{123,124} a été effectuée systématiquement pour confirmer les résultats obtenus au niveau des états de transition.

6.3. Mécanisme général de réaction

Nous savons que la molécule d'O₂ a naturellement deux électrons non appariés, et par l'étude qui a été faite dans le chapitre 3, nous avons remarqué que O₂ a la capacité de capter un électron du dianion 3-7 de l'acide urique. Ainsi, la première étape de la réaction d'oxydation du dianion 3-7 consiste à transférer un électron du substrat vers O₂. Ensuite, O₂ prend un proton du N₉ pour former OOH. Quel que soit le mécanisme (assisté ou non), OOH aura un électron libre, il est considéré donc comme OOH radicalaire. Ce dernier prend un hydrogène de la molécule d'eau qui se trouve au dessus du substrat pour former H₂O₂ et ensuite il y aura fixation du groupement radicalaire OH restant sur le carbone 5 pour donner finalement le 5-hydroxyisourate. Tout ce mécanisme est résumé dans la Figure 6.1.

6.4. Mécanisme d'action avec deux molécules d'eau

L'optimisation de la structure du réactif nous a permis de découvrir les liaisons hydrogène existant dans ce modèle d'étude. La Figure 6.2 montre l'existence de 8 liaisons hydrogène entre les espèces réactives et les résidus de 2UOX permettant de stabiliser l'ensemble. Ces liaisons hydrogènes sont regroupées en trois parties.

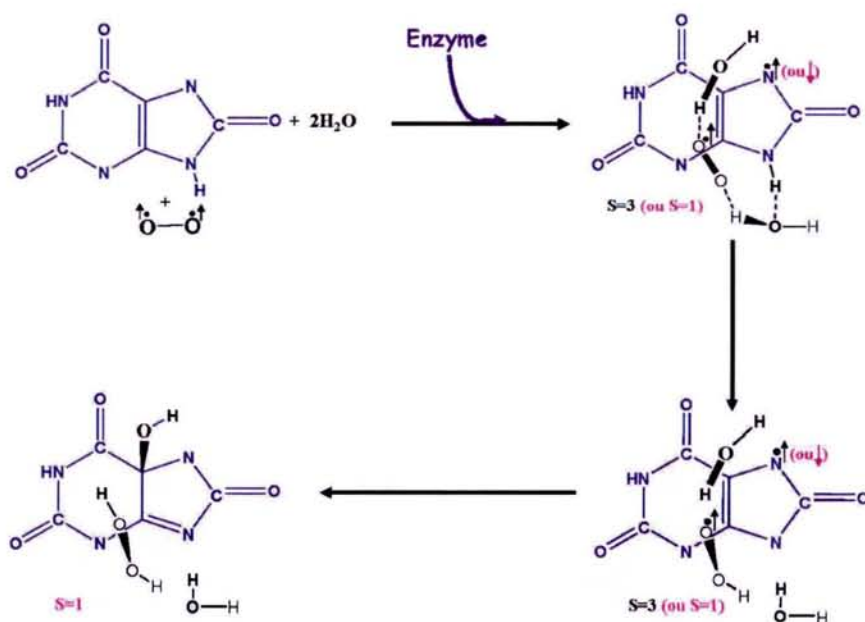


FIG. 6.1.: Mécanisme réactionnel envisagé avec deux molécules d'eau.

1. Les liaisons hydrogènes entre le substrat et le site actif :
 - Une liaison entre H_1 du substrat et O_{δ}^{228} ;
 - Une liaison entre O_6 du substrat et $H_{\epsilon 1}^{228}$;
 - Une liaison entre N_3 du substrat et $H_{\zeta 11}^{176}$;
 - Une liaison entre O_2 du substrat et $H_{\zeta 22}^{176}$;
 - Une liaison entre N_7 du substrat et H_{γ}^{57} ;
 - Une liaison entre N_7 du substrat et H_{γ}^{57} .
2. Les liaisons hydrogènes entre les molécules d'eau et le site actif :
 - Une liaison entre O^{W1} et $H_{\delta 1}^{254}$;
 - Une liaison entre H_2^{W1} et O_{γ}^{57} .
3. Les liaisons hydrogènes entre les espèces réactives :
 - Une liaison entre H_9 du substrat et O^{W2} ;
 - Une liaison entre H_1^{W2} et O_1^{O2} ;
 - Une liaison entre H_2^{W1} et O_2^{O2} .

6.4.1. Aspect géométrique

Nous avons étudié le changement de géométrie dans chaque étape et examiné les liaisons hydrogène entre le substrat et le site actif au cours de la réaction. Nous reportons dans les Tableaux 6.1 et 6.2 les variations des longueurs de liaisons, des angles et des angles dièdres le long du chemin réactionnel trouvé pour les différents intermédiaires, états transitions et réactif.

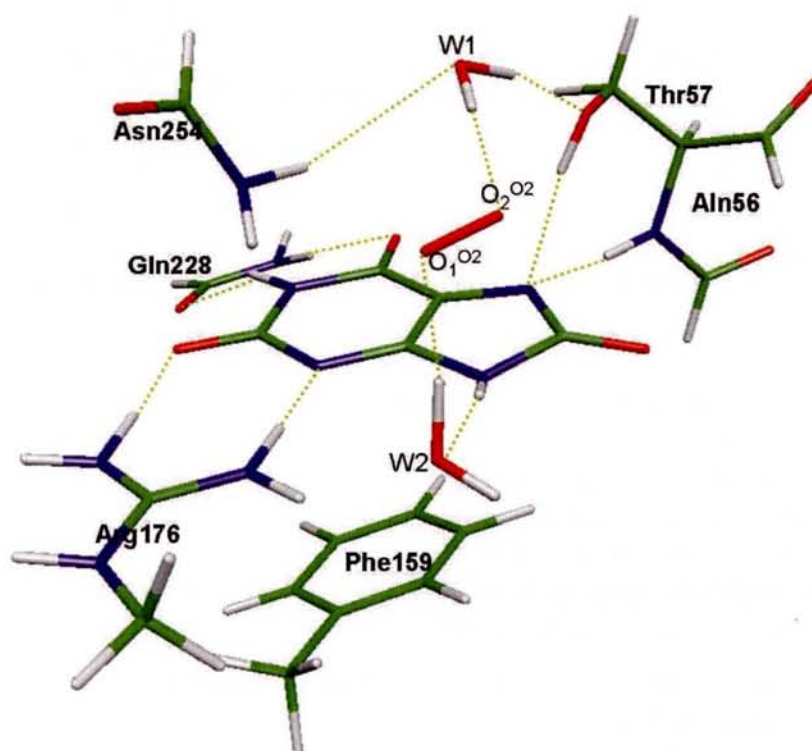


FIG. 6.2.: Positionnement des réactifs (dianion 3-7, molécules d'eau W1 et W2, et dioxygène) à l'intérieur du site actif de 2UOX (optimisation PM3).

6.4. MÉCANISME D'ACTION AVEC DEUX MOLÉCULES D'EAU

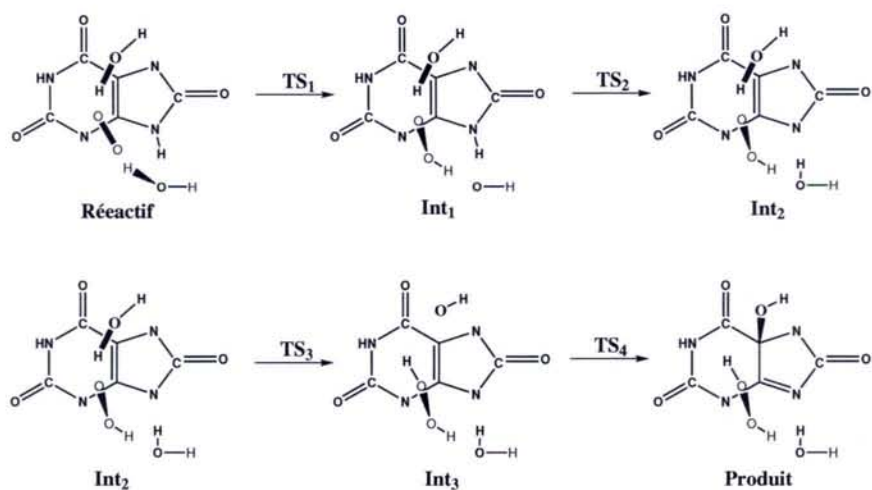


FIG. 6.3.: Chemin réactionnel avec deux molécules d'eau.

Concernant la géométrie du substrat, nous remarquons que les variations des longueurs des liaisons entre les carbones et les oxygènes de chaque groupement carbonyle sont du même ordre. Les valeurs des liaisons entre le substrat et le site actif montrent qu'il y a des liaisons hydrogène entre ces deux entités. Les valeurs correspondantes à ces liaisons hydrogène restent stables pendant la réaction. Ceci indique que le substrat ne change pas de position pendant la réaction. Les valeurs des angles entre le site actif et le substrat montrent que ce dernier est dans le même plan que Arg176 et Gln228. D'un autre côté, les valeurs des liaisons entre la molécule d'eau au dessus du substrat et Thr57 et Asn254 montre qu'il existe des interactions entre ces entités.

Le changement des valeurs des liaisons entre H_2^{W2} et O_1^{O2} montre que l'hydrogène de cette molécule a été transféré dans la première étape vers O_1^{O2} (voir Tableau 6.1). Parallèlement, la modification des valeurs des liaisons entre H_9 et O^{W2} montre que ce dernier récupère le proton de l'azote 9 pour reformer la molécule d'eau. La modification des longueurs de liaisons $O_2^{O2}-H_1^{W1}$ et $H_1^{W1}-O^{W1}$ prouve qu'il y a un transfert d'hydrogène vers le OOH radical. D'après toujours ce même tableau, nous constatons que la liaison entre O^{W1} et le C_5 du substrat ne se forme que lors de la dernière étape de la réaction (voir Figure 6.3).

6.4.2. Aspect énergétique

La Figure 6.2 montre le modèle du site actif qui a été choisi pour déterminer le mécanisme de réaction. L'optimisation du réactif dans son état triplet montre que quand le substrat et O_2 viennent ensemble dans le site actif, un transfert d'électron à partir du substrat vers O_2 a lieu spontanément (voir plus loin). Dans ce cas, l'état triplet se transforme naturellement en deux espèces doublets. A partir de cette géométrie optimisée, nous pouvons remarquer que les deux électrons sont éloignés et situés dans des molécules différentes. Cependant, ces deux électrons peuvent avoir des moments de spin parallèle ou anti-parallèle indépendamment. Par conséquent,

CHAPITRE 6. CHEMINS RÉACTIONNELS DE L'OXYDATION DU DIANION URATE
DANS L'URATE OXYDASE 2UOX

	Réactif	TS ₁	Int ₁	TS ₂	Int ₂	TS ₃	Int ₃	TS ₄	Produit
H ₁ -N ₁	1.002	1.000	1.000	1.000	1.001	1.001	1.001	1.001	1.002
N ₁ -C ₂	1.421	1.424	1.426	1.427	1.425	1.424	1.425	1.427	1.436
C ₂ -O ₂	1.240	1.239	1.238	1.243	1.248	1.249	1.250	1.247	1.245
C ₂ -N ₃	1.416	1.416	1.413	1.405	1.399	1.398	1.397	1.398	1.390
N ₃ -C ₄	1.346	1.347	1.347	1.357	1.373	1.377	1.379	1.374	1.383
C ₄ -C ₅	1.440	1.441	1.446	1.448	1.454	1.456	1.453	1.464	1.542
C ₄ -N ₉	1.407	1.402	1.394	1.382	1.363	1.360	1.358	1.356	1.322
C ₅ -C ₆	1.451	1.450	1.449	1.447	1.443	1.442	1.441	1.453	1.540
C ₅ -C ₆	1.220	1.226	1.227	1.230	1.230	1.231	1.229	1.226	1.226
C ₅ -N ₇	1.371	1.371	1.373	1.373	1.373	1.372	1.372	1.376	1.475
N ₇ -C ₈	1.456	1.456	1.457	1.464	1.467	1.464	1.466	1.467	1.409
C ₈ -O ₈	1.216	1.216	1.219	1.220	1.221	1.222	1.221	1.219	1.223
C ₈ -N ₉	1.464	1.462	1.456	1.454	1.450	1.454	1.454	1.454	1.489
H _{C11} ¹⁷⁶ -N ₃	1.715	1.724	1.735	1.712	1.660	1.661	1.661	1.660	1.661
H _{C22} ¹⁷⁶ -O ₂	1.756	1.761	1.782	1.766	1.721	1.735	1.733	1.732	1.733
H _{ε1} ²²⁸ -O ₆	2.532	2.562	2.561	2.564	2.563	2.544	2.539	2.780	2.612
O _δ ²²⁸ -H ₁	2.621	2.598	2.566	2.567	2.600	2.578	2.578	2.815	2.561
H _γ ⁵⁷ -N ₇	1.881	1.875	1.847	1.846	1.833	1.832	1.827	1.810	1.781
H _γ ⁵⁷ -N ₇	1.788	1.793	1.805	1.815	1.784	1.772	1.775	1.782	1.763
O _γ ⁵⁷ -H ₂ ^{W1}	1.896	1.915	1.859	1.861	1.853	1.820	1.818	1.872	1.805
H _{δ1} ²⁵⁴ -O ^{W1}	2.602	2.559	2.599	2.612	2.668	3.149	3.646	2.027	2.392
N ₉ -H ₉	1.018	1.025	0.986	1.228	1.714	1.758	1.761	1.747	1.766
H ₉ -O ^{W2}	1.865	1.798	1.706	1.326	0.991	0.979	0.978	0.980	0.978
H ₂ ^{W2} -O ^{W2}	0.988	1.041	1.671	1.719	1.810	1.772	1.792	1.815	1.824
H ₂ ^{W2} -O ₁ ^{O2}	1.677	1.296	0.986	0.979	0.972	0.967	0.959	0.960	0.959
O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2}	1.260	1.262	1.265	1.266	1.266	1.349	1.485	1.468	1.468
O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1}	1.799	1.802	1.905	1.901	1.907	1.050	0.950	0.964	0.958
H ₁ ^{W1} -O ^{W1}	0.969	0.966	0.958	0.958	0.958	1.051	1.786	1.847	1.897
H ₂ ^{W1} -O ^{W1}	0.959	0.958	0.960	0.960	0.961	0.959	0.949	0.950	0.965
O ^{W1} -C ₅	4.049	3.977	3.915	3.989	3.944	4.409	4.793	2.370	1.429

TAB. 6.1.: Variations de quelques distances dans le chemin réactionnel avec deux molécules d'eau par PM3 (distance en angströms).

6.4. MÉCANISME D'ACTION AVEC DEUX MOLÉCULES D'EAU

	Réactif	TS ₁	Int ₁	TS ₂	Int ₂	TS ₃	Int ₃	TS ₄	Produit
N _{ζ1} ¹⁷⁶ -H _{ζ11} ¹⁷⁶ -N ₃	174.6	175.0	176.1	175.6	174.8	172.8	172.6	172.8	170.7
N _{ζ2} -H _{ζ22} ¹⁷⁶ -O ₂	174.1	173.7	173.3	173.9	175.7	175.9	175.8	176.2	175.5
O _δ ²²⁸ -H ₁ -N ₁	152.1	153.1	156.0	158.8	160.4	165.2	164.8	150.8	172.2
N _ε ²²⁸ -H _{ε1} ²²⁸ -O ₆	174.7	174.5	175.0	174.8	174.6	173.3	173.7	172.2	173.8
O _γ ⁵⁷ -H _γ ⁵⁷ -N ₇	170.0	170.3	170.8	170.8	171.3	171.1	170.8	173.7	157.1
N _δ ⁵⁷ -H _δ ⁵⁷ -N ₇	172.1	172.1	171.7	171.9	171.4	170.9	170.9	170.9	168.0
N _δ ²⁵⁴ -H _{δ1} ²⁵⁴ -O ^{W1}	148.1	145.6	143.4	141.3	139.5	139.3	137.4	166.1	167.6
O _γ ⁵⁷ -H _γ ^{W1} -O ^{W1}	167.5	167.4	167.3	169.6	169.9	174.0	169.2	163.8	150.6
C ₄ -N ₉ -H ₉	122.3	123.1	124.6	123.2	119.8	127.6	124.3	124.5	121.1
N ₉ -H ₉ -O ^{W2}	161.1	164.2	164.7	170.7	174.4	164.6	167.7	174.5	169.7
H ₉ -O ^{W2} -H ₂ ^{W2}	73.5	80.7	87.0	82.3	74.3	102.6	104.6	80.5	85.7
O ^{W2} -H ₂ ^{W2} -O ₁ ^{O2}	171.3	169.0	170.6	162.7	152.0	165.7	161.5	164.8	160.0
H ₂ ^{W2} -O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2}	106.7	106.0	108.0	108.2	108.3	103.4	97.2	98.4	98.7
O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1}	118.9	121.	167.3	155.8	148.8	107.3	96.2	98.6	99.4
O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1} -O ^{W1}	164.7	166.4	162.8	160.7	158.7	154.8	85.9	149.9	148.2
H ₁ ^{W1} -O ^{W1} -H ₂ ^{W1}	108.2	108.7	108.4	108.6	108.3	109.4	127.6	110.1	94.5
O ^{W1} -H ₂ ^{W1} -C ₅	68.3	68.9	70.4	70.0	66.9	58.0	66.6	85.5	107.0
H ₂ ^{W2} -O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1}	146.6	138.5	1.0	-17.8	-38.9	-112.3	-179.8	-103.7	-104.8

TAB. 6.2.: Variations de quelques angles dans le chemin réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3 (angles en degrés).

Δ E	Réactif	TS ₁	Int ₁	TS ₂	Int ₂	TS ₃	Int ₃	TS ₄	Produit
Etat triplet	00.0	9.1	3.7	10.6	-7.1	27.9	10.8	24.4	22.1
Etat singulet	00.0	9.1	3.7	10.6	-7.1	27.9	10.8	20.0	-26.8

TAB. 6.3.: Energies relatives des différentes structures apparaissant dans le mécanisme réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3 (en kcal/mol).

les états triplet et singulet sont énergétiquement dégénérés puisque dans ce cas l'énergie d'échange est nulle. D'ailleurs, l'optimisation des géométries du réactif dans ses états triplet ou singulet avec couche ouverte donne les mêmes structures et les mêmes énergies.

Nous avons regroupé les énergies relatives obtenues pour les minima et les états de transition dans le Tableau 6.3, où la première ligne présente les intermédiaires et les états de transition qui sont numérotés dans la Figure 6.3, la deuxième correspond aux énergies de l'état singulet couche ouverte, et la troisième correspond à l'état triplet qui a une géométrie équivalente à l'état singulet couche ouverte. Cela veut dire que pour la dernière ligne du Tableau 6.3, les structures triplet allant de la structure Réactif à la structure Int₃ ont été optimisées et correspondent géométriquement et énergétiquement aux structures respectives de l'état singulet, tandis que, pour les structures TS₄ et Produit, les valeurs reportées ont été obtenues à partir d'un calcul simple d'énergie sur les structures respectives optimisées à l'état singulet.

D'un point de vue énergétique, nous avons constaté que les deux états (triplet et singulet) ont le même niveau d'énergie au début de la réaction, confirmant ainsi que l'état triplet et l'état singulet sont dégénérés. A partir du réactif (voir Figure 6.4), la première étape qui consiste à

transférer un proton de la molécule d'eau proche de l'azote 9 vers O_2 se passe avec une même barrière d'énergie de 9.1 kcal/mol. Ceci donne un intermédiaire (Int_1) moins stable que le réactif avec une énergie de 3.7 kcal/mol dans les deux états électroniques. Ensuite un deuxième transfert d'électron peut se faire de l'azote 9 vers OH pour reformer la molécule d'eau avec une barrière d'énergie de 14.3 kcal/mol dans l'état singulet couche ouverte et au même niveau d'énergie pour l'état triplet. Cette étape de la réaction donne le deuxième intermédiaire (Int_2) qui est plus stable que le réactif avec le même niveau d'énergie de -7.1 kcal/mol pour l'état singulet couche ouverte et l'état triplet. Par la suite, le radical OOH dans Int_2 (voir Figure 6.2) prend un hydrogène de la deuxième molécule d'eau qui est au-dessus du substrat avec une barrière d'énergie de 35.0 kcal/mol (les deux états ont toujours le même niveau d'énergie). Cette étape permet de former H_2O_2 et OH radical dans Int_3 qui a une énergie de 10.8 kcal/mol au-dessus du réactif. A la fin de cette réaction, une liaison entre l'oxygène du OH et C_5 peut se faire avec une barrière d'énergie de 9.2 et 13.6 kcal/mol dans l'état singulet couche ouverte et triplet, respectivement. Ceci nous permet de former le produit final qui est le 5-hydroxyisourate avec des niveaux d'énergie complètement différents pour les deux états électroniques (-26.8 et 22.1 kcal/mol dans le cas des états singulet et triplet, respectivement). La Figure 6.4 présente le diagramme énergétique du chemin réactionnel. Jusqu'à Int_3 , les deux électrons sont éloignés et situés sur des espèces différentes. A la fin de la réaction, les deux électrons sont attirés et une séparation des surfaces d'énergie donne lieu à un état triplet ayant un niveau d'énergie plus haut que l'état singulet. Ainsi, le produit 5-hydroxyisourate dans son état singulet est plus stable que dans l'état triplet par une énergie de 22.1 kcal/mol. Dans ce dernier cas, la réaction est réalisable seulement dans l'état singulet couche ouverte. A la fin de la réaction, l'état singulet pour des couches d'orbitales moléculaires ouvertes ou fermées est le même.

6.4.3. Aspect électronique

Le Tableau 6.4 regroupe les résultats obtenus pour diverses densités de spin du réactif, des intermédiaires et du produit. Cette table montre bien que dans le réactif il y a un électron non apparié sur O_2 et un autre sur le substrat, il y a donc bien transfert d'électron du dianion 3-7 vers le dioxygène. Dans Int_1 et Int_2 , ces densités électroniques sont conservées aux mêmes positions. Ceci montre qu'il y a un transfert de proton du substrat vers O_2 dans ces deux étapes. Dans Int_3 , la densité électronique sur le substrat est conservée mais l'électron de OOH vient sur le OH, d'où le transfert d'hydrogène dans cette étape. Les valeurs de densité électronique du produit, montrent que tous les électrons s'attirent et dans ce cas l'état singulet couche ouverte ou fermée est le même.

Pour confirmer le transfert de proton dans la première et la deuxième étape de la réaction, nous avons calculé les charges de Mulliken du réactif, de chaque minimum et du produit (voir Tableau 6.5). Dans le cas du réactif, la charge totale de O_2 est d'environ -1. Elle diminue après la première étape, ceci confirme que dans la première étape il y a transfert du proton de la première molécule d'eau vers la molécule de dioxygène. Simultanément, la charge de -1 du groupement OH de la première molécule d'eau dans Int_2 est réduite pour le troisième intermédiaire (Int_3) assurant un transfert de proton de l'azote 9 vers le radical OH. De la même manière, la charge

6.4. MÉCANISME D'ACTION AVEC DEUX MOLÉCULES D'EAU

Atomes	Réactif	Int ₁	Int ₂	Int ₃	Produit
N ₁	-0.028	-0.026	-0.024	-0.023	0.000
H ₁	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C ₂	0.003	0.000	0.011	0.011	0.000
O ₂	0.042	0.041	0.025	0.022	0.000
N ₃	0.092	0.082	0.000	-0.008	0.000
C ₄	0.057	0.031	0.022	-0.001	0.000
C ₅	0.233	0.301	0.309	0.334	0.000
C ₆	-0.028	-0.035	-0.027	-0.029	0.000
O ₆	0.089	0.097	0.104	0.107	0.000
N ₇	0.462	0.421	0.431	0.415	0.000
C ₈	-0.052	-0.044	-0.049	-0.051	0.000
O ₈	0.153	0.157	0.163	0.165	0.000
N ₉	-0.024	-0.028	0.032	0.056	0.000
H ₉	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
O ^{W2}	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000
H ₁ ^{W2}	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
H ₂ ^{W2}	0.000	0.011	0.013	0.000	0.000
O ₁ ^{O2}	-0.460	-0.343	-0.308	0.000	0.000
O ₂ ^{O2}	-0.543	-0.670	-0.704	0.001	0.000
H ₁ ^{W1}	0.001	0.000	0.001	-0.002	0.000
O ^{W1}	0.000	0.000	-0.002	-1.034	0.000
H ₂ ^{W1}	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000

TAB. 6.4.: Densités de spin des différentes structures du chemin réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3.

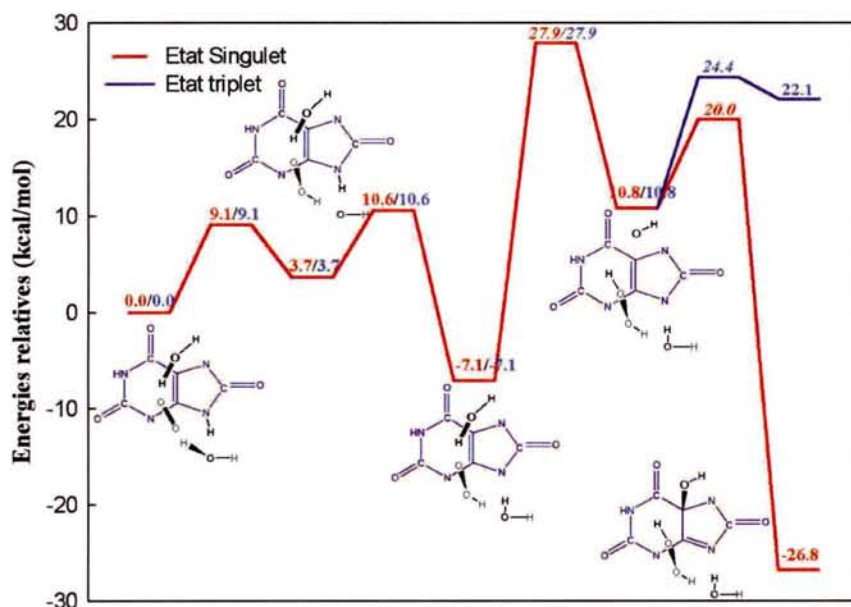


FIG. 6.4.: Diagramme énergétique du chemin réactionnel avec deux molécules d'eau.

totale du groupement OH correspondant à la deuxième molécule d'eau dans Int₃ est zéro, ce qui confirme la présence d'un OH radicalic pouvant s'ajouter au substrat.

6.5. Mécanisme d'action avec une molécule d'eau

6.5.1. Aspect géométrique

De la même manière que lors du traitement du changement de géométrie du réactif avec deux molécules d'eau, nous avons examiné les liaisons hydrogène qui existent dans le site actif lorsqu'une seule molécule d'eau est prise en compte : celle située au-dessus du réactif et qui est en position idéale pour former le futur groupement hydroxyle du produit final. Les Tableaux 6.6 et 6.7 rassemblent respectivement les variations des longueurs de liaisons et des angles le long du chemin réactionnel qui a été déterminé. Concernant la géométrie du substrat, les liaisons hydrogène entre ce dernier et le site actif sont les mêmes que celles obtenues avec les géométries incluant deux molécules d'eau. Le changement des valeurs des liaisons N₉-H₉ et H₉-O₁^{O2} montre que l'hydrogène de l'azote 9 est en interaction directe avec la molécule de dioxygène. Simultanément, la modification des longueurs O₂^{O2}-H₁^{W1} et H₁^{W1}-O^{W1} prouve qu'il y a un transfert d'hydrogène vers le groupement OOH. A partir du même tableau, nous avons trouvé que la liaison entre O^{W1} et C₅ se forme à la fin de réaction (voir Figures 6.5 et 6.6).

6.5. MÉCANISME D'ACTION AVEC UNE MOLÉCULE D'EAU

Atomes	Réactif	Int ₁	Int ₂	Int ₃	Produit
N ₁	-0.137	-0.148	-0.147	-0.149	-0.165
H ₁	0.186	0.185	0.179	0.179	0.185
C ₂	0.340	0.338	0.335	0.333	0.356
O ₂	-0.471	-0.466	-0.512	-0.515	-0.502
N ₃	-0.371	-0.382	-0.440	-0.438	-0.461
C ₄	0.091	0.093	0.174	0.167	0.072
C ₅	-0.307	-0.313	-0.341	-0.342	0.168
C ₆	0.395	0.393	0.390	0.385	0.288
O ₆	-0.423	-0.430	-0.450	-0.453	-0.400
N ₇	-0.237	-0.263	-0.298	-0.315	-0.647
C ₈	0.286	0.273	0.329	0.326	0.384
O ₈	-0.352	-0.369	-0.404	-0.401	-0.449
N ₉	-0.058	-0.121	-0.471	-0.433	-0.370
H ₉	0.234	0.297	0.319	0.299	0.285
O ^{W2}	-0.537	-0.850	-0.518	-0.503	-0.490
H ₁ ^{W2}	0.194	0.157	0.192	0.187	0.191
H ₂ ^{W2}	0.234	0.292	0.247	0.261	0.246
O ₁ ^{O2}	-0.451	-0.100	-0.056	-0.282	-0.257
O ₂ ^{O2}	-0.406	-0.275	-0.218	-0.295	-0.290
H ₁ ^{W1}	0.259	0.215	0.207	0.258	0.254
O ^{W1}	-0.511	-0.458	-0.457	-0.252	-0.402
H ₂ ^{W1}	0.206	0.224	0.229	0.258	0.283

TAB. 6.5.: Charges atomiques de Mulliken pour les différentes structures du chemin réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3.

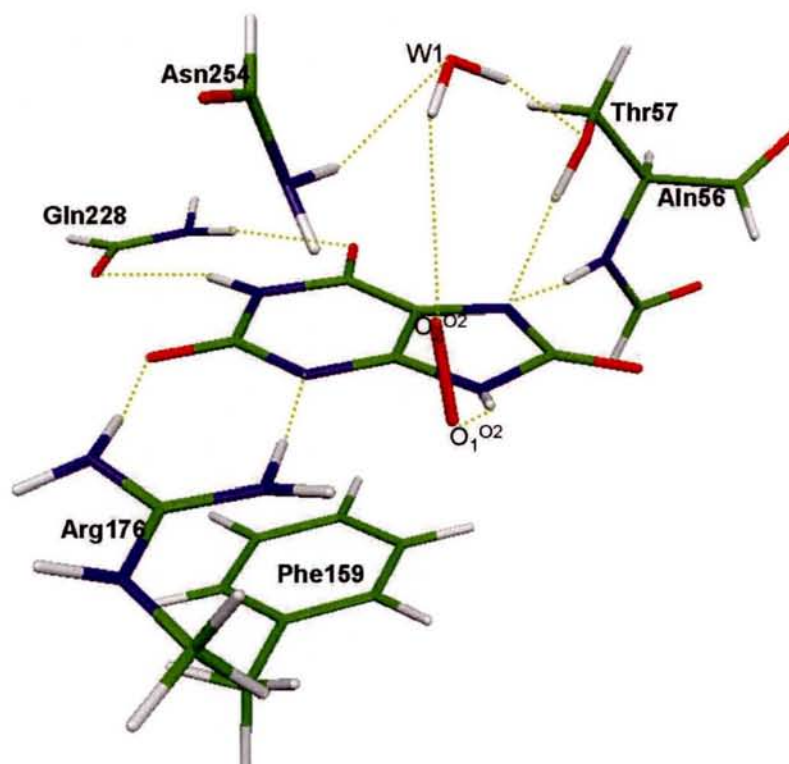


FIG. 6.5.: Positionnement des réactifs (dianion 3-7, molécule d'eau W1 et dioxygène) à l'intérieur du site actif de 2UOX (optimisation PM3).

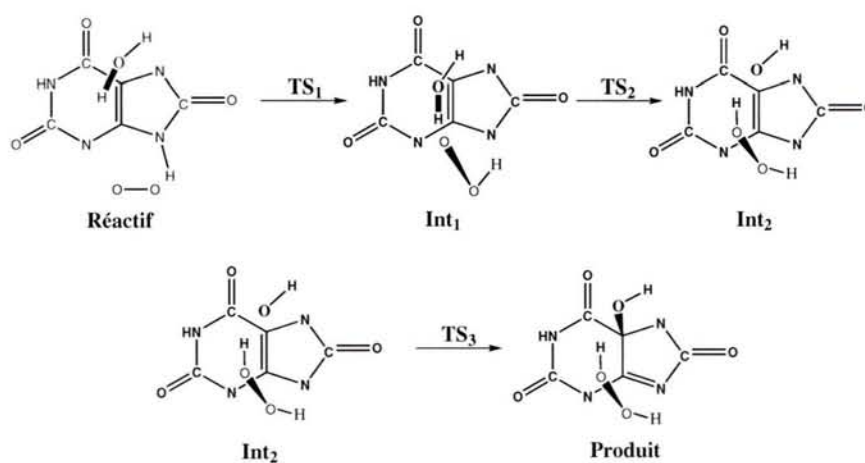


FIG. 6.6.: Chemin réactionnel avec une molécule d'eau.

6.5. MÉCANISME D'ACTION AVEC UNE MOLÉCULE D'EAU

	Réactif	TS ₁	Int ₁	TS ₂	Int ₂	TS ₃	Produit
H ₁ -N ₁	1.001	1.001	1.001	1.001	1.001	1.001	1.003
N ₁ -C ₂	1.425	1.426	1.423	1.423	1.424	1.426	1.435
C ₂ -O ₂	1.236	1.242	1.249	1.250	1.250	1.250	1.246
C ₂ -N ₃	1.417	1.405	1.400	1.399	1.396	1.394	1.390
N ₃ -C ₄	1.340	1.356	1.376	1.378	1.381	1.381	1.385
C ₄ -C ₅	1.443	1.447	1.454	1.454	1.456	1.463	1.542
C ₄ -N ₉	1.407	1.383	1.364	1.364	1.369	1.357	1.323
C ₅ -C ₆	1.451	1.447	1.442	1.441	1.440	1.447	1.537
C ₅ -C ₆	1.220	1.234	1.236	1.240	1.243	1.243	1.420
C ₅ -N ₇	1.371	1.374	1.371	1.371	1.372	1.376	1.474
N ₇ -C ₈	1.457	1.469	1.465	1.467	1.468	1.468	1.414
C ₈ -O ₈	1.217	1.218	1.220	1.220	1.219	1.219	1.221
C ₈ -N ₉	1.460	1.254	1.455	1.457	1.458	1.462	1.491
H _{C11} ¹⁷⁶ -N ₃	1.727	1.698	1.662	1.661	1.659	1.652	1.653
H _{C22} ¹⁷⁶ -O ₂	1.787	1.766	1.718	1.717	1.717	1.725	1.729
H _{c1} ²²⁸ -O ₆	2.594	2.572	2.533	2.535	2.537	2.823	2.540
O _δ ²²⁸ -H ₁	2.502	2.477	2.573	2.577	2.580	2.778	2.600
H _δ ⁵⁷ -N ₇	1.824	1.816	1.846	1.853	1.837	1.820	1.779
H _δ ⁵⁷ -N ₇	1.801	1.822	1.765	1.762	1.766	1.771	1.762
O _δ ⁵⁷ -H ₂ ^{W1}	1.825	1.823	1.860	1.859	1.855	1.847	1.814
H _{δ1} ²⁵⁴ -O ^{W1}	2.730	2.710	2.650	2.818	3.047	2.173	2.415
N ₉ -H ₉	1.027	1.266	1.725	1.768	1.804	1.847	1.937
H ₉ -O ₁ ^{O2}	1.787	1.288	0.986	0.980	0.969	0.967	0.959
O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2}	1.262	1.265	1.266	1.335	1.482	1.480	1.469
O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1}	4.072	4.139	1.854	1.054	0.949	0.950	0.958
H ₁ ^{W1} -O ^{W1}	0.954	0.955	0.961	1.037	1.812	1.812	1.862
H ₂ ^{W1} -O ^{W1}	0.966	0.963	0.960	0.958	0.949	0.950	0.966
O ^{W1} -C ₅	3.870	3.851	3.968	4.128	4.276	2.378	1.432

TAB. 6.6.: Variations de quelques distances dans le chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3 (distance en angströms).

CHAPITRE 6. CHEMINS RÉACTIONNELS DE L'OXYDATION DU DIANION URATE
DANS L'URATE OXYDASE 2UOX

	Réactif	TS ₁	Int ₁	TS ₂	Int ₂	TS ₃	Produit
N _{C1} ¹⁷⁶ -H _{C11} ¹⁷⁶ -N ₃	177.9	175.9	173.1	173.1	172.8	172.5	170.9
N _{C2} ¹⁷⁶ -H _{C22} ¹⁷⁶ -O ₂	175.4	175.0	175.9	176.1	176.0	176.2	175.5
O ₅ ²²⁸ -H ₁ ²²⁸ -N ₁	167.5	173.2	165.7	166.5	166.6	154.1	175.7
N ₁ ²²⁸ -H _{C1} ²²⁸ -O ₆	173.4	171.4	173.1	173.0	173.3	172.5	173.6
O ₇ ⁵⁷ -H ₇ ⁵⁷ -N ₇	172.2	171.8	170.1	171.4	171.6	173.9	157.6
N ₇ ⁵⁷ -H ₇ ⁵⁷ -N ₇	171.1	171.2	171.1	171.2	171.1	171.1	168.0
N ₆ ²⁵⁴ -H ₆₁ ²⁵⁴ -O ^{W1}	156.5	154.5	139.7	137.8	134.9	150.3	167.8
O ₇ ⁵⁷ -H ₂ ^{W1} -O ^{W1}	167.1	166.2	169.4	169.6	174.6	155.4	151.3
C ₄ -N ₉ -H ₉	122.5	120.7	124.2	115.8	114.1	104.3	100.5
N ₉ -H ₉ -O ₁ ^{O2}	157.6	165.5	175.6	165.2	166.1	165.1	151.8
H ₉ -O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2}	105.7	106.9	107.6	104.3	97.3	98.0	99.6
O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1}	118.3	109.7	127.2	108.9	97.0	97.8	99.9
O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1} -O ^{W1}	157.7	147.1	162.5	161.5	82.8	85.7	171.4
H ₁ ^{W1} -O ^{W1} -H ₂ ^{W1}	108.1	108.0	108.5	111.1	129.9	116.6	96.5
O ^{W1} -H ₂ ^{W1} -C ₅	71.5	72.5	67.7	65.4	58.4	91.1	107.0
H ₉ -O ₁ ^{O2} -O ₂ ^{O2} -H ₁ ^{W1}	10.3	10.0	7.3	97.1	156.2	116.2	57.8

TAB. 6.7.: Variations des angles dans le chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3 (angles en degrés).

Δ E	Réactif	TS ₁	Int ₁	TS ₂	Int ₂	TS ₃	Produit
Etat triplet	00.0	13.4	-2.4	35.2	20.1	43.5	24.2
Etat singulet	00.0	13.4	-2.4	35.2	20.1	35.6	-17.4

TAB. 6.8.: Energies relatives des différentes structures apparaissant dans le mécanisme réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3 (en kcal/mol).

6.5.2. Aspect énergétique

Le Tableau 6.8 regroupe les énergies relatives obtenues pour les minima et les états de transition du mécanisme du dianion 3-7 de l'acide urique avec une seule molécule d'eau. De même qu'avec le mécanisme à deux molécules d'eau, les valeurs d'énergies du réactif montrent qu'avec le mécanisme non assisté (une molécule d'eau), les états triplet et singulet couche ouverte ont les mêmes niveaux d'énergies.

A partir de la première structure obtenue (réactif) dans laquelle un électron a déjà été transféré du dianion vers O₂, une première étape qui consiste à transférer un proton de l'azote 9 vers O₂ peut se dérouler avec une même barrière d'énergie de 13.4 kcal/mol pour les états triplet et singulet. Ce transfert de proton permet de donner le premier intermédiaire (Int₁) qui est le OOH radical avec toujours une molécule d'eau. Cet intermédiaire a la même énergie de -2.4 kcal/mol par rapport au réactif dans ses états triplet et singulet. Après cette étape il y a un transfert d'hydrogène de la molécule d'eau vers OOH radical avec une même barrière d'énergie de 37.6 kcal/mol pour l'état triplet et l'état singulet. Cette étape donne un intermédiaire (Int₂) qui contient H₂O₂ et OH radical avec un niveau d'énergie de +20.1 kcal/mol pour les deux états (triplet et singulet) par rapport au réactif. Enfin, l'OH radical se fixe sur le C₅ du substrat pour former finalement le pro-

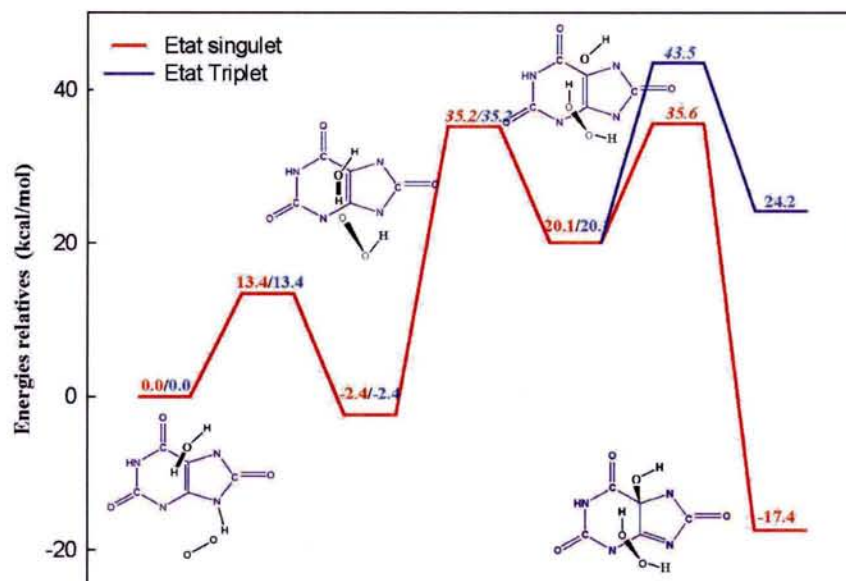


FIG. 6.7.: Diagramme énergétique du chemin réactionnel avec une molécule d'eau.

duit 5-hydroxyisourate. Cette étape possède une barrière d'énergie de 23.4 kcal/mol dans l'état triplet et de 15.5 kcal/mol dans l'état singulet couche ouverte. Le produit final a une énergie de +24.2 et -17.4 kcal/mol dans les états triplet et singulet, respectivement.

Selon la Figure 6.7, qui présente le diagramme énergétique du chemin réactionnel, nous pouvons observer la séparation de surface d'énergie qui intervient à partir de Int₂. Ceci nous permet de dire qu'à partir de Int₂, il y a addition radicalaire du radical OH avec le substrat pour former le produit final. Ainsi, le produit dans son état singulet (état fondamental) est plus stable que dans son état triplet (état excité) par une énergie de 41.6 kcal/mol.

6.5.3. Aspect électronique

Le Tableau 6.9 regroupe les diverses densités de spin pour le réactif, les intermédiaires et le produit. Dans le cas de la structure du réactif, on peut y reconnaître la séparation des électrons non appariés sur O₂ et le substrat. Dans Int₁, ces densités électroniques sont conservées à la même position. Ceci montre qu'il y a un transfert de proton du substrat vers O₂. Dans Int₂, la densité électronique sur le substrat est conservée mais la densité de spin excédentaire de OOH est transférée sur le radical OH, ce qui implique un transfert d'hydrogène dans cette étape entre OOH radical et H₂O pour former HOOH et OH radical. D'après l'analyse de la densité de spin du produit, nous pouvons remarquer que tous les électrons sont appariés et, dans ce cas, l'état singulet couche ouverte ou fermée est le même.

CHAPITRE 6. CHEMINS RÉACTIONNELS DE L'OXYDATION DU DIANION URATE
DANS L'URATE OXYDASE 2UOX

Atomes	Réactif	Int ₁	Int ₂	Produit
N ₁	-0.027	-0.024	-0.019	0.000
H ₁	0.000	0.000	0.001	0.000
C ₂	-0.003	0.012	0.014	0.000
O ₂	0.046	0.021	0.019	0.000
N ₃	0.116	-0.012	-0.016	0.000
C ₄	0.012	0.026	0.003	0.000
C ₅	0.300	0.293	0.302	0.000
C ₆	-0.026	-0.024	-0.019	0.000
O ₆	0.102	0.084	0.098	0.000
N ₇	0.430	0.442	0.442	0.000
C ₈	-0.047	-0.055	-0.060	0.000
O ₈	0.146	0.168	0.168	0.000
N ₉	-0.041	0.040	0.061	0.000
H ₉	0.001	0.011	0.000	0.000
O ₁ ^{O2}	-0.425	-0.330	-0.008	0.000
O ₂ ^{O2}	-0.571	-0.682	-0.100	0.000
H ₁ ^{W1}	0.000	0.000	0.011	0.000
O ^{W1}	0.000	0.000	-0.975	0.000
H ₂ ^{W1}	0.000	0.000	0.029	0.000

TAB. 6.9.: Densités de spin des différentes structures du chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3.

Pour confirmer le transfert de proton dans la première étape, nous avons également calculé les charges de Mulliken du réactif, de chaque minimum et du produit. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 6.10. Pour le réactif, la charge totale de O₂ est de -1 environ. Cette charge est réduite après la première étape. Ceci confirme que la première étape consiste en un transfert du proton de l'azote 9 vers la molécule de dioxygène. De la même manière, la charge totale de l'OH dans Int₂ est de zéro, ce qui correspond à un OH radical.

6.6. Comparaison entre les deux mécanismes

A la suite de cette étude sur le mécanisme assisté et non assisté de l'oxydation du dianion 3-7 de l'acide urique catalysé par l'urate oxydase, nous nous sommes intéressés à la comparaison de ces deux mécanismes. Pour cela, nous avons représenté les variations des énergies le long des deux chemins de réaction possibles dans la même Figure 6.8. Nous constatons que le mécanisme assisté est légèrement plus favorable que le mécanisme non assisté car les états de transition et les intermédiaires décrivant ce premier mécanisme sont toujours plus bas en énergie que leurs équivalents respectifs dans le deuxième mécanisme. Nous remarquons aussi que dans les deux cas la barrière d'énergie correspondant au transfert d'un hydrogène de la molécule d'eau vers OOH radical est la plus haute des barrières. Ceci confirme les études cinétiques faites par Tipton *et al.*,⁷⁴ qui ont montré que la première partie de réaction (transfert de proton) se passe plus rapidement que la deuxième partie (transfert d'hydrogène).

6.6. COMPARAISON ENTRE LES DEUX MÉCANISMES

Atomes	Réactif	Int ₁	Int ₂	Produit
N ₁	-0.148	-0.144	-0.148	-0.165
H ₁	0.190	0.182	0.180	0.186
C ₂	0.338	0.333	0.331	0.354
O ₂	-0.456	-0.517	-0.523	-0.505
N ₃	-0.348	-0.435	-0.437	-0.456
C ₄	0.078	0.176	0.167	0.059
C ₅	-0.320	-0.295	-0.351	0.164
C ₆	0.392	0.390	0.387	0.292
O ₆	-0.422	-0.450	-0.456	-0.402
N ₇	-0.268	-0.295	-0.307	-0.656
C ₈	0.272	0.319	0.324	0.379
O ₈	-0.358	-0.392	-0.388	-0.438
N ₉	-0.097	-0.460	-0.437	-0.362
H ₉	0.275	0.299	0.311	0.257
O ₁ ^{O2}	-0.426	-0.101	-0.322	-0.288
O ₂ ^{O2}	-0.375	-0.245	-0.184	-0.247
H ₁ ^{W1}	0.177	0.219	0.243	0.232
O ^{W1}	-0.433	-0.475	-0.348	-0.408
H ₂ ^{W1}	0.234	0.226	0.250	0.285

TAB. 6.10.: Charges atomiques de Mulliken pour les différentes structures du chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3.

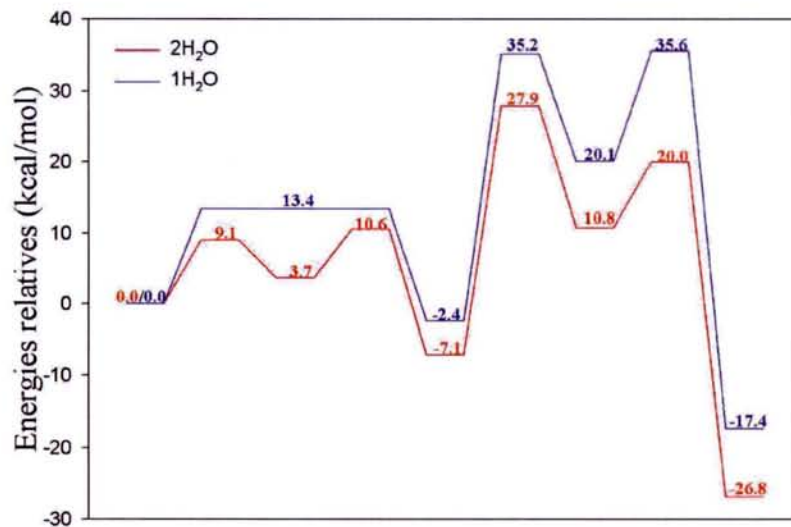


FIG. 6.8.: Comparaison des diagrammes énergétiques des deux mécanismes incluant une ou deux molécules d'eau.

6.7. Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre concernant l'étude du mécanisme d'action dans un modèle du site actif de l'urate oxydase nous ont montré que :

- L'état triplet est dégénéré avec l'état singulet couche ouverte jusqu'à la dernière étape de la réaction. En d'autres termes, aucun croisement de surface n'intervient pendant la réaction, ceci nous permet d'étudier tout le chemin réactionnel seulement avec l'état singulet.
- La réaction se passe principalement en trois étapes à savoir, un transfert de proton, un transfert d'hydrogène et la formation d'une liaison entre l'atome oxygène de la molécule d'eau qui est au-dessus du substrat et le carbone 5 du dianion urate.
- La comparaison des deux surfaces d'énergies pour les deux mécanismes avec une ou deux molécules d'eau montre que le mécanisme assisté est le plus favorable énergétiquement.

Après avoir déterminé les mécanismes réactionnels possibles de l'urate oxydase, il est important de pouvoir comprendre pourquoi certaines molécules, comme la 8-azaxanthine ou le 9-méthyl urate par exemple, sont des inhibiteurs de l'urate oxydase. Ceci sera l'objet du chapitre suivant.

7. Etude des inhibiteurs et autres ligands connus de l'urate oxydase

Depuis de nombreuses décennies, un certain nombre de ligands de l'urate oxydase sont connus. Parmi ces ligands il y a des substrats de l'urate oxydase tels que l'acide urique, et d'autres sont connus pour être des inhibiteurs de l'enzyme tel que la 8-azaxanthine⁶⁶ ou l'acide 9-méthyl urique.⁷⁶ Ces inhibiteurs sont par conséquent susceptibles de se fixer au sein du site actif de la protéine sans pour autant être oxydés par le dioxygène au sein de l'enzyme. L'objectif de ce chapitre est d'étudier les propriétés chimiques de ces ligands et de découvrir pourquoi certains d'entre eux ne réagissent pas avec l'urate oxydase.

7.1. Mise en œuvre

La géométrie des différentes espèces anioniques de la 8-azaxanthine ont été optimisées en utilisant différentes méthodes quantiques (PM3, HF, DFT) avec plusieurs bases. Pour estimer l'effet du solvant sur la stabilité relative des anions de la 8-azaxanthine, nous avons appliqué le modèle développé par l'Equipe de Chimie et Biochimie Théoriques de Nancy.⁴⁸

7.2. La 8-azaxanthine

Nous avons déjà vu dans le Chapitre 2 que la 8-azaxanthine était le ligand impliqué dans les structures cristallographiques publiées jusqu'ici.^{79,81} Dans ce chapitre nous aimerions trouver une réponse sur le pouvoir inhibiteur de la 8-azaxanthine sur l'enzyme, alors que l'acide urique est le substrat naturel. La seule différence entre les deux molécules est la présence d'un groupement CO en position 8 dans l'acide urique à la place d'un azote dans la 8-azaxanthine. Pour cela, la démarche d'étude que nous avons utilisée avec l'acide urique, va être reproduite pour la 8-azaxanthine :

- étude des différentes formes anioniques et neutres de la 8-azaxanthine ;
- étude des potentiels d'ionisation de ces différentes formes ;
- étude de la réactivité intrinsèque de la 8-azaxanthine ;
- étude de la stabilité relative de la 8-azaxanthine à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase ;
- étude des potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase ;

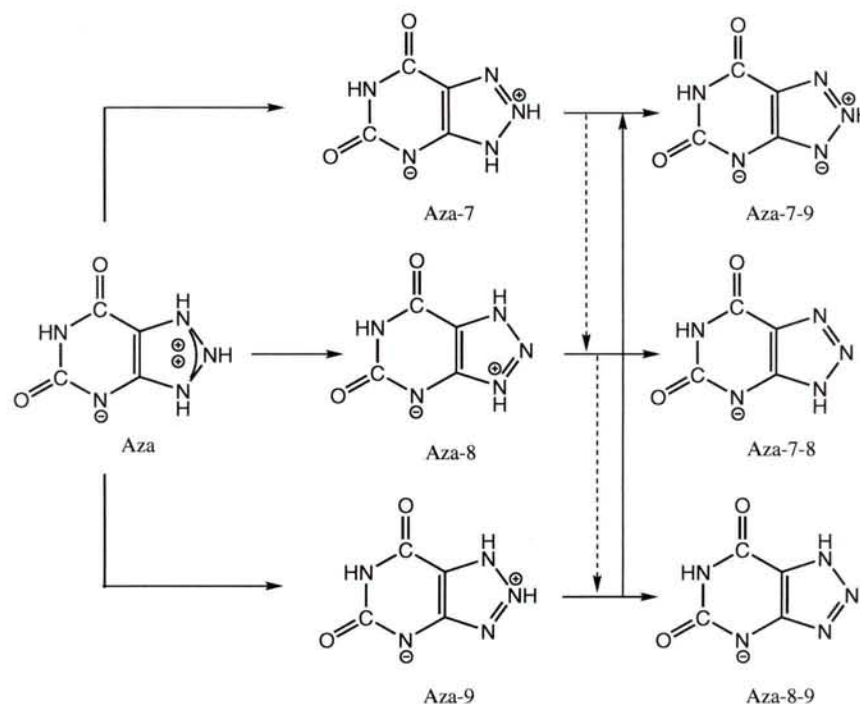


FIG. 7.1.: Structures des formes cationiques, neutres et anioniques dérivées à partir de la 8-azaxanthine déprotonée en position 3.

7.2.1. Stabilités relatives des formes anioniques

D'après la structure du site actif de l'urate oxydase ainsi que de ce qui a été vu dans les chapitres précédents concernant l'acide urique, nous allons partir de l'hypothèse que dans le site actif de l'urate oxydase, la 8-azaxanthine est toujours déprotonée en position 3 et protonée en position 1, c'est à dire que la 8-azaxanthine porte une charge négative sur l'azote 3. Concernant les positions 7 et 9, plusieurs possibilités peuvent être envisagées. Elles sont regroupées dans la Figure 7.1. A partir de la 8-azaxanthine cationique (Aza), il est possible de former trois 8-azaxanthine neutres : Aza-7, Aza-8 et Aza-9 en fonction de l'azote que l'on déprotonne. Enfin, à partir de ces trois formes neutres, il est possible d'envisager trois autres formes anioniques : Aza-7-9, Aza-7-8 et Aza-8-9 en fonction du site de deuxième déprotonation.

Les énergies relatives des formes Aza-7, Aza-8 et Aza-9 sont reportées dans le Tableau 7.1. D'après toutes les résultats donnés par les méthodes quantiques utilisées, c'est la forme Aza-8 qui est la plus stable. La forme Aza-7 est un peu moins stable d'environ 5 à 10 kcal/mol en phase gazeuse, alors que la forme Aza-9 est située en énergie plus de 20 kcal/mol au-dessus de Aza-8. En faisant le même calcul dans le solvant par deux méthodes différentes (PM3 et DFT), nous avons eu le même résultat qui confirme que la 8-azaxanthine protonée en positions 7 et 8 est la forme la moins stable parmi toutes avec une énergie de 30.3 et de 35.6 kcal/mol aux niveaux PM3 et B3LYP/6-31G**, respectivement. Ainsi, les résultats obtenus suggèrent que la formation

Méthode	Formes neutres		
	Aza-7	Aza-8	Aza-9
PM3	4.5	00.0	33.2
HF/6-31G**	3.7	00.0	29.7
B3LYP/6-31G**	9.2	00.0	24.6
B3LYP/6-31+G**	9.4	00.0	23.9
MP2//HF/6-31G**	15.4	00.0	24.4
PM3(Nancy)	6.3	00.0	30.3
B3LYP/6-31G**(Nancy)	25.7	00.0	35.6

TAB. 7.1.: Energies relatives des formes neutres de la 8-azaxanthine Aza-7, Aza-8 et Aza-9 (en kcal/mol).

Méthode	Monoanions		
	Aza-7-9	Aza-7-8	Aza-8-9
PM3	16.1	00.0	7.9
HF/6-31G**	10.6	00.0	11.8
B3LYP/6-31G**	6.7	00.0	7.2
B3LYP/6-31+G**	6.2	00.0	6.4
MP2//HF/6-31G**	4.5	00.0	5.1
PM3(Nancy)	13.7	00.0	6.9
B3LYP/6-31G**(Nancy)	3.6	00.0	5.1

TAB. 7.2.: Energies relatives des monoanions de la 8-azaxanthine Aza-7-9, Aza-7-8 et Aza-8-9 (en kcal/mol).

de l'état neutre de la 8-azaxanthine nécessite la déprotonation de N₈-H, puis celle de N₇-H et de N₉-H.

Dans le cas d'un enlèvement de deux protons sur le cycle à 5, nous remarquons que la charge totale de la 8-azaxanthine est de -1. Ceci nous ramène à considérer la 8-azaxanthine dans ce cas comme forme monoanionique. Les énergies relatives des formes monoanions Aza-7-8, Aza-7-9 et Aza-8-9 sont reportées dans le Tableau 7.2. Ces résultats montrent que le monoanion qui est protoné en position 9 est la forme la plus stable parmi toutes les formes monoanioniques. En tenant compte de l'effet du solvant par les méthodes PM3 et DFT, nous avons eu les mêmes résultats qui confirment que Aza-7-8 est la forme la plus stable.

7.2.2. Potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine et de ses anions

L'étude du potentiel d'ionisation de l'acide urique dans le chapitre 3 a montré que ce paramètre permet de décrire l'effet donneur d'électron du substrat et par là-même sa capacité de réagir avec le dioxygène lors de sa réaction d'oxydation. Nous avons donc étudié le potentiel d'ionisation de la 8-azaxanthine dans ses formes neutres et anioniques pour découvrir si ce ligand est capable ou non de fournir un électron à O₂ comme dans le cas de l'acide urique. Les Tableaux 7.3 et 7.4 rassemblent les résultats obtenus pour les formes neutres et les formes anioniques de la 8-

CHAPITRE 7. ETUDE DES INHIBITEURS ET AUTRES LIGANDS CONNUS DE
L'URATE OXYDASE

Méthode	Aza+	Formes neutres		
		Aza-7	Aza-8	Aza-9
PM3	302.0	189.7	183.8	184.3
HF/6-31G**	337.5	203.5	194.8	179.4
B3LYP/6-31G**	323.1	208.6	203.4	194.3
B3LYP/6-31+G**	314.7	203.3	198.4	189.7
B3LYP/6-31G**(Nancy)	176.8	152.9	147.0	139.6

TAB. 7.3.: Potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine et ses formes neutres déprotonées en position 3 (en kcal/mol).

Méthode	Monoanions		
	Aza-7-9	Aza-7-8	Aza-8-9
PM3	69.3	78.5	70.2
HF/6-31G**	76.4	85.9	77.9
B3LYP/6-31G**	83.4	89.9	83.7
B3LYP/6-31+G**	83.7	89.8	84.2
B3LYP/6-31G**(Nancy)	105.9	118.7	92.4

TAB. 7.4.: Potentiels d'ionisation des monoanions Aza-7-9, Aza-7-8 et Aza-8-9 de la 8-azaxanthine (en kcal/mol).

azaxanthine, respectivement. Ces tableaux montrent que la 8-azaxanthine protonée en positions 1, 7, 8 et 9 (charge partielle +2) a besoin de 314.7 kcal/mol (au niveau B3LYP/6-31+G**) pour pouvoir fournir un électron. Dans le cas de la 8-azaxanthine neutre Aza-7, Aza-8 et Aza-9, nous constatons en utilisant les mêmes méthodes de calcul que le produit de transfert d'électron est toujours instable, mais les énergies mises en jeu sont bien moindres et c'est la déprotonation en position 8 qui est la plus favorable pour la réaction de transfert d'un électron. Dans le cas des monoanions de la 8-azaxanthine, nous constatons d'après le Tableau 7.3 que les énergies relatives au transfert d'un électron pour les trois formes anioniques envisagées sont plus faibles que dans le cas de la 8-azaxanthine neutre. Parmi ces anions, les anions Aza-7-9 et Aza-8-9 ont des potentiels d'ionisation très proches, celui de l'Aza-7-9 étant légèrement inférieur à celui de l'Aza-8-9 : respectivement 69.3 et 70.2 kcal/mol par la méthode PM3 et respectivement 83.7 et 84.2 kcal/mol par la méthode B3LYP/6-31+G**. En faisant des calculs d'effet de solvant associés à une méthode DFT, nous constatons que l'effet du solvant sur l'énergie relative est important dans le sens d'une moins bonne facilité pour les anions de la 8-azaxanthine à perdre un électron. Dans ce dernier cas, c'est la forme Aza-8-9 qui possède le plus petit potentiel d'ionisation (92.4 kcal/mol). En comparant les potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine (neutres et monoanions) avec l'affinité électronique de O₂ reportée au Chapitre 3, nous pouvons remarquer que la 8-azaxanthine, contrairement à l'acide urique, n'est pas capable de céder un électron à O₂ quelque soit l'état de protonation de la 8-azaxanthine.

7.2. LA 8-AZAXANTHINE

	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	89.8	89.8	89.8	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4
III	34.5	34.5	34.5	32.5	32.5	32.5	32.7	32.7	32.7	30.7	30.7	30.7
IV	—	—	59.1	—	—	57.9	—	—	57.7	—	—	67.3
V	67.1	—	—	64.9	—	—	65.0	—	—	63.4	—	—
VII	—	—	14.4	—	—	15.5	—	—	15.0	—	—	26.2
VIII	—	132.1	—	—	128.6	—	—	129.0	—	—	126.6	—
X	—	104.4	104.4	—	106.5	106.5	—	102.0	102.0	—	100.0	100.0
XI	—	119.6	119.6	—	122.2	122.2	—	117.7	117.7	—	116.3	116.3
XII	64.3	—	—	64.6	—	—	63.9	—	—	72.2	—	—
XIV	19.5	19.5	19.5	21.7	21.7	21.7	20.8	20.8	20.8	30.2	30.2	30.2

TAB. 7.5.: Energies relatives, énergies relatives avec correction d'ordre zéro, enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour la 8-azaxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

7.2.3. Réactivité intrinsèque de la 8-azaxanthine dans le vide

Dans cette partie, nous étudions la réactivité intrinsèque du monoanion Aza-7-8 (protoné en position 9) de la 8-azaxanthine. Nous avons choisi en particulier cette forme car :

- c'est celle qui ressemble le plus, d'un point de vue structural, au dianion 3-7 de l'acide urique : protons sur les azotes 1 et 9, déprotonation des azotes 3 et 7.
- c'est la forme anionique la plus stable en phase gazeuse et en solution
- c'est la forme qui est la plus susceptible de s'insérer à l'intérieur de notre modèle de site actif qui est chargé +1*.

Pour notre étude, nous nous sommes appuyé sur l'hypothèse 3 (Hyp3) qui consiste à transférer un hydrogène de la 8-azaxanthine vers O₂ (voir Chapitre 4). Les six chemins possibles de la réactivité intrinsèque de la 8-azaxanthine correspondant aux hypothèses A et B reportés pour l'acide urique sont rassemblés dans les Figures 7.2 et 7.3. Ces figures montrent que le transfert de proton ne peut se faire qu'à partir de l'azote 9 vu l'absence de proton sur l'azote 7. Il y a deux possibilités de fixation des groupements OH et OOH, soit sur le carbone 5 (hypothèse A), soit sur le carbone 4 (hypothèse A').

La méthode DFT avec la base B3LYP/6-31+G** a été utilisée pour étudier la réactivité intrinsèque de la 8-azaxanthine Aza-7-8. Les énergies obtenues sont indiquées dans les Tableaux 7.5 et 7.6. Dans la première hypothèse qui consiste à fixer le groupement OH final sur le carbone 5 (Hypothèse A), nous pouvons remarquer que le transfert d'un électron du substrat vers O₂ donne l'intermédiaire (II) avec une énergie de 89.8 kcal/mol. Ensuite, le transfert de proton de la 8-azaxanthine vers O₂ peut se faire pour donner l'intermédiaire (III) avec une énergie de 34.5 kcal/mol au-dessus des réactifs. A partir de cet intermédiaire, trois chemins sont possibles pour arriver au produit final qui est le 5-hydroxyiso-8-azaxanthine.

*A notre connaissance, il n'existe pas de données publiées concernant les pKas éventuels de l'azaxanthine. Il n'est donc pas aisé de prévoir exactement quelle est la forme neutre ou anionique de la 8-azaxanthine existante en solution et à pH physiologique.

CHAPITRE 7. ETUDE DES INHIBITEURS ET AUTRES LIGANDS CONNUS DE
L'URATE OXYDASE

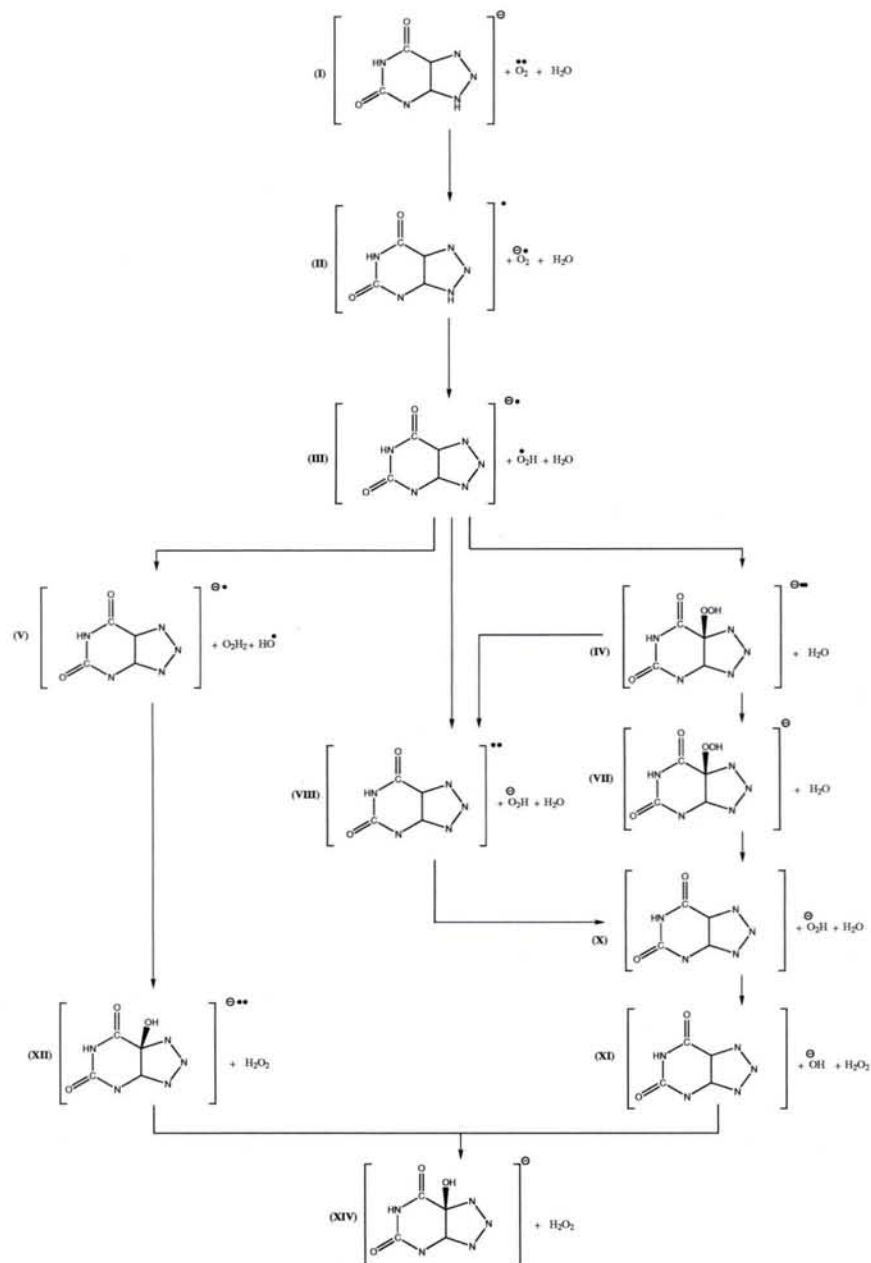


FIG. 7.2.: Réactivité de la 8-azaxanthine selon l'hypothèse A : transfert du proton H9 vers O_2 et formation du 5-hydroxyiso-8-azaxanthine.

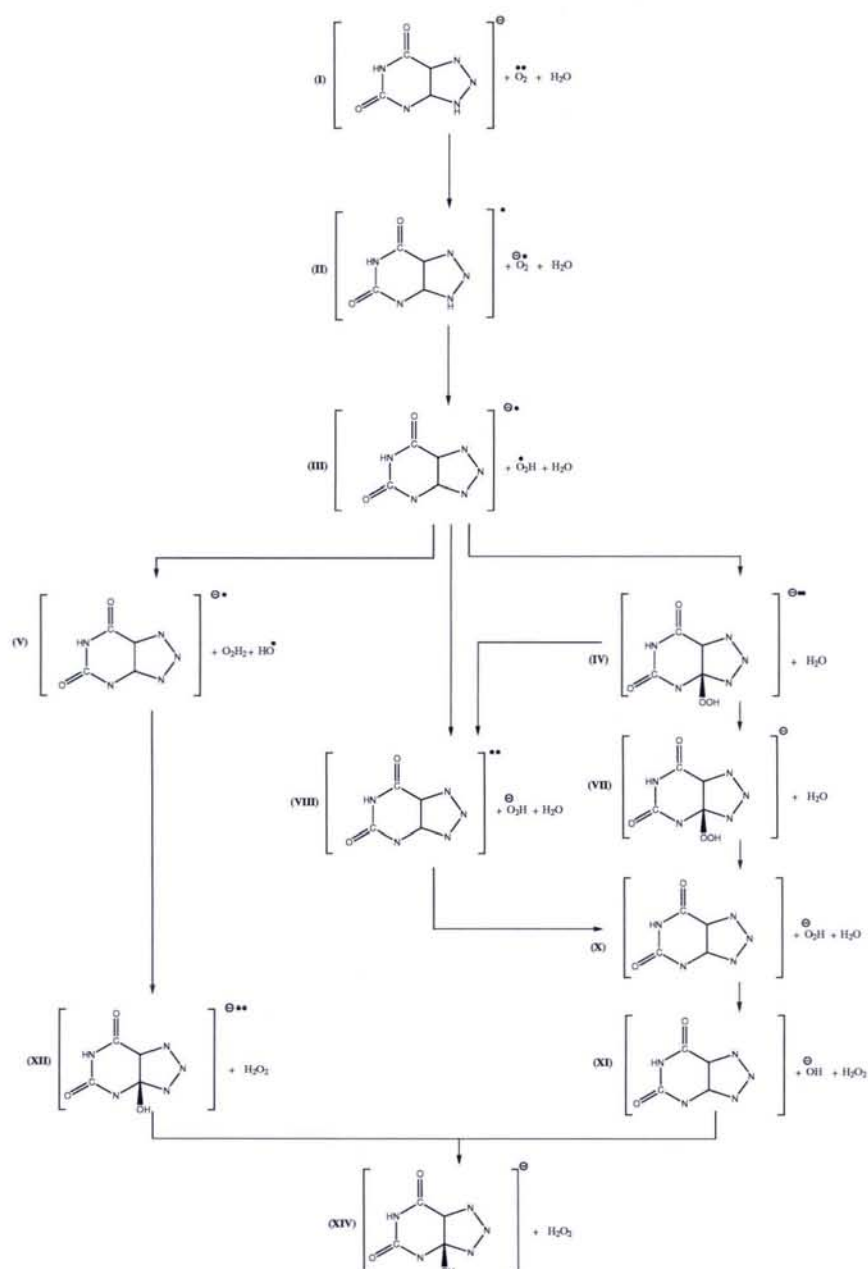


FIG. 7.3.: Réactivité de la 8-azaxanthine selon l'hypothèse A' : transfert du proton H9 vers O_2 et formation du 4-hydroxyiso-8-azaxanthine.

CHAPITRE 7. ETUDE DES INHIBITEURS ET AUTRES LIGANDS CONNUS DE
L'URATE OXYDASE

	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	89.8	89.8	89.8	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4	89.4
III	34.5	34.5	34.5	32.5	32.5	32.5	32.7	32.7	32.7	30.7	30.7	30.7
V	67.1	—	—	64.9	—	—	65.0	—	—	63.4	—	—
VI	—	—	64.0	—	—	63.8	—	—	63.8	—	—	72.8
VIII	—	132.1	—	—	128.6	—	—	129.0	—	—	126.6	—
IX	—	—	26.3	—	—	26.3	—	—	26.1	—	—	36.6
X	—	104.4	104.4	—	106.5	106.5	—	102.0	102.0	—	100.0	100.0
XI	—	119.6	119.6	—	122.2	122.2	—	117.7	117.7	—	116.3	116.3
XIII	68.0	—	—	68.2	—	—	67.5	—	—	75.9	—	—
XV	28.2	28.2	28.2	29.9	29.9	29.9	29.0	29.0	29.0	38.5	38.5	38.5

TAB. 7.6.: Energies relatives, énergies relatives avec correction d'ordre zéro, enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour la 8-azaxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

- Le premier chemin consiste à fixer directement OOH radical sur C5 pour donner l'intermédiaire 5-hydroperoxyiso-8-azaxanthine (IV). Cet intermédiaire a une énergie de déstabilisation de 59.1 kcal/mol. Après il y aura un passage de l'état triplet vers l'état singulet permettant la diminution de l'énergie jusqu'à 14.4 kcal/mol. Ensuite, le groupement OOH va se séparer du substrat pour former l'intermédiaire X avec une augmentation d'énergie jusqu'à 104.4 kcal/mol. Puis un transfert de proton de la molécule d'eau s'effectue pour former H₂O₂ et OH⁻ avec une énergie de déstabilisation de 119.6 kcal/mol (XI). Enfin, le OH⁻ se fixe sur le carbone 5 pour donner le produit (XIV) qui a une énergie de déstabilisation de 19.5 kcal/mol par rapport aux réactifs.
- Dans le deuxième chemin, les deux premières étapes sont les mêmes que pour la première réactivité (I→II→III). Ensuite, il y a transfert d'électron de OOH vers le substrat et cette étape se passe avec une énergie de 132.1 kcal/mol (VIII). Puis, le passage de l'état triplet à l'état singulet sur le même intermédiaire (X) se fait avec une énergie de 104.4 kcal/mol. Sur ce dernier, un transfert de proton peut se faire pour former H₂O₂ avec une énergie de 83.5 kcal/mol (XI). Enfin, à partir de cet intermédiaire, le produit final qui est 5-hydroxyiso-8-azaxanthine (XIV) est construit. Ce produit a une énergie de 19.5 kcal/mol plus haute que (I).
- Pour le troisième chemin qui consiste en un déplacement d'hydrogène de la molécule d'eau vers OOH radical, celui-ci peut se faire avec une énergie de 67.1 kcal/mol. La fixation du OH sur le carbone 5 permet d'obtenir le 5-hydroxyiso-8-azaxanthine dans son état triplet (XII). Cet intermédiaire a une énergie de 64.3 kcal/mol. Le passage de l'état triplet à l'état singulet permet de donner le produit final qui a une énergie de 19.5 kcal/mol.

Une deuxième possibilité de mécanisme consiste à transférer un proton de l'azote 9 sur O₂. Les mêmes chemins peuvent être observés, mais le produit obtenu est alors le 4-hydroxyiso-8-azaxanthine au lieu du 5-hydroxyiso-8-azaxanthine. Ceci a été bien détaillé lorsque nous avons étudié la réactivité intrinsèque du monoanion 3 de l'acide urique. Cette possibilité nous permet d'obtenir le produit 4-hydroxyiso-8-azaxanthine avec une énergie de 28.2 kcal/mol au-dessus des

Méthode	Formes neutres		
	Aza-7	Aza-8	Aza-9
PM3	12.8	11.0	00.0
B3LYP/6-31G**//PM3	25.5	31.4	00.0
B3LYP/6-31+G**//PM3	23.9	30.7	00.0

TAB. 7.7.: Energies relatives des formes neutres de la 8-azaxanthine par rapport à la forme Aza-9 (en kcal/mol).

réactifs initiaux.

En comparant les deux produits qui sont 5-hydroxyiso-8-azaxanthine et 4-hydroxyiso-8-azaxanthine, nous constatons que la fixation de OH sur le carbone 5 donne le produit le plus stable qui est 5-hydroxyiso-8-azaxanthine. Dans les mêmes Tableaux 7.5 et 7.6, nous avons présenté les données thermodynamiques obtenues par les calculs de fréquences, où nous avons calculé les corrections des énergies relatives, les enthalpies et les énergies libres relatives. Ces résultats montrent que les énergies libres relatives (ΔG) des produits sont plus élevées par rapport aux énergies internes relatives (ΔE). Cependant, l'aspect global des chemins réactionnels ne varie pas que l'on s'intéresse aux ΔE ou aux ΔG . En comparant la réactivité intrinsèque de la 8-azaxanthine par rapport à la réactivité intrinsèque de l'acide urique, nous pouvons constater que le produit final est instable par rapport au réactif. Ceci peut expliquer pourquoi la 8-azaxanthine déprotonée en N7 et N3 ne peut pas former un produit stable par rapport au réactif.

7.2.4. Stabilité relative de la 8-azaxanthine dans un modèle de site actif

L'étude de la stabilité des différentes formes envisagées de la 8-azaxanthine a été réalisée pour déterminer la forme la plus stable dans le site actif. Pour réaliser ce travail, nous avons calculé l'énergie d'interaction entre le substrat et le site actif pour chaque forme (voir Figure 7.4). Parmi les trois formes neutres Aza-7, Aza-8 et Aza-9, nous remarquons que la 8-azaxanthine déprotonée en position 9 est la forme la plus stable dans le site actif (voir Tableau 7.7). Dans le cas des monoanions de la 8-azaxanthine, le Tableau 7.8 permet de constater que le monoanion qui est déprotoné en positions 7 et 9 (Aza-7-9) correspond à la forme la plus stable dans le site actif de l'urate oxydase. Ainsi, alors que Aza-7-9 n'est pas la forme la plus stable de l'anion 8-azaxanthine (3.6 kcal/mol plus haut que la forme Aza-7-8 d'après nos calculs selon B3LYP/6-31G**(Nancy)), c'est cette forme qui est la plus stable dans le site actif de l'urate oxydase, de 5.0 à 9.0 kcal/mol plus favorable que Aza-7-8.

7.2.5. Potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine à l'intérieur du site actif

Après l'étude de la stabilité relative des formes anioniques de la 8-azaxanthine dans l'urate oxydase, nous étudions le potentiel d'ionisation de la 8-azaxanthine à l'intérieur du site actif de

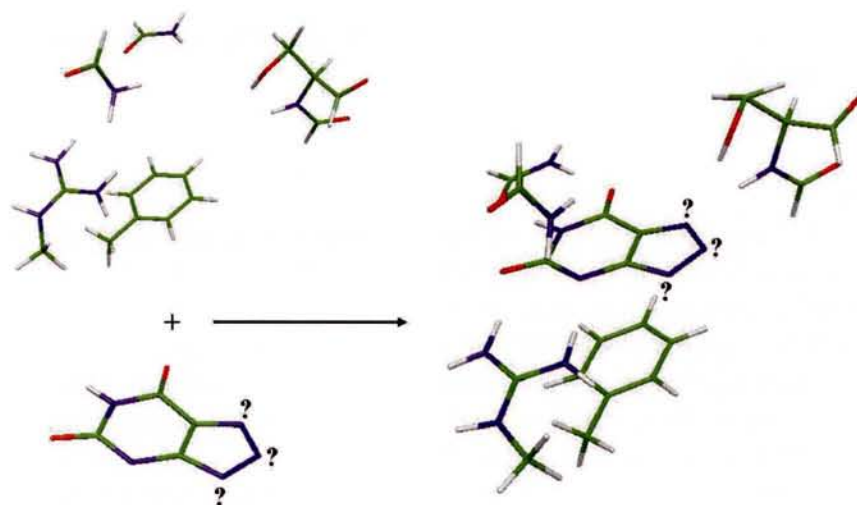


FIG. 7.4.: A la recherche des états de protonation de la 8-azaxanthine à l'intérieur du site actif de 2UOX.

Méthode	Monoanions		
	Aza-7-9	Aza-7-8	Aza-8-9
PM3	-9.8	00.0	-6.0
B3LYP/6-31G**//PM3	-4.8	00.0	0.7
B3LYP/6-31+G**//PM3	-5.4	00.0	2.3

TAB. 7.8.: Energies relatives des monoanions de la 8-azaxanthine par rapport à la forme Aza-7-8 (en kcal/mol).

7.3. L'ACIDE 9-MÉTHYL URIQUE

Méthode	Formes neutres		
	Aza-7	Aza-8	Aza-9
PM3	259.8	257.2	247.3
B3LYP/6-31G**//PM3	243.2	240.6	236.5
B3LYP/6-31+G**//PM3	268.0	263.1	253.1

TAB. 7.9.: Potentiels d'ionisation des formes neutres de la 8-azaxanthine dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

Méthode	Monoanions		
	Aza-7-9	Aza-7-8	Aza-8-9
PM3	160.6	169.4	159.0
B3LYP/6-31G**//PM3	160.9	168.5	152.7
B3LYP/6-31+G**//PM3	169.6	176.2	161.7

TAB. 7.10.: Potentiels d'ionisation des monoanions de la 8-azaxanthine dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

UOX afin de le comparer à celui obtenu avec l'acide urique. Les résultats obtenus sont indiqués dans les Tableaux 7.9 et 7.10 où sont présentés les potentiels d'ionisation des états neutres et des états monoanioniques de la 8-azaxanthine, respectivement. Ces tableaux montrent que la 8-azaxanthine, dans son état neutre, peut donner un électron avec une énergie de déstabilisation d'environ 260 kcal/mol par la méthode B3LYP/6-31+G**//PM3. Dans le cas d'une forme anionique de la 8-azaxanthine, nous constatons aussi une énergie de déstabilisation très élevée des formes radicalaires par rapport au réactif. Ainsi, en comparant les résultats obtenus au Chapitre 5 concernant les potentiels d'ionisation de l'acide urique à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase, et notamment du potentiel d'ionisation du dianion 3-7, on constate que la 8-azaxanthine possède un potentiel d'ionisation bien supérieur au dianion 3-7 de l'acide urique, quelque soit la forme envisagée de la 8-azaxanthine. Ainsi, il est très peu probable que la réaction entre O₂ et l'azaxanthine soit initiée, tout simplement parce qu'il n'y a pas de transfert d'électron entre les deux espèces.

7.3. L'acide 9-méthyl urique

L'acide 9-méthyl urique est également un inhibiteur connu de l'urate oxydase.⁶⁶ De même que pour la 8-azaxanthine, nous avons étudié différents points concernant la réactivité de ce ligand afin de mieux comprendre pourquoi celui-ci n'est pas oxydé au sein de l'enzyme.

7.3.1. Stabilité relative des formes anioniques

Dans cette étude, les stabilités relatives des monoanions et des dianions ont été déterminées dans le vide et dans le solvant. Les Figures 7.5 et 7.6 montrent qu'il existe différentes formes anioniques pour le 9-méthyl urique. L'acide 9-méthyl urique a une structure semblable à celle

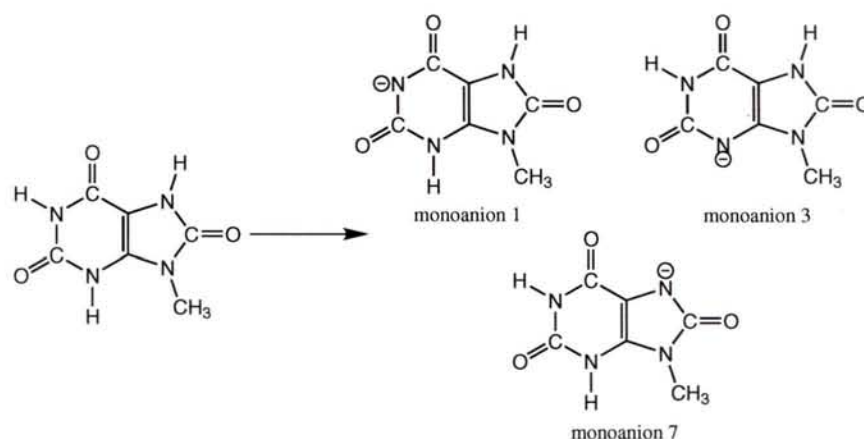


FIG. 7.5.: Structures possibles des monoanions de l'acide 9-méthyl urique.

Méthode	Monoanions		
	1	3	7
PM3	15.0	00.0	16.2
HF/6-31G**	24.3	00.0	24.7
B3LYP/6-31G**	22.2	00.0	18.9
B3LYP/6-31+G**	20.1	00.0	17.8
MP2//B3LYP/6-31G**	22.5	00.0	18.2
PM3(Nancy)	7.3	00.0	12.0
B3LYP/6-31G**(Nancy)	11.2	00.0	10.9

TAB. 7.11.: Energies relatives des monoanions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme monoanion 3 (en kcal/mol).

de l'acide urique, la seule différence entre les deux molécules est la présence d'un groupement méthyle en position 9 au lieu d'un hydrogène. Les énergies relatives des monoanions et des dianions sont données dans les Tableaux 7.11 et 7.12. Le monoanion 3 obtenu par la déprotonation de la position N_3 -H de l'acide 9-méthyl urique est la forme la plus stable parmi toutes. Ceci est en concordance avec les résultats obtenus dans le cas de l'acide urique (voir Chapitre 3). La stabilité relative des monoanions suit l'ordre $N_3^- > N_7^- > N_9^-$ selon la méthode B3LYP/6-31G**. En faisant le calcul par la même méthode dans le solvant, nous avons eu les mêmes résultats qui confirment que le monoanion 3 est la forme la plus stable parmi toutes. A partir de la formation des monoanions, nous pouvons construire tous les dianions possibles qui sont représentés dans la Figure 7.6. Le dianion $N_3^- N_7^-$ obtenu par la déprotonation de N_3 -H et N_7 -H est le plus stable parmi les dianions. La stabilité relative des dianions suit l'ordre : $N_3^- N_7^- > N_1^- N_7^- > N_1^- N_3^-$ (voir Tableau 7.12). Les calculs qui ont été effectués dans le solvant ont donné les mêmes résultats confirmant ainsi que le dianion $N_3 N_7$ est l'espèce la plus stable.

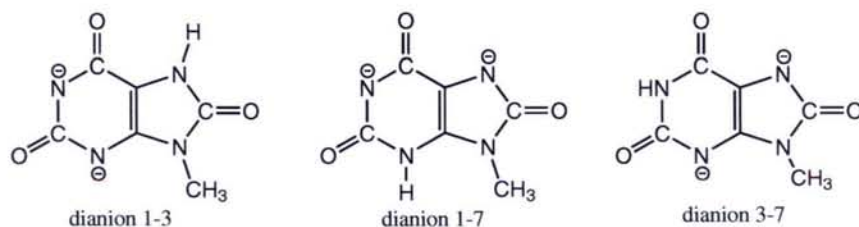


FIG. 7.6.: Structures des dianions du 9-méthyl urique.

Méthode	Dianions		
	1-3	1-7	3-7
PM3	9.1	4.6	00.0
HF/6-31G**	19.7	20.9	00.0
B3LYP/6-31G**	20.9	20.4	00.0
B3LYP/6-31+G**	18.1	18.3	00.0
MP2//B3LYP/6-31G**	22.2	23.0	00.0
PM3((Nancy))	15.1	13.8	00.0
B3LYP/6-31G**((Nancy))	13.7	11.9	00.0

TAB. 7.12.: Energies relatives des dianions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme dianionique 3-7 (en kcal/mol).

7.3.2. Potentiels d'ionisation de l'acide 9-méthyl urique et de ses anions

Nous avons étudié le potentiel d'ionisation des formes anioniques de l'acide 9-méthyl urique. Les résultats obtenus pour les monoanions et dianions sont indiqués dans les Tableaux 7.13 et 7.14, respectivement. Ces résultats montrent que la réaction permettant de donner un électron peut se faire avec une énergie de déstabilisation croissante en allant du N_7^- , N_3^- au N_1^- . Ce même ordre a été conservé dans le solvant. Par contre, dans le cas des dianions, cette réaction peut se faire avec une énergie de stabilisation dans l'ordre $N_3^-N_7^-$, $N_1^-N_3^-$ au $N_1^-N_7^-$ selon toutes les méthodes quantiques utilisées. Le dianion 3-7 présente la forme la plus favorable pour donner un électron parmi toutes les formes anioniques avec une énergie de -30.5 et de -59.3 kcal/mol aux niveaux PM3 et B3LYP/6-31G**, respectivement. En tenant compte de la fonction diffuse dans le calcul, nous avons constaté que cette fonction a un effet important sur le potentiel d'ionisation (-38.6 kcal/mol) comme dans le cas de l'acide urique. Dans le solvant, c'est encore la forme 3-7 qui est la plus favorable pour transférer un électron vers une molécule acceptrice. En tenant compte de l'affinité électronique de O_2 dans le solvant qui a été calculée par la méthode B3LYP/6-31G** (-91.5 kcal/mol), nous concluons que dans le cas d'un dianion 3-7, la réaction de transfert d'électron de l'acide 9-méthyl urique vers O_2 peut avoir lieu. Ainsi, le dianion 3-7 reste la forme la plus favorable parmi toutes les formes anioniques. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus avec l'acide urique.

Méthode	9-méthyl urique	Monoanions		
		1	3	7
PM3	185.8	84.2	75.4	65.8
HF/6-31G**	156.8	55.3	40.5	25.8
B3LYP/6-31G**	173.0	65.3	59.2	47.7
B3LYP/6-31+G**	184.6	79.1	72.5	61.6
MP2//6-31G**	172.4	64.1	59.6	49.2
B3LYP/6-31G**(Nancy)	128.6	106.9	102.8	93.2

TAB. 7.13.: Potentiels d'ionisation de l'acide 9-méthyl urique et de ses monoanions (en kcal/mol).

Méthode	Dianions		
	1-3	1-7	3-7
PM3	-28.2	-22.9	-30.5
HF/6-31G**	-73.7	-68.7	-77.1
B3LYP/6-31G**	-54.6	-54.2	-59.3
B3LYP/6-31+G**	-33.1	-33.3	-38.6
MP2//6-31G**	-51.4	-56.5	-61.5
B3LYP/6-31G**(Nancy)	77.3	75.3	67.2

TAB. 7.14.: Potentiels d'ionisation des dianions de l'acide 9-méthyl urique (en kcal/mol).

7.3.3. Stabilités relatives dans le site actif

Les Tableaux 7.15 et 7.16 regroupent les énergies relatives respectives des monoanions et dianions de l'acide 9-méthyl urique dans le site actif de l'urate oxydase. Dans le cas du monoanion, nous constatons que les monoanions 1 et 7 sont les formes les moins stables par une énergie de 12 et de 16.1 kcal/mol au niveau PM3. Ainsi, le monoanion 3 est la forme la plus stable parmi toutes. En utilisant la méthode DFT avec deux bases différentes nous avons les mêmes résultats. Par ailleurs, dans le cas d'un dianion, c'est le dianion 3-7 qui est la forme la plus stable dans le site actif selon la méthode PM3. Ceci est confirmé par la méthode DFT. En se référant aux résultats obtenus avec l'acide urique, nous pouvons confirmer que l'urate oxydase se lie préférentiellement avec le dianion 3-7 de l'acide 9-méthyl urique.

Méthode	Monoanions		
	1	3	7
PM3	12.3	00.0	16.1
B3LYP/6-31G**//PM3	17.4	00.0	18.9
B3LYP/6-31+G**//PM3	13.9	00.0	17.4

TAB. 7.15.: Energies relatives de stabilité des monoanions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme dianionique 3 dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

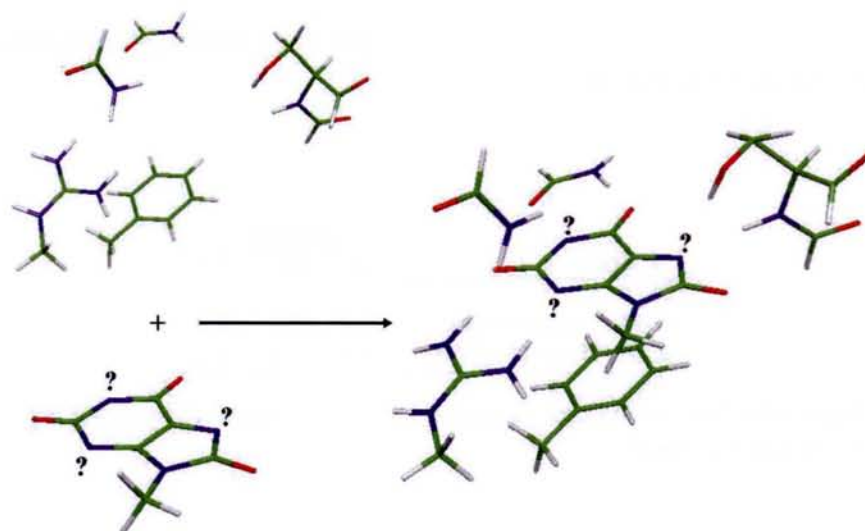


FIG. 7.7.: A la recherche des états de protonation de l'acide 9-méthyl urique à l'intérieur du site actif de 2UOX.

Méthode	Dianions		
	1-3	1-7	3-7
PM3	10.2	42.8	00.0
B3LYP/6-31G**//PM3	12.4	43.0	00.0
B3LYP/6-31+G**//PM3	10.0	41.1	00.0

TAB. 7.16.: Energies relatives de stabilité des dianions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme dianionique 3-7 dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

Méthode	Monoanions		
	1	3	7
PM3	176.2	156.9	142.5
B3LYP/6-31G**//PM3	179.2	150.0	136.4
B3LYP/6-31+G**//PM3	182.7	160.4	146.8

TAB. 7.17.: Potentiels d'ionisation des monoanions de l'acide 9-méthyl urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

Méthode	Dianions		
	1-3	1-7	3-7
PM3	65.8	58.4	63.3
B3LYP/6-31G**//PM3	63.4	56.6	58.4
B3LYP/6-31+G**//PM3	72.9	76.4	72.0

TAB. 7.18.: Potentiels d'ionisation des dianions de l'acide 9-méthyl urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

7.3.4. Potentiel d'ionisation des formes anioniques dans le site actif

Nous avons étudié précédemment les potentiels d'ionisation de l'acide 9-méthyl urique et de ses formes anioniques dans le vide et dans le solvant. Cependant, ces résultats doivent être comparés à ceux obtenus par des calculs réalisés dans le site actif de l'urate oxydase et l'ensemble des résultats obtenus avec l'acide urique. D'après le Tableau 7.17 qui regroupe les potentiels d'ionisation des trois formes anioniques de l'acide 9-méthyl urique dans le modèle de site actif de l'urate oxydase, la réaction permettant de donner un électron peut se faire avec une énergie croissante en allant de N_7^- , N_3^- à N_1^- . Ceci confirme les résultats que nous avons obtenus précédemment où nous avons étudié le potentiel d'ionisation dans le solvant. De même, pour les dianions dont les potentiels d'ionisation dans le site actif sont reportés dans le Tableau 7.18, la réaction qui permet de donner un électron amène une différence d'énergie positive entre le dianion et son radical monoanion, mais la valeur des énergies est plus faible que dans le cas du monoanion. Ainsi, les calculs réalisés dans le site actif ne changent pas l'ordre de probabilité des potentiels d'ionisation des dianions déjà trouvé dans le solvant : de $N_3^-N_7^-$, $N_1^-N_7^-$ à $N_1^-N_3^-$. Par conséquent, nous pouvons constater que le dianion 3-7 est le meilleur candidat pour donner un électron. En comparant ces résultats avec les potentiels d'ionisation de l'acide urique dans le site actif de l'urate oxydase, nous pouvons confirmer que le dianion 3-7 est la forme la plus favorable pour réagir avec O_2 . Toutefois, c'est l'absence de proton sur la position 9 du dianion 3-7 qui montre que l'acide 9-méthyl urique est un inhibiteur de l'urate oxydase.

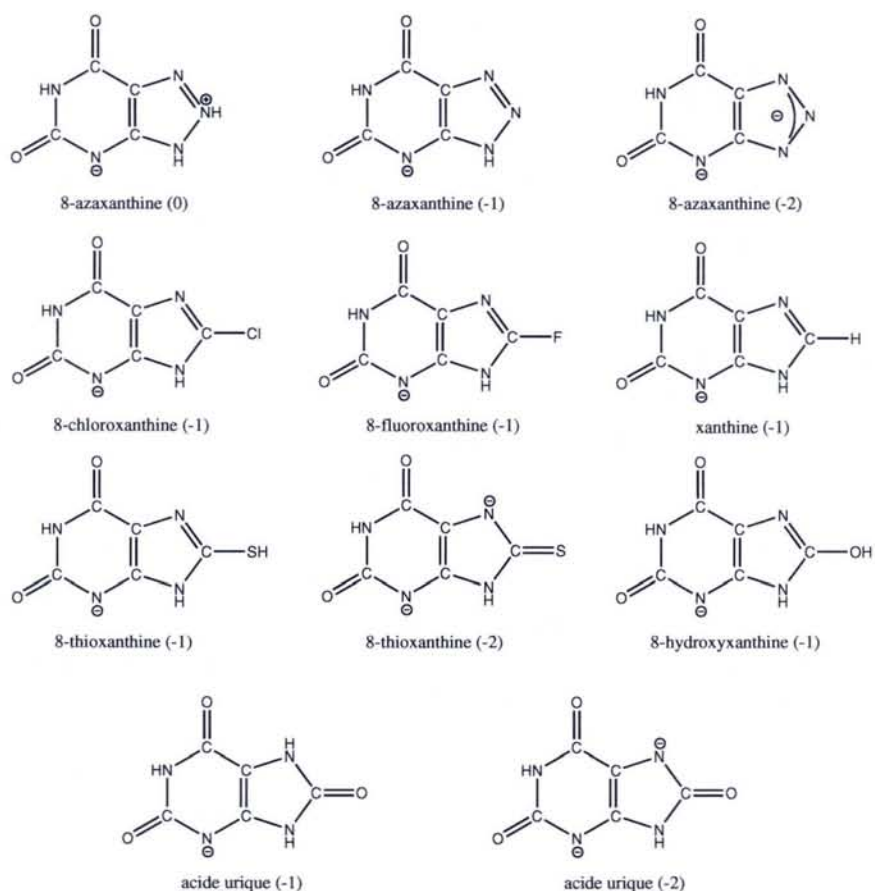


FIG. 7.8.: Quelques ligands connus de l'urate oxydase (charge moléculaire entre parenthèses).

7.4. Quelques autres ligands

La Figure 7.8 rassemble quelques ligands connus de l'urate oxydase pour lesquels nous avons entrepris une étude pour connaître leur éventuelle réactivité.

En premier lieu, nous avons pris en compte l'inhibiteur 8-azaxanthine sous différentes formes : en présence de deux protons sur l'azote 9 et 8 (charge totale nulle), en présence d'un seul proton sur l'azote 9 (charge -1), ou en absence de protons sur le cycle 5 (charge -2). En second lieu, nous avons choisi différentes molécules dérivées de la xanthine avec en position 8 des groupements : -Cl, -H, -F, -S ou -OH. Ces 5 ligands ont chacun une charge totale de -1. Dans le cas de la 8-thioxanthine, le dianion a aussi été pris en compte. Enfin, l'acide urique sous sa forme monoanion 3 et dianion 3-7 a aussi été ajouté à notre liste de ligands pour aider à la comparaison.

Nous avons étudié pour l'ensemble de ces ligands les énergies d'association de ceux-ci avec notre modèle de site actif de l'urate oxydase, deux molécules d'eau et le dioxygène. Ainsi, le Tableau 7.19 regroupe pour les méthodes PM3 et B3LYP ces énergies en fonction des différents

ligands considérés. La réaction d'association des différentes espèces est divisée en quatre grandes étapes reprises dans chaque colonne de ce tableau :

- Dans la première colonne, les énergies du ligand, du site actif, des deux H₂O et de O₂ ont été calculées séparément.
- Dans la deuxième colonne, le substrat a été placé dans le site actif. L'énergie calculée est donc à chaque fois la somme des énergies du site actif et du ligand ensemble plus les énergies séparées des deux molécules d'eau et du dioxygène.
- Dans la troisième colonne, le substrat et les deux molécules d'eau ont été insérés dans le site actif. L'énergie calculée correspond donc à l'énergie du dioxygène seul plus l'énergie du système site+ligand+eau.
- Dans la quatrième colonne l'énergie de l'ensemble moléculaire a été calculée.

La comparaison entre la première et la deuxième colonne de résultats du Tableau 7.19 indique l'affinité du ligand vis à vis du site actif. Nous pouvons remarquer que toutes les différences d'énergie sont négatives, ce qui implique que tous les ligands sont stabilisés dans le site actif. Toutefois, une différence dans les ordres de grandeurs des énergies dues aux interactions électrostatiques est observée : pour la 8-azaxanthine ceci peut être dû à sa charge nulle et celle du site actif qui est de +1 ; pour les 7 autres ligands leur charge est de -1 ; pour les ligands restants la charge est de -2, ce qui entraîne des interactions plus fortes. La troisième colonne indique l'affinité du système moléculaire site+ligand avec les molécules d'eau telles qu'elles ont été rapportées en cristallographie, nous remarquons que tous les ligands acceptent les deux molécules d'eau avec une différence d'énergie par rapport à la deuxième colonne d'environ 7 kcal/mol. Cette différence est due aux liaisons hydrogène qui apparaissent entre les molécules d'eau et le ligand ou le site actif. Enfin, la quatrième colonne de résultats donne une indication sur l'affinité de O₂ envers ce système. En comparant les colonnes 2 et 4, nous constatons qu'avec Cl, F, S et OH, il existe une énergie de déstabilisation d'environ 40 kcal/mol. Dans le cas de la 8-azaxanthine et du dianion 3-7 de l'acide urique, il existe au contraire une énergie de stabilisation d'environ 8 kcal/mol. A partir de ces résultats nous pouvons constater que O₂ ne peut être stable dans le site actif que dans le cas de la 8-azaxanthine et du dianion 3-7 de l'acide urique.

Pour confirmer ces résultats nous avons calculé les charges atomiques de Mülliken et les densités de spin. Le Tableau 7.20 présente les charges les plus importantes des ligands et de O₂. Avec la 8-azaxanthine, quelle que soit la forme de protonation, la charge sur O₂ est nulle, donc ce dernier (O₂) n'arrive pas à capter un électron. Par contre, pour les autres ligands nous observons que la charge sur O₂ est de -1 donc il y a transfert d'un électron du ligand vers O₂.

Les valeurs des densités de spin qui sont indiquées dans le Tableau 7.21 confirment que dans le cas de la 8-azaxanthine, il n'y a pas de transfert d'électron, par contre dans les autres cas il y a bien un transfert d'électron. Notons un cas particulier pour les ligands -F, -Cl ou -S en C8 de la xanthine : l'électron non apparié du ligand est positionné en N3 et non en N7 comme dans le dianion 3-7 de l'acide urique.

7.5. Conclusion

L'ensemble des résultats de ce chapitre montre que :

7.5. CONCLUSION

Méthode	Site+Sub +2H ₂ O+O ₂	[Site :Sub] +2H ₂ O+O ₂	[Site :Sub :2H ₂ O]+O ₂	[Site :Sub :2H ₂ O :O ₂]
8-azaxanthine				
PM3	00.0	-20.9	-35.2	-33.1
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-39.5	-72.1	-70.8
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-31.3	-56.4	-54.7
8-azaxanthine (monoanion)				
PM3	00.0	-91.7	-99.5	-95.9
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-122.9	-145.6	-144.1
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-110.3	-124.3	-122.4
8-fluoroxanthine				
PM3	00.0	-95.3	-103.7	-62.0
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-126.0	-149.3	-134.9
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-111.6	-125.9	-109.9
8-chloroxanthine				
PM3	00.0	-96.6	-104.4	-64.4
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-124.8	-147.6	-130.9
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-111.6	-125.2	-108.3
acide urique (monoanion 3)				
PM3	00.0	-87.3	-96.3	-64.9
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-118.3	-140.6	-131.7
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-103.0	-118.0	-106.5
8-hydroxyxanthine				
PM3	00.0	-99.1	-107.5	-69.8
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-130.8	-153.8	-142.9
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-115.7	-129.5	-113.5
8-thioxanthine				
PM3	00.0	-96.6	-105.0	-62.5
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-128.0	-149.3	-136.2
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-113.8	-126.9	-112.1
xanthine				
PM3	00.0	-99.6	-107.2	-67.7
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-130.5	-152.0	-138.8
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-116.5	-128.9	-115.4*
acide urique (dianion 3-7)				
PM3	00.0	-188.2	-196.9	-189.0
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-225.7	-251.6	-256.2
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-208.2	-221.8	-223.3
8-thioxanthine (dianion 3-7)				
PM3	00.0	-171.6	-180.4	-165.4
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-214.1	-239.7	-237.2
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-195.6	-221.8	-223.3
8-azaxanthine (dianion 3-7)				
PM3	00.0	-190.4	-195.8	-203.1
B3LYP/6-31G**//PM3	00.0	-236.6	-266.5	-266.9
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-210.9	-235.7	-235.0

TAB. 7.19.: Stabilités relatives des ligands dans le site actif de 2UOX par les méthodes PM3, B3LYP/6-31G**//PM3 et B3LYP/6-31+G**//PM3 (en kcal/mol).

*CHAPITRE 7. ETUDE DES INHIBITEURS ET AUTRES LIGANDS CONNUS DE
L'URATE OXYDASE*

Charges	N ₃	C ₅	N ₇	N ₈	O ₈	N ₉	O ₁	O ₂
8-azaxanthine	-0.352	-0.314	-0.006	0.695	0.214	0.226	-0.045	0.050
8-azaxanthine (monoanion)	-0.401	-0.420	0.075	-0.210	—	0.152	-0.008	0.028
8-fluoroxanthine	-0.139	-0.131	-0.034	0.038	-0.015	0.243	-0.392	-0.450
8-chloroxanthine	-0.158	-0.139	-0.012	-0.238	0.282	0.265	-0.458	-0.458
8-hydroxyxanthine	-0.171	-0.139	-0.100	0.079	-0.169	0.227	-0.460	-0.394
8-thioxanthine	-0.152	-0.140	-0.016	-0.250	0.179	0.305	-0.471	-0.380
xanthine	-0.133	-0.146	-0.030	-0.132	0.181	0.294	-0.451	-0.451
acide urique (dianion)	-0.371	-0.307	-0.237	0.286	-0.352	-0.058	-0.451	-0.406
8-thioxanthine (dianion)	-0.352	-0.314	-0.006	-0.304	-0.100	0.226	-0.482	-0.381

TAB. 7.20.: Quelques charges atomiques de Mulliken pour les ligands et O₂, selon la méthode PM3, dans le site actif de 2UOX (en u.a.).

Densité de spin	N ₃	C ₄	C ₅	N ₇	N ₈	O ₈	N ₉	O ₁	O ₂
8-azaxanthine	—	—	—	—	—	—	—	0.946	1.049
8-azaxanthine (monoanion)	—	—	—	—	—	—	—	0.980	1.013
8-fluoroxanthine	0.504	-0.171	0.467	-0.138	0.329	—	—	0.461	0.544
8-chloroxanthine	0.476	-0.135	0.428	-0.145	0.359	—	—	0.463	0.542
8-hydroxyxanthine	0.444	-0.120	0.444	—	0.273	—	—	0.464	0.540
8-thioxanthine	0.482	-0.147	0.408	-0.132	-0.372	—	—	0.453	0.551
xanthine	0.529	-0.159	0.415	-0.130	0.334	—	—	0.459	0.545
acide urique (dianion)	0.092	0.057	0.233	0.462	—	0.153	—	0.460	0.543
8-thioxanthine (dianion)	—	—	0.111	0.249	-0.110	0.647	-0.100	0.552	0.547

TAB. 7.21.: Densités de spin pour les ligands et O₂ selon la méthode PM3.

7.5. CONCLUSION

- quelques ligands sont des inhibiteurs parce que, même s'ils peuvent transférer un électron vers O_2 , les énergies résultantes sont très élevées et il y a déstabilisation de l'ensemble (raison thermodynamique) ;
- dans le cas de la 8-azaxanthine, le dioxygène est stabilisé dans le site actif mais il n'y a pas de transfert d'électron.
- l'acide 9-méthyl urique, dans sa forme dianionique a la même capacité que l'acide urique à donner un électron. Toutefois, l'acide 9-méthyl urique est un inhibiteur de l'urate oxydase par l'absence d'un proton en position 9.

Ainsi il est possible simplement d'expliquer l'inhibition ou la réactivité des ligands de l'urate oxydase par deux conditions pour que la catalyse s'effectue : i) le ligand doit posséder un hydrogène en position 9 pour permettre un transfert de proton vers O_2 , ii) le ligand doit avoir un potentiel d'ionisation suffisamment bas pour pouvoir transférer un électron naturellement vers O_2 (*i.e.*, le produit résultant du transfert d'électron doit être plus stable que les réactifs). Cependant l'ensemble de nos résultats ne permet pas encore d'expliquer entièrement la catalyse de l'urate oxydase. En effet, les expériences ont montré que l'urate oxydase peut être active à pH 7,⁶⁶ un pH pour lequel la forme monoanionique de l'acide urique est majoritaire. D'un autre côté, nous avons constaté que le monoanion 3 est la forme la plus stable parmi les monoanions possibles de l'acide urique. Toutefois, le monoanion 3 n'est pas stable dans le site actif à cause des interactions des atomes hydrogène en position 7 et avec celui de Thr57. Il faut donc trouver une autre réponse concernant la catalyse de l'urate oxydase à pH physiologique.

*CHAPITRE 7. ETUDE DES INHIBITEURS ET AUTRES LIGANDS CONNUS DE
L'URATE OXYDASE*

8. Réactivité comparée du monoanion 3 de l'acide urique et de la 8-hydroxyxanthine

Nous avons vu dans la partie bibliographique que l'urate oxydase peut fonctionner à pH 7, pour lequel l'acide urique sous une forme monoanionique est majoritaire. Les résultats obtenus dans les chapitres précédents ont montré que le monoanion 3 est la forme la plus stable parmi toutes les formes monoanioniques que ce soit dans le vide, dans le solvant, ou dans le site actif. Cependant, en raison de l'interaction stérique entre les protons du substrat et la chaîne latérale de Thr57, la forme monoanion 3 de l'acide urique ne peut être autant stabilisée dans le site actif que celle du dianion 3-7. Par rapport au mécanisme étudié au Chapitre 6, il est donc nécessaire de regarder comment il serait possible soit de modifier ce monoanion 3, soit de modifier le site actif de façon à pouvoir obtenir une meilleure interaction entre un substrat monoanionique et le site actif de l'urate oxydase en vue de la réaction d'oxydoréduction. L'une des solutions simples possibles à ce problème est de considérer non pas le monoanion 3 de l'acide urique, mais sa forme tautomère : la 8-hydroxyxanthine, résultant d'une tautomérisation entre N7H et C8O. En effet, sous cette dernière forme, l'azote placé en position 7 n'est alors plus protoné et peut donc être en bien meilleure interaction avec Thr57.

Ainsi, nous allons consacrer la suite de ce chapitre à l'étude de la 8-hydroxyxanthine afin de comparer le monoanion 3 de l'acide urique avec sa forme tautomère en terme de stabilité thermodynamique et de réactivité avec l'urate oxydase.

8.1. Stabilités relatives dans le vide et dans le solvant

Méthode	Monoanion 3	8-Hydroxyxanthine
PM3	00.0	18.3
HF/6-31G**	00.0	20.1
B3LYP/6-31G**	00.0	19.7
B3LYP/6-31+G**	00.0	20.0
B3LYP/6-31G** (Nancy)	00.0	18.2

TAB. 8.1.: Energies relatives de la forme tautomère 8-hydroxyxanthine par rapport au monoanion 3 de l'acide urique (en kcal/mol).

Les résultats relatifs à la stabilité dans le vide et dans le solvant du monoanion 3 de l'acide

urique et du monoanion 3 de la 8-hydroxyxanthine sont reportés dans le Tableau 8.1. Ces résultats montrent que le monoanion 3 de l'acide urique est plus stable que sa forme tautomérique par une énergie de 19.7 et 20.0 kcal/mol aux niveaux B3LYP/6-31G** et B3LYP/6-31+G**, respectivement. Les résultats sont similaires dans le solvant, ce qui confirme que le monoanion 3 est plus stable que la 8-hydroxyxanthine.

8.2. Potentiels d'ionisation dans le vide et dans le solvant

Méthode	Monoanion 3	8-Hydroxyxanthine
PM3	56.7	54.6
HF/6-31G**	42.1	40.0
B3LYP/6-31G**	60.5	55.7
B3LYP/6-31+G**	74.6	69.5
B3LYP/6-31G** (Nancy)	102.3	98.0

TAB. 8.2.: Potentiels d'ionisation du monoanion 3 de l'acide urique et de la 8-hydroxyxanthine (en kcal/mol).

Le potentiel d'ionisation nous renseigne sur la capacité d'une molécule à donner un électron. Le Tableau 8.2 présente les potentiels d'ionisation du monoanion 3 et de la 8-hydroxyxanthine. Ces résultats montrent que les potentiels d'ionisation par la méthode B3LYP/6-31G** dans le vide sont de 60.5 et de 55.7 kcal/mol pour le monoanion 3 et la 8-hydroxyxanthine, respectivement. En faisant le calcul par la méthode B3LYP/6-31G** dans le solvant, nous avons trouvé que les potentiels d'ionisation du monoanion 3 et de la 8-hydroxyxanthine sont de 102.3 et de 98.0 kcal/mol, respectivement. Ainsi, nous observons que l'acide 8-hydroxyxanthine est plus favorable à la perte d'un électron que le monoanion 3 par une énergie de 4.7 et 4.3 kcal/mol dans le vide et dans le solvant (B3LYP/6-31G**), respectivement.

8.3. Réactivité intrinsèque de l'acide 8-hydroxyxanthine

Nous avons montré dans le chapitre de la réactivité intrinsèque de l'acide urique qu'il y a 6 chemins possibles pour arriver au produit final qui est le 5-hydroxyisourate. Ce même type d'étude est applicable dans le cas de la 8-hydroxyxanthine. Ici, nous avons considéré seulement l'hypothèse 3 qui consiste à transférer un hydrogène. La structure de la 8-hydroxyxanthine permet de constater qu'il n'existe qu'une seule possibilité de transfert de proton s'effectuant à partir de la position N9 (le proton sur N7 ayant été déplacé sur O8, l'autre possibilité disparaît). Cependant, pour les intermédiaires, il y a toujours la possibilité de fixer les groupements OH et OOH soit en C5 soit en C4. Les 6 chemins possibles de la réactivité intrinsèque de la 8-hydroxyxanthine sont rassemblés dans les Figures 8.1 et 8.2 selon les deux hypothèses de réaction possibles : les

8.3. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE 8-HYDROXYXANTHINE

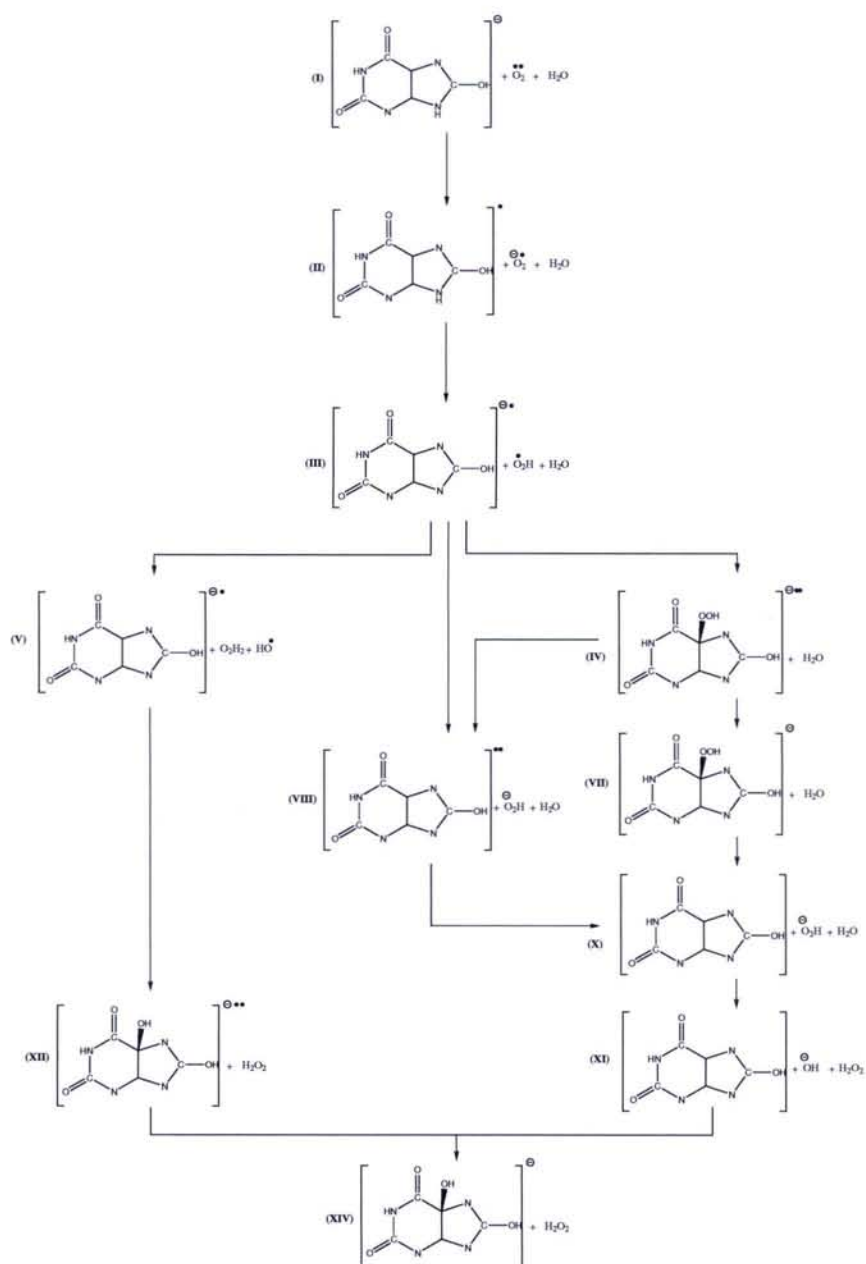


FIG. 8.1.: Réactivité de la 8-hydroxyxanthine selon l'hypothèse A : transfert du proton H9 vers O_2 et obtention du 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine.

CHAPITRE 8. RÉACTIVITÉ COMPARÉE DU MONOANION 3 DE L'ACIDE URIQUE ET DE LA 8-HYDROXYXANTHINE

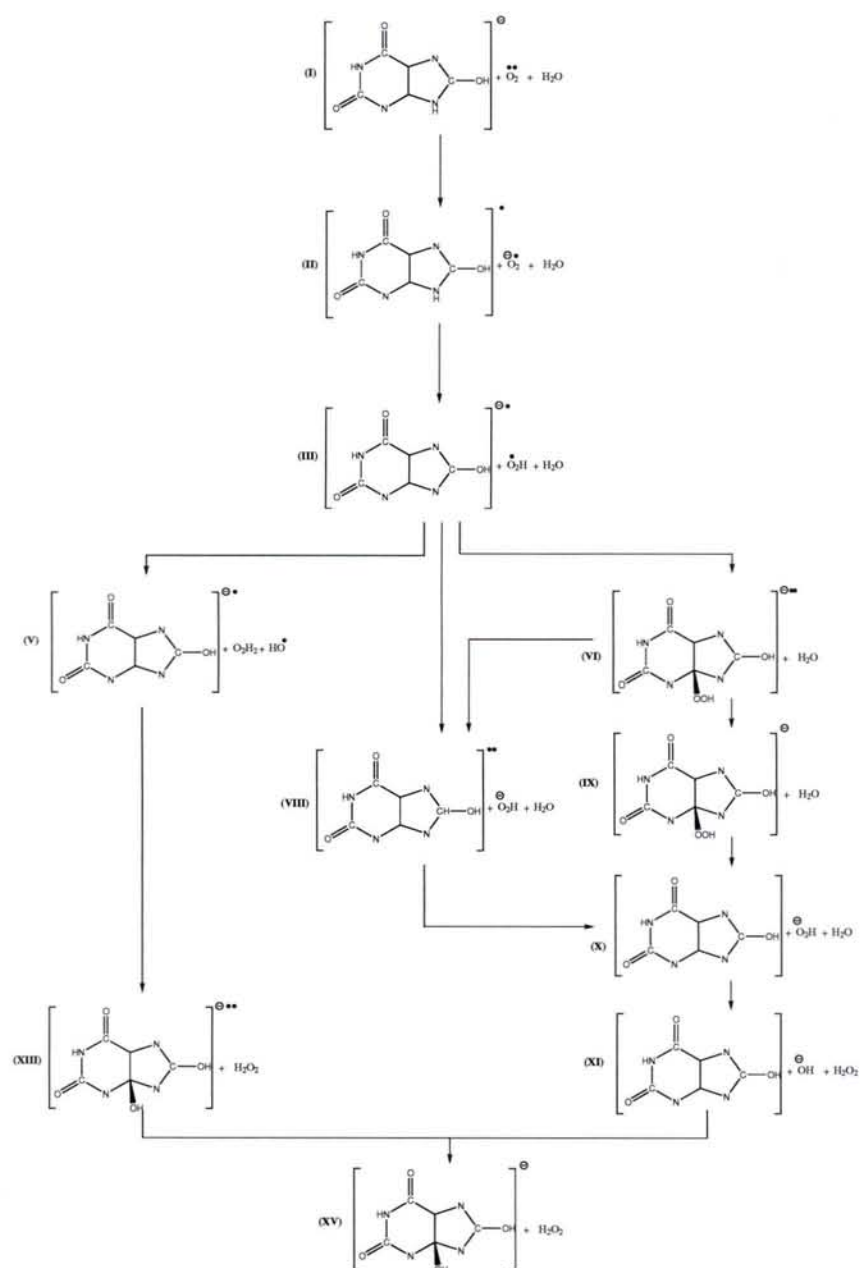


FIG. 8.2.: Réactivité de la 8-hydroxyxanthine selon l'hypothèse A' : transfert du proton H9 vers O_2 et obtention du 4-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine.

8.3. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE 8-HYDROXYXANTHINE

hypothèses A et A' respectivement. L'étude de la réactivité a été réalisée selon la méthode DFT B3LYP au niveau 6-31+G**. Les énergies relatives, les enthalpies et les énergies libres relatives obtenues sont indiquées dans les Tableaux 8.3 et 8.4.

	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	55.8	55.8	55.8	55.7	55.7	55.7	55.9	55.9	55.9	55.3	55.3	55.3
III	13.6	13.6	13.6	13.2	13.2	13.2	13.3	13.3	13.3	11.5	11.5	11.5
IV	—	—	42.0	—	—	41.8	—	—	41.8	—	—	50.9
V	46.2	—	—	45.5	—	—	45.6	—	—	44.2	—	—
VII	—	—	-12.2	—	—	-9.4	—	—	-10.1	—	—	1.4
VIII	—	104.6	—	—	102.4	—	—	102.9	—	—	100.3	—
X	—	68.2	68.2	—	67.8	67.8	—	68.0	68.0	—	66.5	66.5
XI	—	83.5	85.5	—	83.5	83.5	—	83.6	83.6	—	82.8	82.8
XII	52.4	—	—	53.6	—	—	52.9	—	—	61.2	—	—
XIV	-9.4	-9.4	-9.4	-5.4	-5.4	-5.4	-6.4	-6.4	-6.4	3.3	3.3	3.3

TAB. 8.3.: Energies relatives, énergies relatives avec la correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour la 8-hydroxyxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	55.8	55.8	55.8	55.7	55.7	55.7	55.9	55.9	55.9	55.3	55.3	55.3
III	13.6	13.6	13.6	13.2	13.2	13.2	13.3	13.3	13.3	11.5	11.5	11.5
V	46.2	—	—	45.5	—	—	45.6	—	—	44.2	—	—
VI	—	—	36.3	—	—	36.0	—	—	36.0	—	—	44.2
VIII	—	104.6	—	—	102.4	—	—	102.9	—	—	100.3	—
IX	—	—	5.2	—	—	7.2	—	—	6.8	—	—	17.7
X	—	68.2	68.2	—	67.8	67.8	—	68.0	68.0	—	66.5	66.5
XI	—	83.5	85.5	—	83.5	83.5	—	83.6	83.6	—	82.8	82.8
XIII	46.1	—	—	47.9	—	—	47.2	—	—	55.8	—	—
XV	8.5	8.5	8.5	12.0	12.0	12.0	11.0	11.0	11.0	20.7	20.7	20.7

TAB. 8.4.: Energies relatives, énergies relatives avec la correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour la 8-hydroxyxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

Les résultats obtenus (voir Tableau 8.3) permettent de déduire trois réactivités possibles. La première réactivité consiste à transférer un électron du substrat vers O₂ (II), ce qui se fait avec une énergie de 55.8 kcal/mol. Lors de la deuxième étape, le proton peut provenir de l'azote 9 (III) avec une énergie de 13.6 kcal/mol. Le radical OOH obtenu sera déplacé directement sur le carbone 5 donnant l'intermédiaire (IV) avec une énergie de 42.0 kcal/mol. Puis, il y a passage de l'état triplet à l'état singulet pour donner le 5-hydroperoxyiso-8-hydroxyxanthine et une molécule d'eau (VII). Cet intermédiaire a une énergie de -12.2 kcal/mol par rapport aux réactifs.

Ensuite, il y aura élimination d' OOH^- à partir du produit obtenu pour donner un intermédiaire avec une énergie de 68.2 kcal/mol (X). Puis, OOH^- prend un proton de la molécule d'eau pour former du peroxyde d'hydrogène avec une énergie de 85.5 kcal/mol (XI). Enfin, une addition du groupement OH^- s'effectue pour donner le produit 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine avec une énergie de -9.4 kcal/mol (XIV).

Dans la deuxième réactivité, les deux premières étapes du chemin sont les mêmes que pour la première réactivité (I→II→III). Ensuite, il y a transfert d'électron de OOH vers le substrat et cette étape s'effectue pour aboutir à une énergie de 104.6 kcal/mol (VIII). Puis le passage de l'état triplet à l'état singulet sur le même intermédiaire intervient pour obtenir une énergie de 68.2 kcal/mol. Sur ce dernier un transfert de proton peut s'effectuer, l'intermédiaire (XI) formé étant alors situé avec une énergie de 83.5 kcal/mol. Enfin, le produit final qui la est 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine est formé.

Concernant la troisième réactivité qui consiste en un déplacement de l'hydrogène de la molécule d'eau vers OOH radical, elle peut se faire avec une énergie de 46.2 kcal/mol. Le OH se fixe sur le carbone 5 permettant d'obtenir 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine dans son état triplet (XII). Cet intermédiaire a une énergie de 54.2 kcal/mol. La fin du chemin réactionnel qui consiste à passer de l'état triplet à l'état singulet est alors réalisable directement. Le produit final a une énergie de -9.4 kcal/mol.

Une deuxième hypothèse de mécanisme consiste à transférer un proton toujours de l'azote 9 sur O_2 , mais à effectuer les additions de groupements OH ou OOH sur le C4 de la 8-hydroxyxanthine et non le C5. Les mêmes réactivités peuvent être observées, mais le produit obtenu est alors le 4-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine au lieu de le 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine. Ceci a bien été détaillé lorsque nous avons étudié la réactivité intrinsèque du monoanion 3. Ici, nous obtenons le produit 4-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine avec une énergie relative de 8.5 kcal/mol. En comparant les deux produits qui sont le 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine et le 4-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine, nous pouvons constater que la fixation sur le carbone 5 donne le produit le plus stable qui est la 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine.

Afin d'obtenir des données thermodynamiques plus précises, nous avons calculé les corrections thermodynamiques à l'énergie afin d'obtenir les enthalpies et les énergies libres relatives aux mécanismes décrits ci-dessus. Les énergies correspondantes ont été regroupées dans les mêmes Tableaux 8.3 et 8.4. Les résultats obtenus montrent que les énergies libres relatives permettent de confirmer les conclusions faites avec les énergies relatives. En effet, le 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine est plus stable que le 4-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine.

8.4. Stabilités relatives et potentiels d'ionisation dans le site actif

Nous avons montré précédemment que le monoanion 3 est plus stable que la 8-hydroxyxanthine dans le vide. Ceci a été confirmé en tenant compte de l'effet de solvant. D'autre part, nous avons constaté que la 8-hydroxyxanthine a la même capacité de donner un électron que le monoanion 3. Ceci a été aussi observé dans le solvant.

8.4. STABILITÉS RELATIVES ET POTENTIELS D'IONISATION DANS LE SITE ACTIF

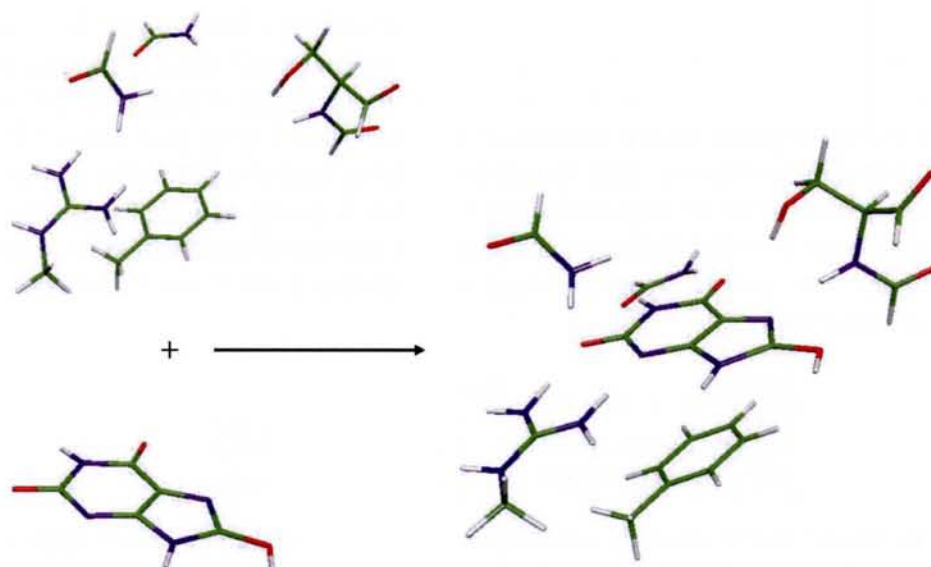


FIG. 8.3.: Interactions des formes anioniques de la 8-hydroxyxanthine avec le site actif de 2UOX.

Cependant, pour analyser l'influence possible de l'enzyme sur les propriétés chimiques de la 8-hydroxyxanthine, une étude des stabilités comparées des deux formes tautomères du substrat à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase a été réalisée aux niveaux PM3 et DFT. Le Tableau 8.5 présente la stabilité relative de la 8-hydroxyxanthine par rapport au monoanion 3. Nous constatons que, dans le site actif, la 8-hydroxyxanthine est plus stable que le monoanion 3 par une énergie de -12.8 kcal/mol selon la méthode PM3. Ceci est confirmé par la méthode DFT qui donne une stabilité de -13.3 kcal/mol pour la 8-hydroxyxanthine. Ainsi, même si dans le solvant l'équilibre thermodynamique entre le monoanion 3 de l'acide urique et la 8-hydroxyxanthine est déplacée en faveur du monoanion 3, dans l'enzyme, cet équilibre est déplacé en faveur de la 8-hydroxyxanthine.

Méthode	Monoanion 3	8-Hydroxyxanthine
PM3	00.0	-12.8
B3LYP/6-31G** //PM3	00.0	-12.5
B3LYP/6-31+G**//PM3	00.0	-12.7
B3LYP/6-31G**	00.0	-13.3

TAB. 8.5.: Energies relatives de la 8-hydroxyxanthine par rapport au monoanion 3 de l'acide urique à l'intérieur de site actif de 2UOX (en kcal/mol).

Par ailleurs, nous avons étudié les potentiels d'ionisation adiabatiques de la 8-hydroxyxanthine dans le site actif. Nous avons réalisé nos calculs par la méthode PM3. Un calcul simple d'énergie par la méthode DFT a aussi été effectué en utilisant la géométrie PM3. L'ensemble des résultats obtenus est reporté dans le Tableau 8.6. Ces résultats montrent que la 8-hydroxyxanthine

*CHAPITRE 8. RÉACTIVITÉ COMPARÉE DU MONOANION 3 DE L'ACIDE URIQUE ET
DE LA 8-HYDROXYXANTHINE*

peut donner un électron si on lui fournit une énergie d'environ 154 kcal/mol. En comparant les potentiels d'ionisation de la 8-hydroxyxanthine et du monoanion 3, nous pouvons constater que les deux formes tautomères ont pratiquement le même potentiel d'ionisation à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase, et que celui-ci est bien supérieur à celui du dianion 3-7 reporté au Chapitre 5 et du même ordre que celui de la 8-azaxanthine reporté au Chapitre 7. Ainsi, même si la 8-hydroxyxanthine se lie préférentiellement à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase, cette forme ne semble pas être une forme réactive pour une réaction d'oxydoréduction avec O₂. Il est donc nécessaire, pour que l'enzyme soit également efficace à pH 7, que la 8-hydroxyxanthine soit "activée" par l'enzyme.

Méthode	Monoanion 3	8-Hydroxyxanthine
PM3	151.4	152.2
B3LYP/6-31G** //PM3	144.7	145.4
B3LYP/6-31+G**//PM3	154.2	156.1

TAB. 8.6.: Potentiels d'ionisation du monoanion 3 de l'acide urique et de la 8-hydroxyxanthine dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).

8.5. Hypothèse de chemin réactionnel pour la 8-hydroxyxanthine

Nous avons indiqué dans le Chapitre 2 que le pH optimum de l'urate oxydase est d'environ 8.5. Cependant cette enzyme peut fonctionner aussi à pH 7 qui est le pH physiologique.⁶⁶ Dans le cas du pH physiologique, aucun dianion ne peut être présent (ou alors seulement sous une forme très minoritaire). Ainsi, le substrat de l'acide urique se trouve très probablement sous forme monoanionique. Concernant la stabilité relative des formes anioniques de l'acide urique dans le site actif de l'enzyme, nous avons observé que le dianion 3-7 est le dianion le plus stable et le monoanion 3 est le monoanion le plus stable. Nous avons observé aussi que le monoanion 3 s'insère difficilement dans le site actif de l'urate oxydase car il existe des interactions stériques entre le proton 7 du monoanion et l'hydrogène de la chaîne principale de Thr57. C'est ainsi qu'une forme tautomère pourrait être construite au lieu du monoanion 3 par le transfert de proton de l'azote 7 vers le carbone 8, pour obtenir la 8-hydroxyxanthine. Cette forme tautomère est plus stable que le monoanion 3 par une énergie de 12.8 et 13.3 kcal/mol aux niveaux PM3 et B3LYP/6-31G**//PM3 respectivement à l'intérieur du site actif de l'enzyme. Cependant, ce tautomère a la même capacité de donner un électron que le monoanion 3 et que la 8-azaxanthine qui ne s'oxyde pas.

En regroupant toutes ces informations ainsi que celles relatives à la très bonne réactivité du dianion 3-7 à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase, il est possible de penser que, à pH 7, l'enzyme va activer d'une manière ou d'une autre le monoanion 3 de l'acide urique afin de le "transformer" en dianion 3-7, espèce stable qui réagira facilement. Quelques hypothèses sont ainsi envisageables, soit à partir de la 8-hydroxyxanthine, soit directement à partir du monoanion 3 :

1. La 8-hydroxyxanthine pourrait prendre le même chemin réactionnel qui a été obtenu avec le dianion 3-7 (voir Figure 8.4). Dans ce cas, la réaction commencerait par un transfert d'électron du substrat vers O₂ qui provoquerait la séparation des électrons, ensuite un transfert de proton de l'azote 9 du substrat vers O₂ pourrait se faire pour construire OOH radical. Un deuxième transfert d'hydrogène pourrait se faire de la molécule d'eau vers OOH pour construire H₂O₂ et OH radical. Enfin OH se fixerait sur le carbone 5 pour donner le produit 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine.
2. Sinon, la 8-hydroxyxanthine pourrait être activée par une perte du proton en position 8 qui la ferait passer d'une forme monoanionique vers une forme dianionique (dianion 3-7) plus réactive. Expérimentalement, Tipton *et al.*⁸⁴ ont d'ailleurs montré dans le cas de la 8-nitroxanthine que le monoanion en solution de ce ligand semble exister sous une forme dianion en présence de l'urate. Il y aurait donc activation (monoanion → dianion) de la 8-nitroxanthine par l'urate oxydase.

La question qui se pose alors est quel est le (ou les) acide(s) aminé(s) qui se comportent en base afin de récupérer le proton de l'oxygène 8. En examinant les résidus composants l'ensemble de la famille des urates oxydases, nous avons trouvé que Asp58 pourrait être un bon candidat à l'arrachage du proton en O8. Cet acide aminé (Asp58) ayant un groupement CO₂⁻ (voir Figure 8.5), il pourrait par un simple mouvement diédrique (II) venir capter

CHAPITRE 8. RÉACTIVITÉ COMPARÉE DU MONOANION 3 DE L'ACIDE URIQUE ET DE LA 8-HYDROXYXANTHINE

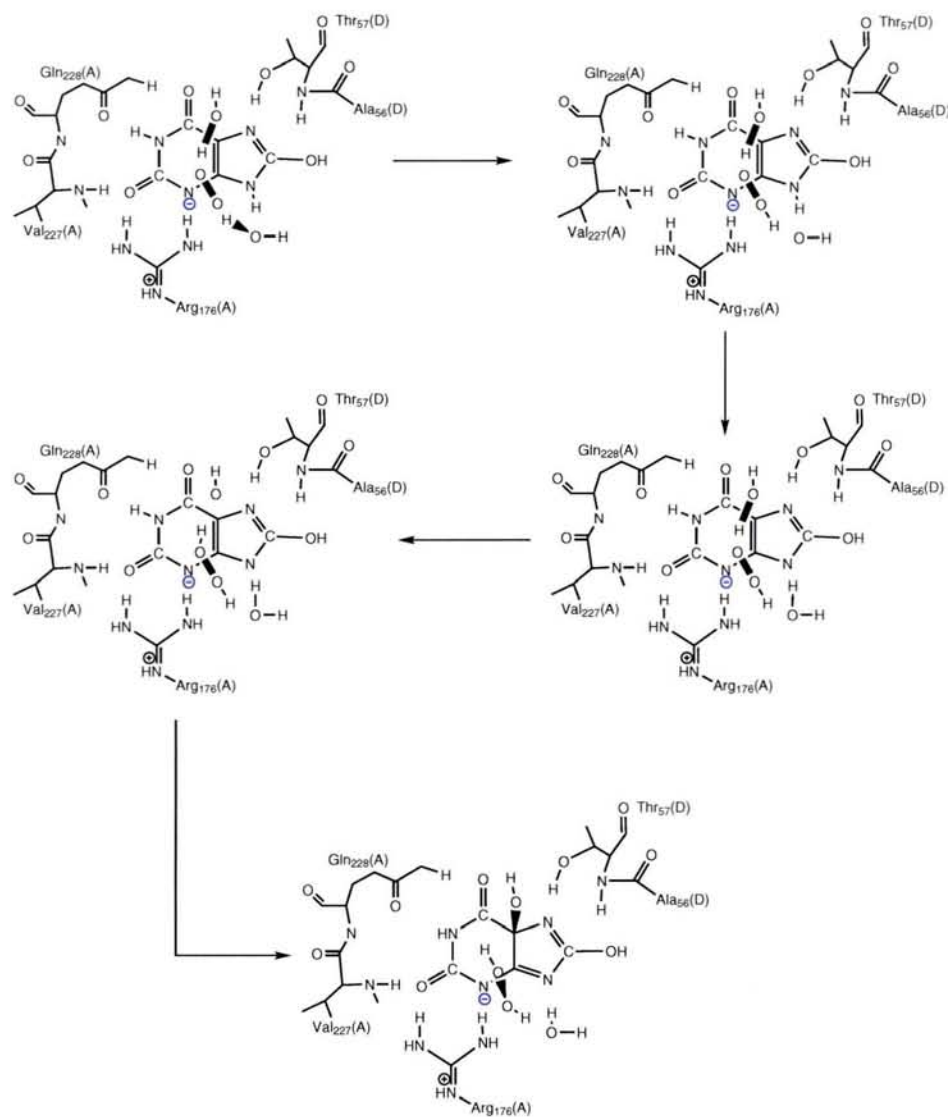


FIG. 8.4.: Une première réactivité possible de la 8-hydroxyxanthine dans 2UOX.

8.5. HYPOTHÈSE DE CHEMIN RÉACTIONNEL POUR LA 8-HYDROXYXANTHINE

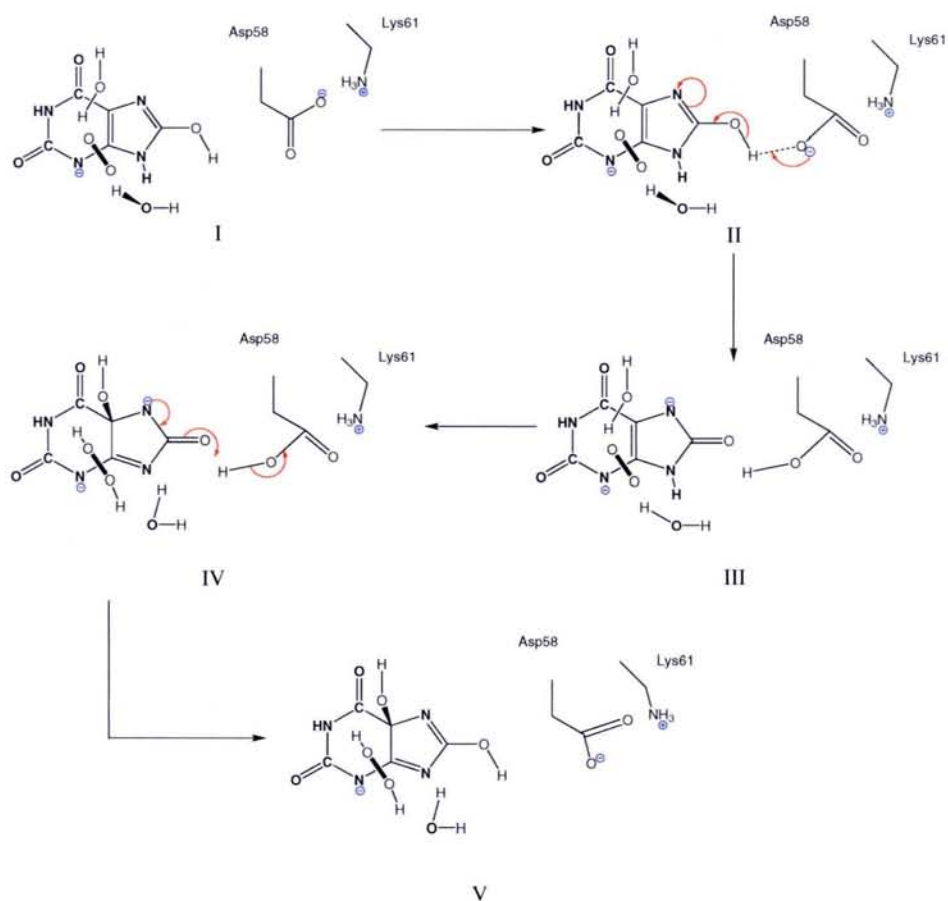


FIG. 8.5.: Une deuxième réactivité possible de la 8-hydroxyxanthine dans 2UOX.

CHAPITRE 8. RÉACTIVITÉ COMPARÉE DU MONOANION 3 DE L'ACIDE URIQUE ET DE LA 8-HYDROXYXANTHINE

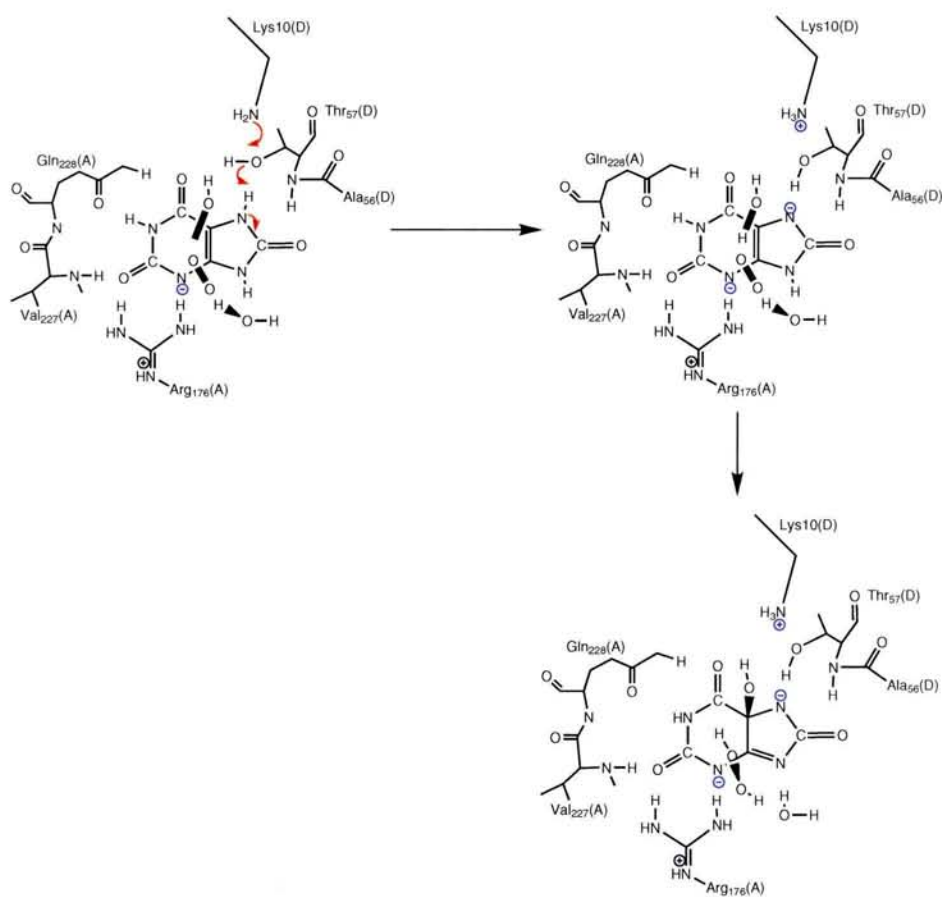


FIG. 8.6.: La réactivité directe possible du monoanion 3 de l'acide urique dans 2UOX.

8.5. HYPOTHÈSE DE CHEMIN RÉACTIONNEL POUR LA 8-HYDROXYXANTHINE

un proton en position 8 de la 8-hydroxyxanthine. Ceci formerait la forme dianion 3-7 de l'acide urique (III). A partir de ce dianion 3-7, la réaction pourrait continuer pour former le produit 5-hydroxyisourate (IV). En fin de réaction le carbone pourrait alors reprendre son proton (V) par un transfert inverse de Asp58 vers le produit.

Malheureusement, de récentes expériences de mutagenèse dirigée sur l'urate oxydase de *Bacillus subtilis* (une urate oxydase peu différente de celle d'*Aspergillus flavus*, celle utilisée pour la structure cristallographique 2UOX) ont montré que l'activité de l'urate oxydase était très peu modifiée par la mutagenèse de l'acide aspartique équivalent à Asp58.⁷¹ Ces résultats expérimentaux sont ainsi en contradiction avec cette hypothèse.

3. Enfin, une autre possibilité de transfert de la forme monoanion à la forme dianion pourrait être envisagée directement depuis le monoanion 3 de l'acide urique. En effet, de récents résultats de mutagenèse dirigée⁷¹ semblent donner un rôle prépondérant à deux acides aminés de l'urate oxydase : Thr57 et Lys10. Ces deux acides aminés sont en interaction directe dans la structure cristallographique par le biais de leur chaîne latérale : le groupement hydroxyle de Thr57 est en liaison hydrogène avec le groupement ammonium de Lys10.

Une évaluation rapide des pKas apparents de la structure 2UOX avec le logiciel PROPKA (<http://propka.chem.uiowa.edu/>) semble indiquer que Lys10 ne possède pas un état de protonation habituel pour une lysine. En effet, ce logiciel indique un pKa situé entre 6 et 7 pour Lys10 alors qu'habituellement, le pKa d'une lysine "normale" est d'environ 10. Ainsi, on peut alors imaginer que la liaison hydrogène entre Thr57 et Lys10 n'est pas une interaction $O_{57} \dots H-N_{10}$ mais une interaction dans laquelle le groupement hydroxyle de Thr57 est donneur de la liaison hydrogène sur une lysine 10 neutre ($O_{57}-H \dots N_{10}H$). Dans ce cas, le monoanion 3 de l'acide urique peut s'insérer plus facilement à l'intérieur du site actif de l'urate oxydase car l'azote en 7 peut alors former une liaison hydrogène en tant que donneur vers Thr57 (voir Figure 8.6). Là encore, deux nouvelles hypothèses de réactivité deviennent envisageables : soit le monoanion réagit directement avec O_2 , soit un double transfert de proton a lieu (proton en 7 du monoanion vers Thr57 et H_γ de Thr57 vers N_ζ de Lys10) afin d'activer le monoanion 3 en dianion 3-7.

*CHAPITRE 8. RÉACTIVITÉ COMPARÉE DU MONOANION 3 DE L'ACIDE URIQUE ET
DE LA 8-HYDROXYXANTHINE*

Conclusions

Les principales conclusions de ce travail sont rappelées ci-dessous. Elles concernent d'une part l'étude de la réaction d'oxydation de l'acide urique dans le vide et dans un modèle de site actif, et d'autre part nos travaux sur quelques ligands connus de l'urate oxydase.

Etude de la réaction d'oxydation de l'acide urique dans le vide et dans un modèle de site actif

- Nous avons montré que l'acide urique est la forme la plus stable parmi toutes les formes tautomères envisageables. Nous avons aussi montré que le monoanion 3 et le dianion 3-9 représentent respectivement les formes les plus stables parmi tous les monoanions et les dianions de l'acide urique. Cependant, le monoanion 9 et les dianions 3-7 et 1-9 sont respectivement très proches énergétiquement de ces deux formes les plus stables. Ainsi, la formation de l'état anionique de l'acide urique nécessite la déprotonation de N3-H, puis celle de N9-H, N7-H ou N1-H (dans l'ordre). Ceci a été vérifié à la fois en phase gazeuse et dans le solvant.

De plus, nous avons montré que le dianion 3-7 présente la forme la plus favorable pour donner un électron (potentiels d'ionisation). Ces conclusions sont en accord à la fois avec des travaux expérimentaux et théoriques antérieurs.

Enfin, des études théoriques de spectres d'absorption de l'acide urique et de ses anions ont montré que la méthode TD-DFT au niveau 6-31++G** associé à un modèle de solvant utilisant une représentation par continuum présente les résultats les plus proches des expériences et confirme la présence d'un mélange en solution de formes mono ou dianioniques.

- Le mécanisme de la réaction d'oxydation de l'acide urique par le dioxygène triplet est très vraisemblablement initié par un transfert d'hydrogène pouvant être divisé (non nécessairement) en deux parties : un transfert d'un électron puis un transfert de proton de l'acide urique vers O_2 .

Les résultats obtenus lors de l'étude de la réactivité intrinsèque montrent que le produit 5-hydroxyisourate est plus stable que le 4-hydroxyisourate que ce soit dans le cas d'un monoanion ou d'un dianion choisi comme réactif initial.

La première étape qui consiste à transférer un électron donne un intermédiaire plus stable que le réactif dans le cas du dianion 3-7. Par contre, dans le cas du monoanion 3, cette étape donne un intermédiaire moins stable que le réactif.

- Le monoanion 3 présente la forme la plus stable parmi tous les monoanions possibles dans le site actif, alors que le dianion 3-7 est la conformation la plus stable parmi tous les dianions

possibles dans le site actif de l'urate oxydase. Le dianion 3-7 est le dianion qui favorise le plus la réaction permettant de donner un électron en comparaison avec toutes les formes anioniques. Le 5-hydroxyisourate provenant de la réaction du dianion 3-7 avec UOX est le produit le plus stable parmi tous les produits possibles dans le site actif.

- L'état triplet est dégénéré avec l'état singulet jusqu'à la dernière étape de la réaction. En d'autres termes, aucun croisement de surface n'apparaît pendant la réaction. Principalement, la réaction se passe en trois étapes, à savoir le transfert de proton, le transfert d'hydrogène et la formation de la liaison entre l'atome d'oxygène de la molécule d'eau situé au-dessus du substrat et le carbone 5 de l'acide urique. De plus, la comparaison des deux surfaces d'énergie obtenues pour les deux mécanismes avec une ou deux molécules d'eau montre que le mécanisme assisté est le plus favorable.

Etude de quelques ligands connus par l'urate oxydase.

L'étude systématique des propriétés chimiques en phase gazeuse, en solution et dans le site actif de l'urate oxydase permet de mieux comprendre pourquoi certains ligands de l'urate oxydase sont inhibiteurs de celle-ci :

- Quelques ligands sont des inhibiteurs parce qu'ils ne sont pas aptes à fournir facilement un électron à O_2 . Ce sont ainsi de mauvais réducteurs. C'est le cas de la 8-azaxanthine par exemple : il est possible de stabiliser le dioxygène dans le site actif de l'enzyme mais il n'y a pas de transfert d'électron et donc pas de réaction possible.
- Pour d'autres ligands, comme l'acide 9-méthyl urique par exemple, ces ligands ont la même capacité que l'acide urique à donner un électron. Toutefois, l'absence d'un proton en position 9 ne permet pas le premier transfert de proton vers O_2 , étape initiale vers la réduction de ce dernier en H_2O_2 .

Activité de l'urate oxydase à pH neutre

Quelques questions demeurent cependant quant au mécanisme d'activation utilisé par l'urate oxydase pour pouvoir oxyder l'acide urique à pH 7. En effet, nous avons montré dans le chapitre précédent que, si le dianion 3-7 de l'acide urique s'oxyde très facilement dans le site actif, le monoanion 3 de l'acide urique, espèce majoritaire à pH 7, n'est pas un bon candidat à l'oxydation. Nous pouvons cependant imaginer d'après notre connaissance du site actif de l'enzyme plusieurs mécanismes possibles d'activation du monoanion 3 en dianion 3-7 : soit directement grâce à une diade Thr57-Lys10, soit par l'intermédiaire d'une forme tautomère du monoanion 3, la 8-hydroxyxanthine.

Ainsi, l'objectif principal de futurs travaux de modélisation de l'urate oxydase devra consister à explorer ces différentes pistes afin de déterminer le rôle activateur de l'urate oxydase dans l'oxydation de l'acide urique à pH physiologique.

A. Réactivité intrinsèque de l'acide urique et de ses anions

A.1. Réactivité intrinsèque de l'acide urique

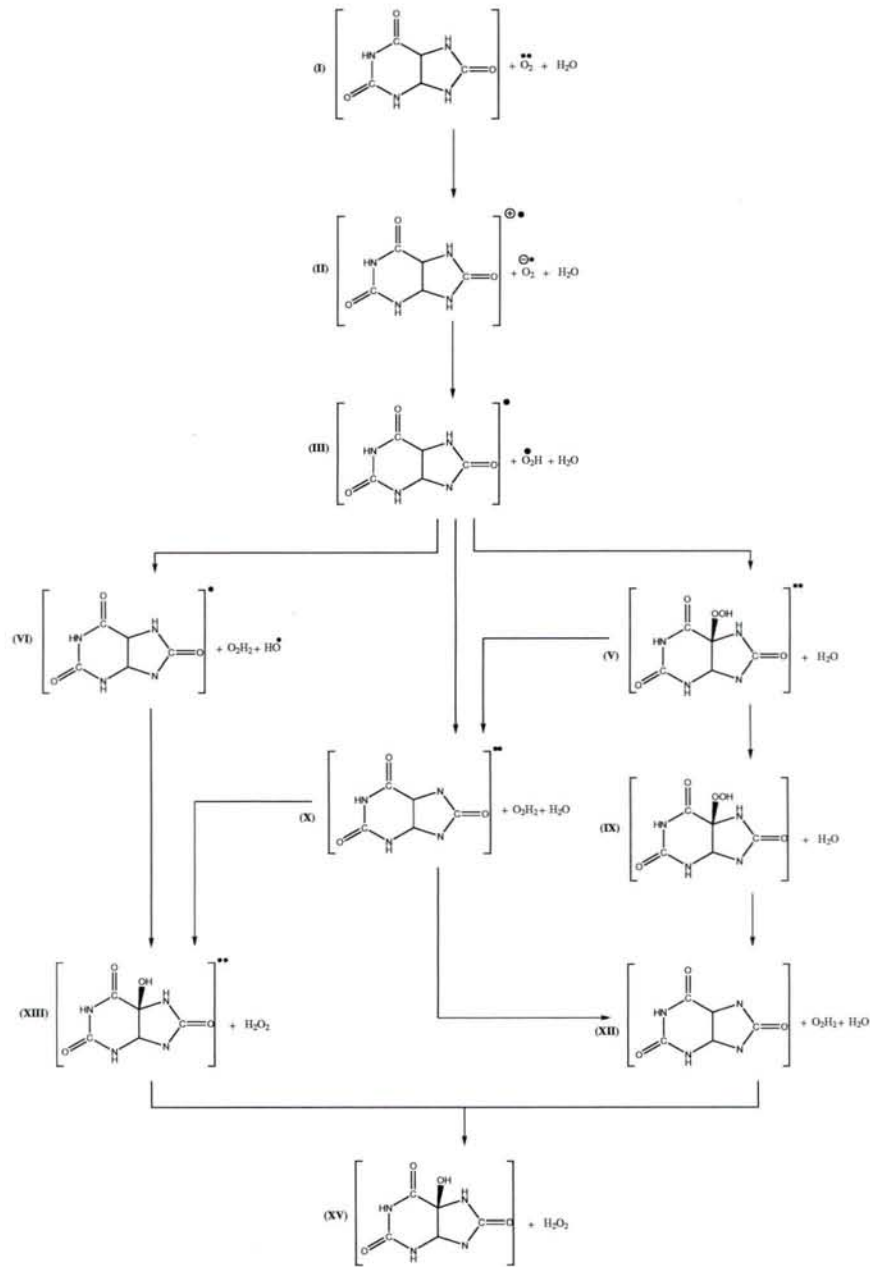


FIG. A.1.: Hypothèse A : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 .

A.1. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE

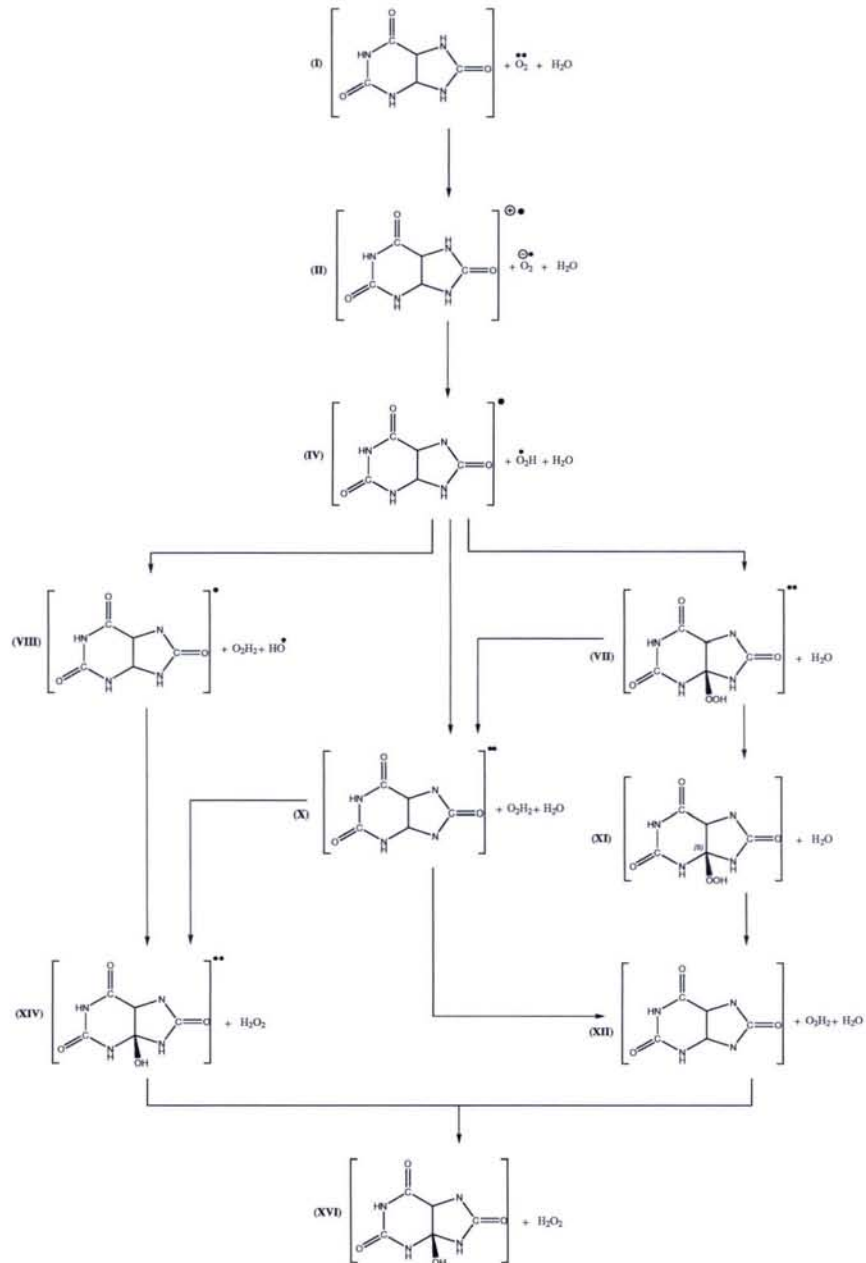


FIG. A.2.: Hypothèse B : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 .

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

UOA	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	177.1	177.1	177.1	195.9	195.9	195.9	190.1	190.1	190.1	203.0	203.0	203.0
III	24.0	24.0	24.0	28.7	28.7	28.9	30.9	30.9	30.9	51.7	51.7	51.7
V	—	—	32.1	—	—	75.1	—	—	70.1	—	—	81.8
VI	42.1	—	—	50.6	—	—	63.5	—	—	79.4	—	—
IX	—	—	-2.6	—	—	10.2	—	—	-1.6	—	—	-8.2
X	—	35.6	—	—	118.6	—	—	70.4	—	—	97.4	—
XII	—	9.8	9.8	—	90.6	90.6	—	25.7	25.7	—	22.6	22.6
XIII	24.6	—	—	71.6	—	—	69.9	—	—	82.0	—	—
XV	-11.5	-11.5	-11.5	10.8	10.8	10.8	0.4	0.4	0.4	-3.4	-3.4	-3.4

TAB. A.1.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

UOA	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	177.1	177.1	177.1	195.9	195.9	195.9	190.1	190.1	190.1	203.0	203.0	203.0
IV	30.1	30.1	30.1	37.2	37.2	37.2	38.4	38.4	38.4	60.1	60.1	60.1
VII	—	—	36.7	—	—	63.5	—	—	66.9	—	—	80.3
VIII	48.2	—	—	59.0	—	—	71.1	—	—	87.8	—	—
X	—	35.6	—	—	118.6	—	—	70.4	—	—	97.4	—
XI	—	—	-2.5	—	—	18.3	—	—	6.3	—	—	-1.9
XII	—	9.8	9.8	—	90.6	90.6	—	25.7	25.7	—	22.6	22.6
XIV	27.8	—	—	73.2	—	—	70.4	—	—	84.8	—	—
XVI	-9.8	-9.8	-9.8	19.7	19.7	19.7	9.4	9.4	9.4	4.3	4.3	4.3

TAB. A.2.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

UOA	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	190.1	190.1	190.1	189.4	189.4	189.4	189.4	189.4	189.4	189.7	189.7	189.7
III	30.9	30.9	30.9	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	28.1	28.1	28.1
V	—	—	70.1	—	—	70.2	—	—	69.6	—	—	79.4
VI	63.5	—	—	61.7	—	—	61.7	—	—	60.7	—	—
IX	—	—	-1.6	—	—	0.1	—	—	-0.5	—	—	10.9
X	—	70.4	—	—	67.2	—	—	67.2	—	—	65.7	—
XII	—	25.7	25.7	—	24.8	24.8	—	24.8	24.8	—	23.6	23.6
XIII	69.9	—	—	71.0	—	—	70.4	—	—	79.4	—	—
XV	0.4	0.4	0.4	2.9	2.9	2.9	2.3	2.3	2.3	12.5	12.5	12.5

TAB. A.3.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.1. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE

U0A	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	190.1	190.1	190.1	189.4	189.4	189.4	189.4	189.4	189.4	189.7	189.7	189.7
IV	38.4	38.4	38.4	36.7	37.7	36.7	36.7	36.7	36.7	35.3	35.3	35.3
VII	—	—	66.9	—	—	66.7	—	—	66.1	—	—	76.2
VIII	71.1	—	—	68.9	—	—	68.9	—	—	67.9	—	—
X	—	70.4	—	—	67.4	—	—	67.2	—	—	65.7	—
XI	—	—	6.3	—	—	7.9	—	—	7.3	—	—	18.7
XII	—	25.7	25.7	—	24.8	24.8	—	24.8	24.8	—	23.6	23.6
XIV	70.4	—	—	70.9	—	—	70.3	—	—	79.1	—	—
XVI	9.4	9.4	9.4	11.7	11.7	11.7	11.1	11.1	11.1	21.1	21.1	21.1

TAB. A.4.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.2. Réactivité intrinsèque du monoanion 1 de l'acide urique

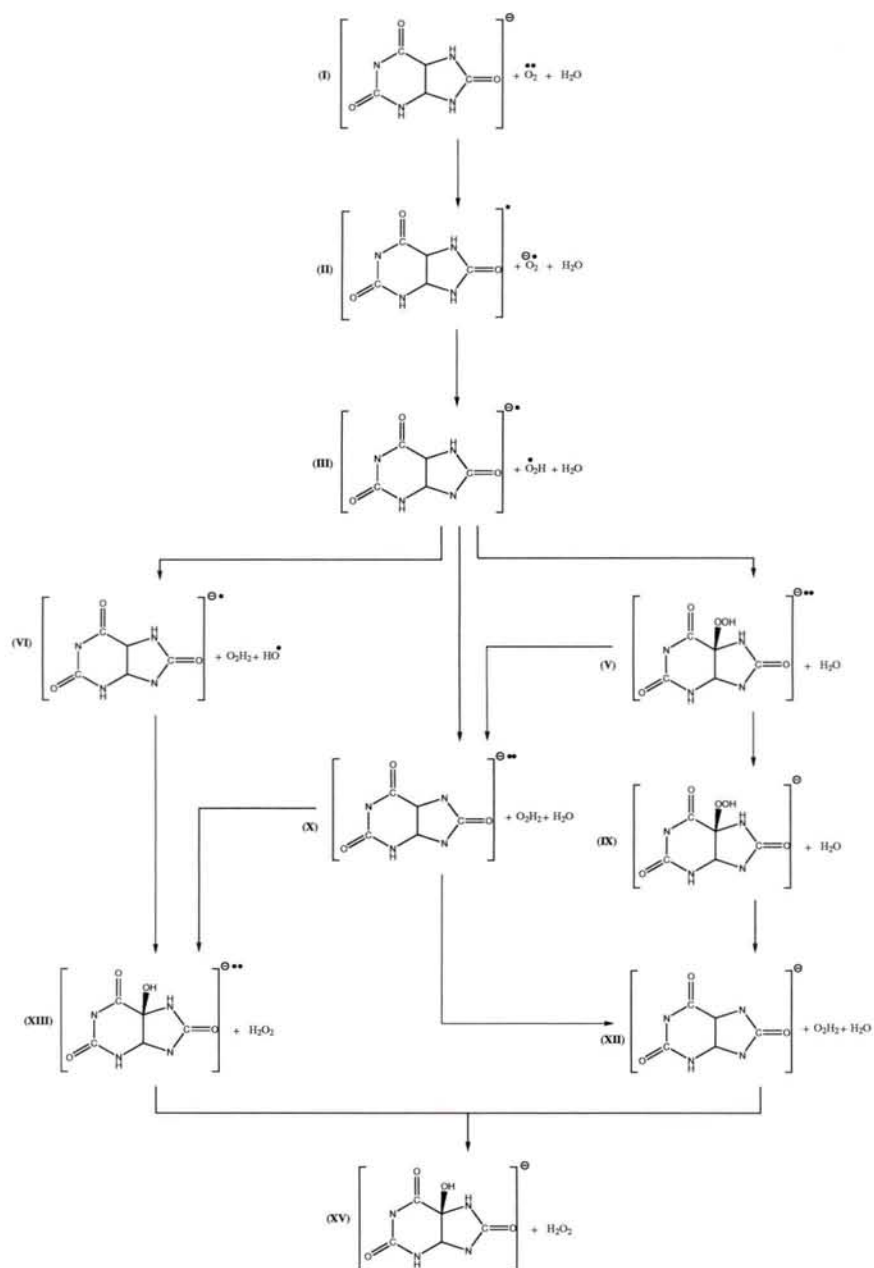


FIG. A.3.: Oxydation du monoanion 1 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 (Hypothèse A).

A.2. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU MONOANION 1 DE L'ACIDE URIQUE

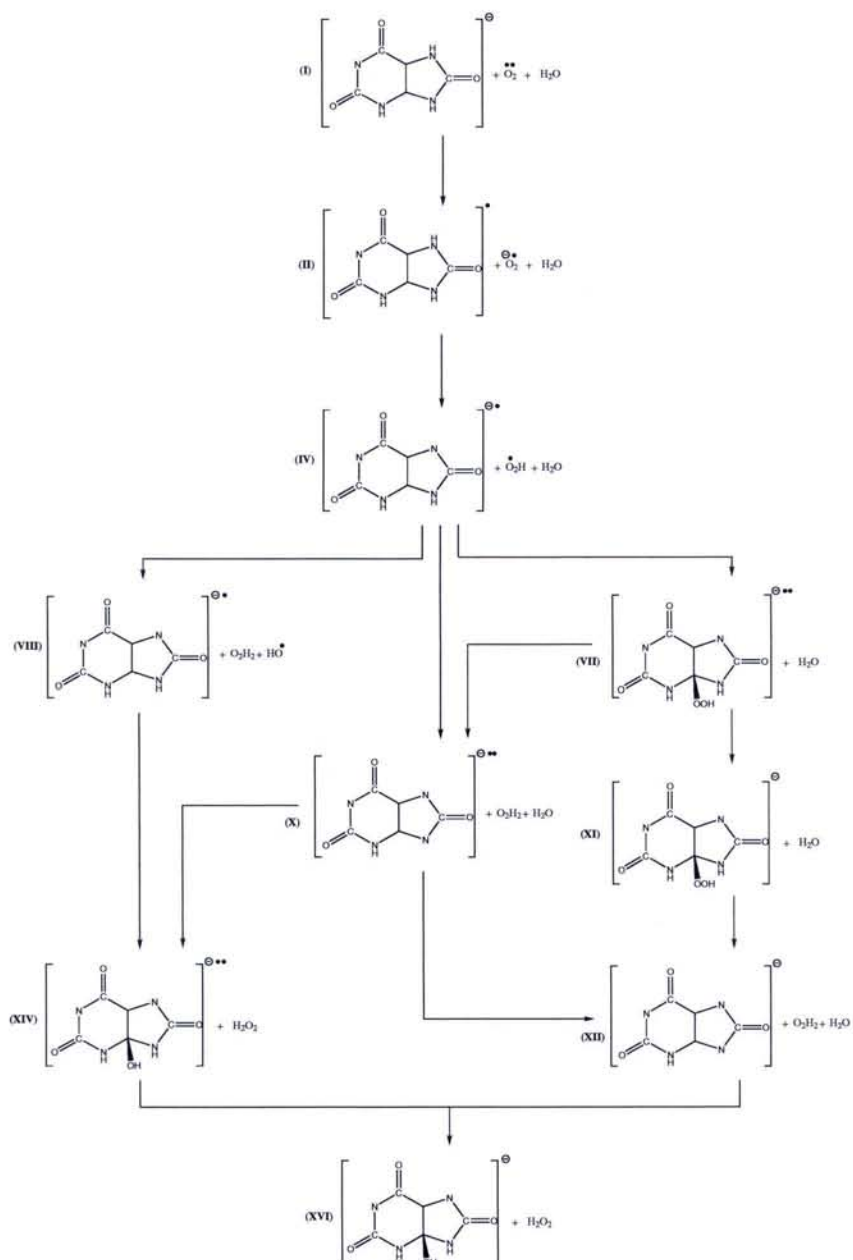


FIG. A.4.: Oxydation du monoanion 1 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 (Hypothèse B).

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₁ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	75.1	75.1	75.1	90.3	90.3	90.3	80.2	80.2	80.2	92.1	92.1	92.1
III	15.8	15.8	15.8	16.2	16.2	16.2	17.3	17.3	17.3	34.0	34.0	34.0
V	—	—	16.8	—	—	61.3	—	—	51.8	—	—	102.5
VI	33.9	—	—	38.1	—	—	50.0	—	—	61.7	—	—
IX	—	—	-15.9	—	—	-6.6	—	—	-21.9	—	—	-26.9
X	—	20.3	—	—	41.1	—	—	46.7	—	—	82.0	—
XII	—	-5.3	-5.3	—	17.0	17.0	—	3.8	3.8	—	3.0	3.0
XIII	10.4	—	—	61.1	—	—	49.8	—	—	62.3	—	—
XV	-26.0	-26.0	-26.0	-6.3	-6.3	-6.3	-18.4	-18.4	-18.4	-20.4	-20.4	-20.4

TAB. A.5.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 1 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₁ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	75.1	75.1	75.1	90.3	90.3	90.3	80.2	80.2	80.2	92.1	92.1	92.1
IV	23.5	23.5	23.5	30.8	30.8	30.8	28.0	28.0	28.0	44.3	44.3	44.3
VII	—	—	15.5	—	—	43.6	—	—	38.6	—	—	57.4
VIII	41.7	—	—	51.8	—	—	60.7	—	—	72.0	—	—
X	—	20.3	—	—	41.1	—	—	46.7	—	—	82.0	—
XI	—	—	-9.0	—	—	8.5	—	—	-5.7	—	—	-11.6
XII	—	-5.3	-5.3	—	17.0	17.0	—	3.8	3.8	—	3.0	3.0
XIV	23.8	—	—	49.1	—	—	42.0	—	—	60.2	—	—
XVI	-18.1	-18.1	-18.0	10.8	10.8	10.8	-0.8	-0.8	-0.8	-4.1	-4.1	-4.1

TAB. A.6.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 1 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₁ ⁻	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	80.2	80.2	80.2	80.0	80.0	80.0	79.9	79.9	79.9	79.2	79.2	79.2
III	17.3	17.3	17.3	16.8	16.8	16.8	16.8	16.8	16.8	14.9	14.9	14.9
V	—	—	51.8	—	—	51.4	—	—	50.8	—	—	60.9
VI	50.0	—	—	49.0	—	—	47.5	—	—	47.5	—	—
IX	—	—	-21.9	—	—	-19.0	—	—	-19.6	—	—	-0.8
X	—	46.7	—	—	43.6	—	—	43.6	—	—	41.6	—
XII	—	3.8	3.8	—	3.8	3.8	—	3.8	3.8	—	2.0	2.0
XIII	49.8	—	—	51.9	—	—	51.3	—	—	60.3	—	—
XV	-18.4	-18.4	-18.4	-14.6	-14.6	-14.6	-15.2	-15.2	-15.2	-5.2	-5.2	-5.2

TAB. A.7.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 1 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.2. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU MONOANION 1 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₁ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	80.2	80.2	80.2	80.0	80.0	80.0	79.9	79.9	79.9	79.2	79.2	79.2
IV	28.0	28.0	28.0	27.1	27.1	27.1	27.1	27.1	27.1	24.8	24.8	24.8
VII	—	—	38.6	—	—	39.4	—	—	38.9	—	—	49.3
VIII	60.7	—	—	59.3	—	—	59.3	—	—	57.4	—	—
X	—	46.7	—	—	43.6	—	—	43.6	—	—	41.6	—
XI	—	—	-5.8	—	—	-3.3	—	—	-3.3	—	—	7.5
XII	—	3.8	3.8	—	3.8	3.8	—	3.8	3.8	—	2.0	2.0
XIV	42.0	—	—	43.5	—	—	42.9	—	—	51.5	—	—
XVI	-0.8	-0.8	-0.8	2.3	2.3	2.3	1.7	1.7	1.7	11.2	11.2	11.2

TAB. A.8.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 1 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.3. Réactivité intrinsèque du monoanion 7 de l'acide urique

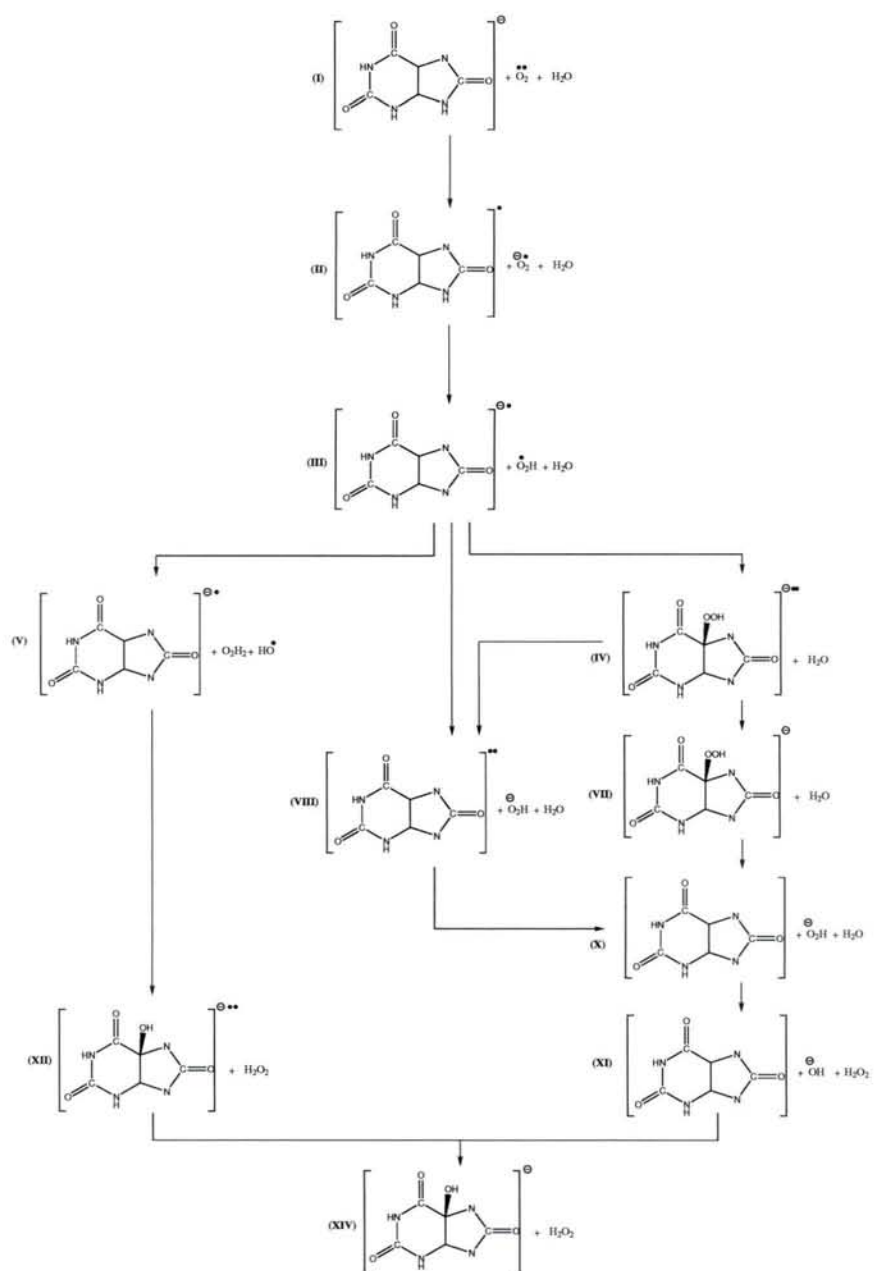


FIG. A.5.: Oxydation du monoanion 7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse A).

A.3. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU MONOANION 7 DE L'ACIDE URIQUE

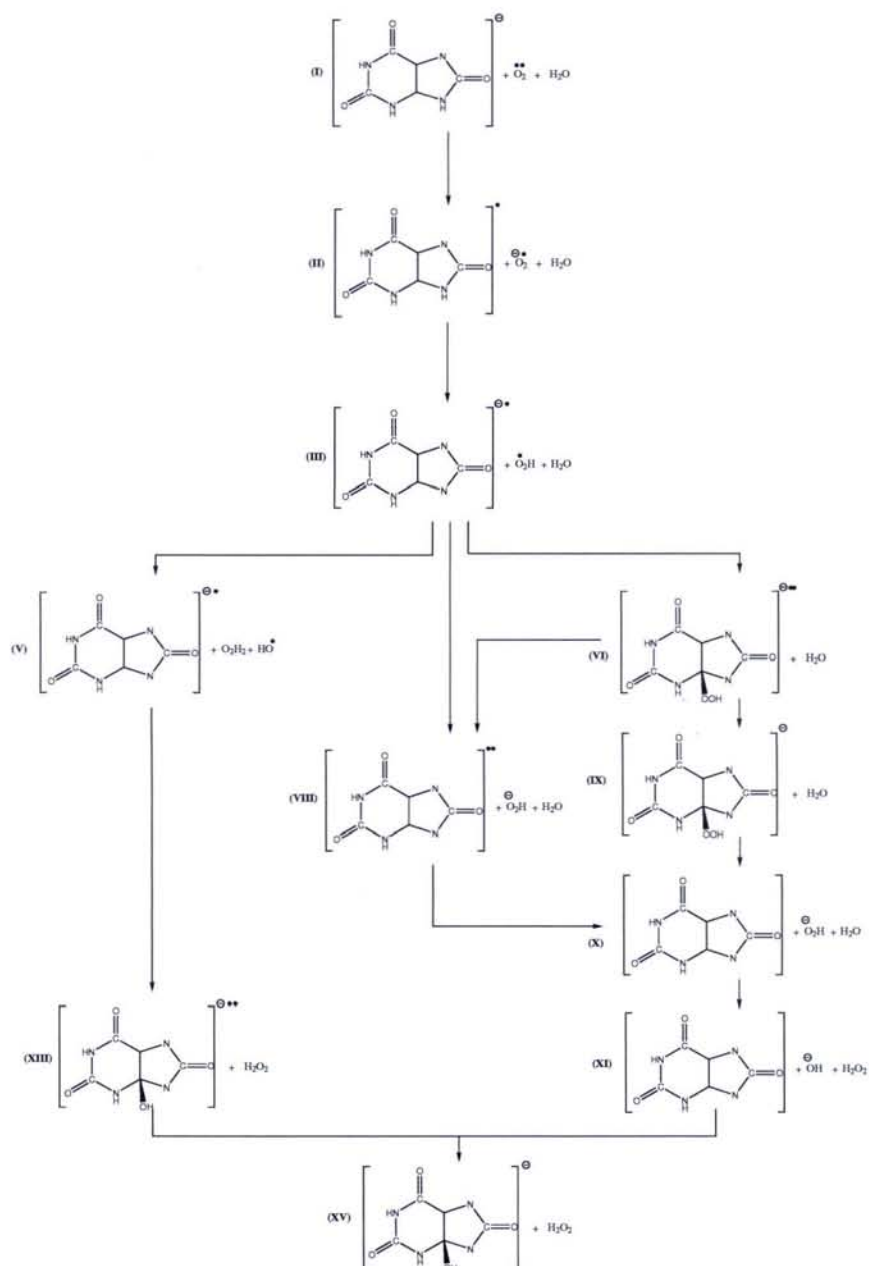


FIG. A.6.: Oxydation du monoanion 7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse A').

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₇ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	55.5	55.5	55.5	60.1	60.1	60.1	61.4	61.4	61.4	77.1	77.1	77.1
III	9.1	9.1	9.1	7.1	7.1	7.1	12.8	12.8	12.8	32.2	32.2	32.2
IV	—	—	12.2	—	—	42.5	—	—	55.4*	—	—	68.5*
V	27.2	—	—	29.0	—	—	45.5	—	—	59.9	—	—
VII	—	—	-12.6	—	—	-0.6	—	—	-12.2	—	—	-18.1
VIII	—	88.6	—	—	162.1	—	—	122.7	—	—	151.4	—
X	—	60.5	60.5	—	134.1	134.1	—	78.0	78.0	—	76.5	76.5
XI	—	79.7	79.7	—	162.7	162.7	—	104.7	104.7	—	102.6	102.6
XII	5.6	—	—	45.9	—	—	47.8	—	—	62.6	—	—
XIV	-18.4	-18.4	-18.4	5.0	5.0	5.0	-2.9	-2.9	-2.9	-6.3	-6.3	-6.3

TAB. A.9.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 7 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₇ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	55.5	55.5	55.5	60.1	60.1	60.1	61.4	61.4	61.4	77.1	77.1	77.1
III	9.1	9.1	9.1	7.1	7.1	7.1	12.8	12.8	12.8	32.2	32.2	32.2
V	27.2	—	—	29.0	—	—	45.5	—	—	59.9	—	—
VI	—	—	5.5	—	—	25.1	—	—	28.2	—	—	39.6
VIII	—	88.6	—	—	162.1	—	—	122.7	—	—	151.4	—
IX	—	—	-16.2	—	—	7.4	—	—	-3.8	—	—	-10.8
X	—	60.5	60.5	—	134.1	134.1	—	78.0	78.0	—	76.5	76.5
XI	—	79.7	79.7	—	162.7	162.7	—	104.7	104.7	—	102.6	102.6
XIII	-3.5	—	—	28.4	—	—	33.0	—	—	45.9	—	—
XV	-22.2	-22.2	-22.2	4.6	4.6	4.6	-3.7	-3.7	-3.7	-8.1	-8.1	-8.1

TAB. A.10.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

A.3. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU MONOANION 7 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.7	61.7	61.7
III	12.8	12.8	12.8	12.0	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	11.0	11.0	11.0
IV	—	—	55.4*	—	—	?	—	—	?	—	—	?
V	45.5	—	—	44.3	—	—	44.3	—	—	43.6	—	—
VII	—	—	-12.2	—	—	-10.0	—	—	-10.6	—	—	1.6
VIII	—	122.7	—	—	119.7	—	—	119.7	—	—	118.7	—
X	—	78.0	78.0	—	77.3	73.0	—	77.3	77.3	—	76.6	76.6
XI	—	104.7	104.7	—	104.1	104.1	—	104.1	104.1	—	104.0	104.0
XII	47.8	—	—	48.7	—	—	48.1	—	—	57.2	—	—
XIV	-2.9	-2.9	-2.9	-0.2	-0.2	-0.2	-0.8	-0.8	-0.8	9.6	9.6	9.6

TAB. A.11.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

AUN ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.4	61.7	61.7	61.7
III	12.8	12.8	12.8	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	12.1	11.0	11.0	11.0
V	45.5	—	—	44.3	—	—	44.3	—	—	43.6	—	—
VI	—	—	28.2	—	—	29.1	—	—	28.5	—	—	39.4
VIII	—	122.7	—	—	119.7	—	—	119.7	—	—	118.7	—
IX	—	—	-3.8	—	—	-1.9	—	—	-2.5	—	—	8.7
X	—	78.0	78.0	—	77.3	77.3	—	77.3	77.3	—	67.6	67.6
XI	—	104.7	104.7	—	104.1	104.1	—	104.1	104.1	—	104.0	104.0
XIII	33.0	—	—	34.7	—	—	34.1	—	—	43.4	—	—
XV	-3.7	-3.7	-3.7	-0.9	-0.9	-0.9	-1.5	-1.5	-1.5	8.8	8.8	8.8

TAB. A.12.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A' pour le monoanion 7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

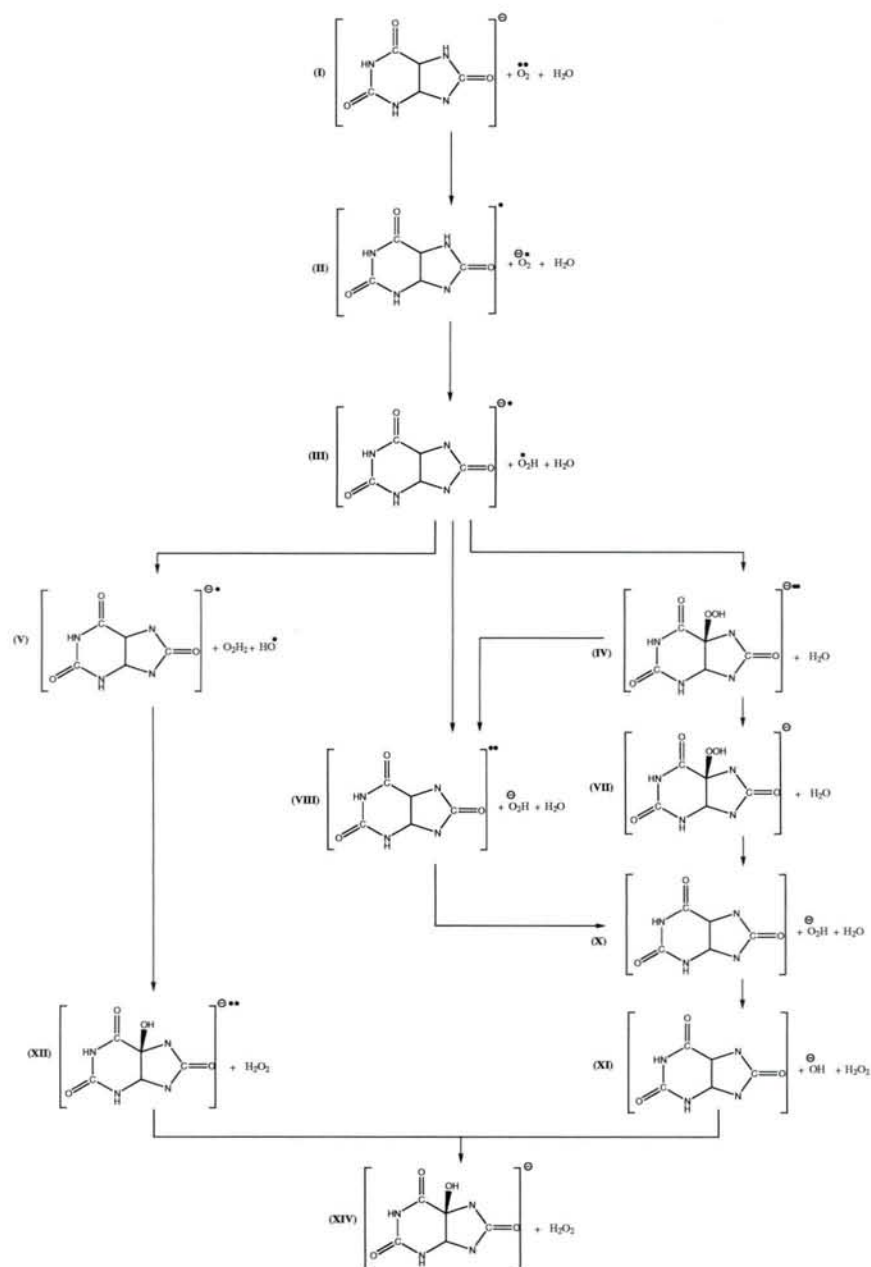


FIG. A.7.: Oxydation du monoanion 9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse B).

A.3. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU MONOANION 7 DE L'ACIDE URIQUE

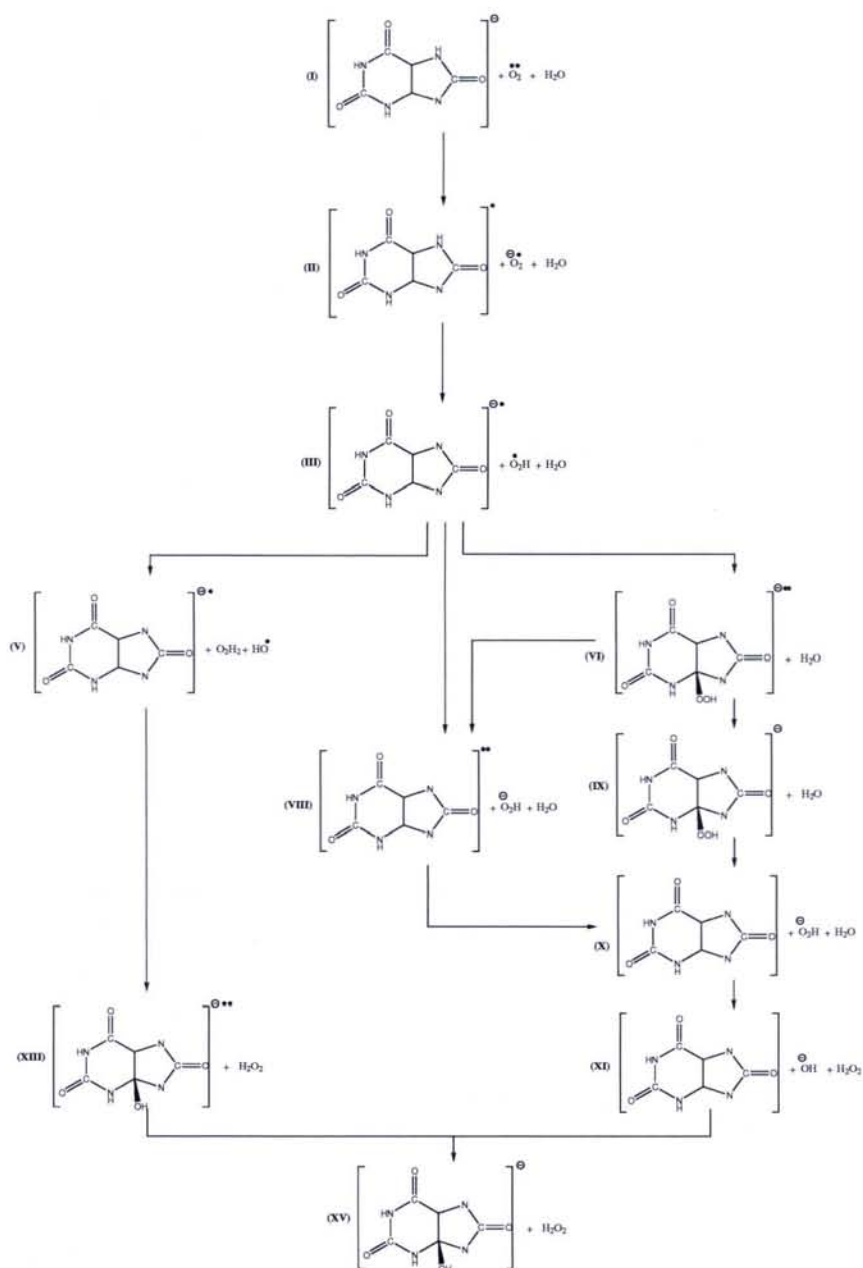


FIG. A.8.: Oxydation du monoanion 9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse B').

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₉ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	63.5	63.5	63.5	73.3	73.3	73.3	71.3	71.3	71.3	84.6	84.6	84.6
III	23.0	23.0	23.0	28.8	28.8	28.8	30.2	30.2	30.2	48.2	48.2	48.2
IV	—	—	26.1	—	—	64.2	—	—	72.8*	—	—	84.5*
V	41.2	—	—	50.6	—	—	62.9	—	—	75.9	—	—
VII	—	—	1.4	—	—	21.2	—	—	5.3	—	—	-2.2
VIII	—	102.6	—	—	183.8	—	—	140.1	—	—	167.3	—
X	—	74.5	74.5	—	155.8	155.8	—	95.5	95.5	—	92.4	92.4
XI	—	93.7	93.7	—	184.4	184.4	—	122.1	122.1	—	118.6	118.6
XII	19.5	—	—	67.6	—	—	65.2	—	—	78.5	—	—
XIV	-4.4	-4.4	-4.4	26.7	26.7	26.7	14.5	14.5	14.5	9.6	9.6	9.6

TAB. A.13.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 9 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₉ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	63.5	63.5	63.5	73.3	73.3	73.3	71.3	71.3	71.3	84.6	84.6	84.6
III	23.0	23.0	23.0	28.8	28.8	28.8	30.2	30.2	30.2	48.2	48.2	48.2
V	41.2	—	—	50.6	—	—	62.9	—	—	75.9	—	—
VI	—	—	19.5	—	—	46.8	—	—	45.6	—	—	55.6
VIII	—	102.6	—	—	183.8	—	—	140.1	—	—	167.3	—
IX	—	—	-2.1	—	—	29.1	—	—	13.6	—	—	5.1
X	—	74.5	74.5	—	155.8	155.8	—	95.5	95.5	—	92.4	92.4
XI	—	93.7	93.7	—	184.4	184.4	—	122.1	122.1	—	118.6	118.6
XIII	10.5	—	—	50.1	—	—	50.5	—	—	61.8	—	—
XV	-8.2	-8.2	-8.2	26.3	26.3	26.3	13.7	13.7	13.7	7.8	7.8	7.8

TAB. A.14.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 9 de l'acide urique selon l'hypothèse B' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

A.3. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU MONOANION 7 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	71.3	71.3	71.3	71.5	71.5	71.5	71.5	71.5	71.5	70.9	70.9	70.9
III	30.2	30.2	30.2	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	27.4	27.4	27.4
IV	—	—	72.8*	—	—	?	—	—	?	—	—	?
V	62.9	—	—	61.7	—	—	61.7	—	—	60.0	—	—
VII	—	—	5.3	—	—	7.4	—	—	7.4	—	—	17.9
VIII	—	140.1	—	—	137.0	—	—	137.1	—	—	135.1	—
X	—	95.5	95.5	—	94.7	94.7	—	94.7	94.7	—	92.9	92.9
XI	—	122.1	122.1	—	121.5	121.5	—	121.5	121.5	—	120.4	120.4
XII	65.2	—	—	66.1	—	—	65.5	—	—	73.6	—	—
XIV	14.5	14.5	14.5	17.2	17.2	17.2	16.6	16.6	16.6	25.9	25.9	25.9

TAB. A.15.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

AUN ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	71.3	71.3	71.3	71.5	71.5	71.5	71.5	71.5	71.5	70.9	70.9	70.9
III	30.2	30.2	30.2	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	29.5	27.4	27.4	27.4
V	62.9	—	—	61.7	—	—	61.7	—	—	60.0	—	—
VI	—	—	45.6	—	—	46.7	—	—	45.9	—	—	55.8
VIII	—	140.1	—	—	137.0	—	—	137.1	—	—	135.1	—
IX	—	—	13.6	—	—	15.5	—	—	14.9	—	—	25.0
X	—	95.5	95.5	—	94.7	94.7	—	94.7	94.7	—	92.9	92.9
XI	—	122.1	122.1	—	121.5	121.5	—	121.5	121.5	—	120.4	120.4
XIII	50.5	—	—	52.0	—	—	51.5	—	—	51.8	—	—
XV	13.7	13.7	13.7	16.5	16.5	16.5	15.9	15.9	15.9	25.1	25.1	25.1

TAB. A.16.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le monoanion 9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.4. Réactivité intrinsèque du dianion 1-3 de l'acide urique

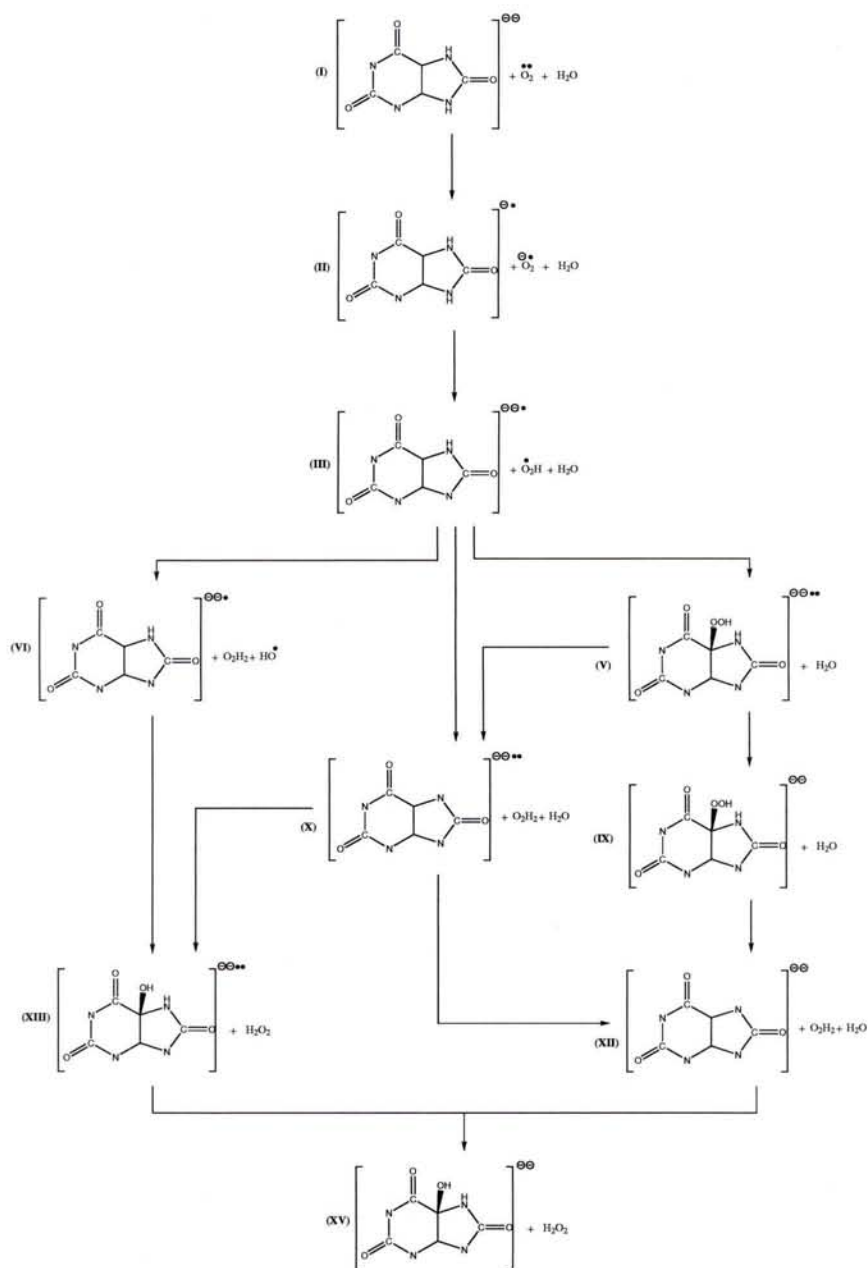


FIG. A.9.: Oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 (Hypothèse A).

A.4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 1-3 DE L'ACIDE URIQUE

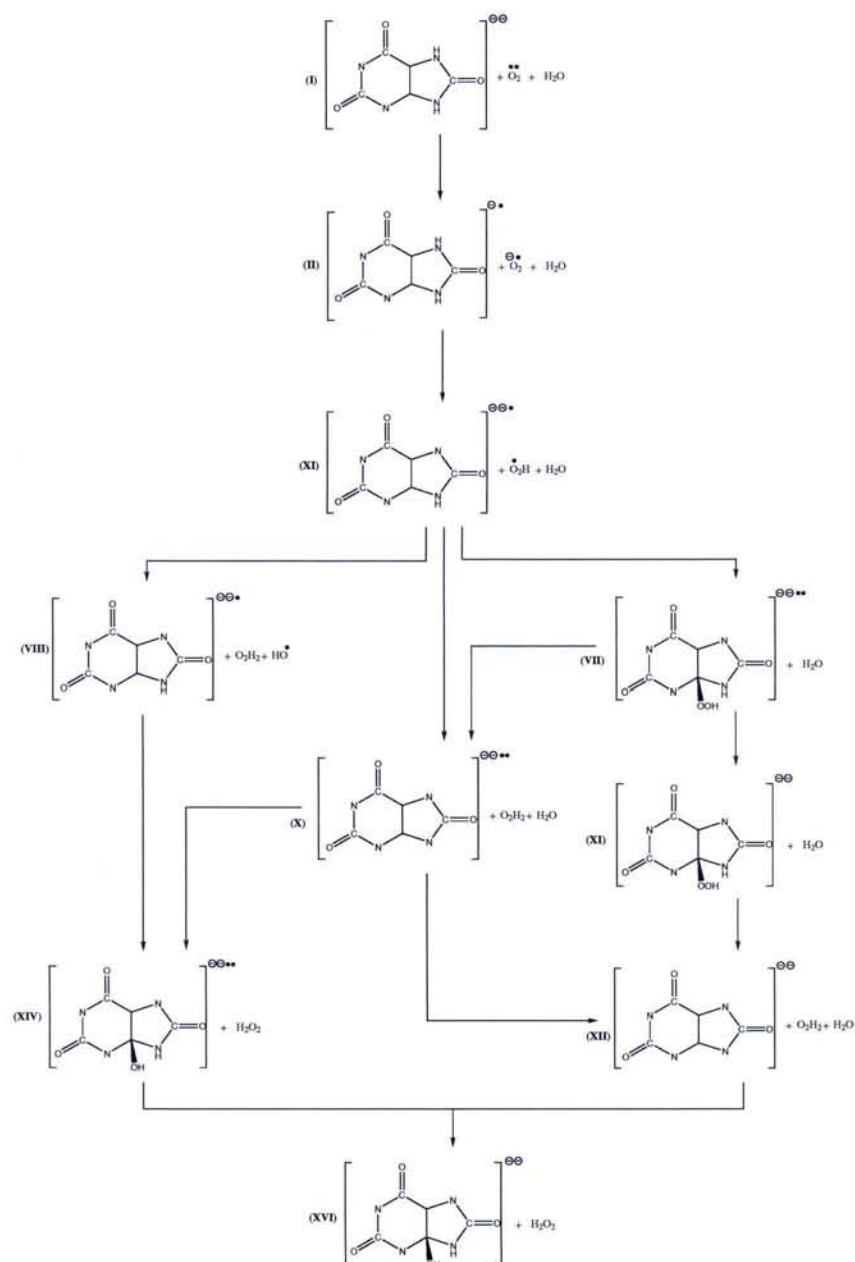


FIG. A.10.: Oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 (Hypothèse B).

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₁ ⁻ N ₃ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-37.8	-37.8	-37.8	-40.3	-40.3	-40.3	-42.8	-42.8	-42.8	-26.3	-26.3	-26.3
III	7.5	7.5	7.5	10.0	10.0	10.0	11.2	11.2	11.2	28.8	28.8	28.8
V	—	—	0.4	—	—	44.1	—	—	31.6*	—	—	46.1*
VI	25.7	—	—	31.9	—	—	43.8	—	—	56.5	—	—
IX	—	—	-31.0	—	—	-20.9	—	—	-38.5	—	—	-43.9
X	—	2.4	—	—	36.0	—	—	22.3	—	—	51.5	—
XII	—	-19.6	-19.6	—	0.6	0.6	—	-12.9	-12.9	—	-13.0	-13.0
XIII	-0.9	—	—	56.4	—	—	38.8	—	—	53.6	—	—
XV	-35.5	-35.5	-35.5	-14.9	-14.9	-14.9	-27.7	-27.7	-27.7	-29.8	-29.8	-29.8

TAB. A.17.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₁ ⁻ N ₃ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-37.8	-37.8	-37.8	-40.3	-40.3	-40.3	-42.8	-42.8	-42.8	-26.3	-26.3	-26.3
IV	7.8	7.8	7.8	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4	25.0	25.0	25.0
VII	—	—	0.1	—	—	24.8	—	—	16.3	—	—	28.4
VIII	25.9	—	—	31.3	—	—	42.0	—	—	52.6	—	—
X	—	2.4	—	—	36.0	—	—	22.3	—	—	51.5	—
XI	—	—	-10.3	—	—	7.0	—	—	-12.2	—	—	-17.6
XII	—	-19.6	-19.6	—	0.6	0.6	—	-12.9	-12.9	—	-13.0	-13.0
XIV	-4.9	—	—	33.0	—	—	29.0	—	—	41.6	—	—
XVI	-9.5	-9.5	-9.5	11.9	11.9	11.9	-2.5	-2.5	-2.5	-4.6	-4.6	-4.6

TAB. A.18.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₁ ⁻ N ₃ ⁻	ΔE			ΔE_{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-42.8	-42.8	-42.8	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2
III	11.2	11.2	11.2	9.9	9.9	9.9	9.9	9.9	9.9	8.4	8.4	8.4
V	—	—	31.6*	—	—	32.6	—	—	31.9	—	—	41.8
VI	43.8	—	—	42.1	—	—	42.1	—	—	41.0	—	—
IX	—	—	-38.5	—	—	-36.2	—	—	-36.8	—	—	-24.2
X	—	22.3	—	—	19.4	—	—	19.4	—	—	18.4	—
XII	—	-12.9	-12.9	—	-13.3	-13.3	—	-13.3	-13.3	—	-14.4	-14.4
XIII	38.8	—	—	39.9	—	—	39.3	—	—	48.6	—	—
XV	-27.7	-27.7	-27.7	-24.6	-24.6	-24.6	-25.2	-25.2	-25.2	-14.4	-14.4	-14.4

TAB. A.19.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 1-3 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.4. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 1-3 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₁ N ₃ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-42.8	-42.8	-42.8	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2	-43.2
IV	9.4	9.4	9.4	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3	6.6	6.6	6.6
VII	—	—	16.3	—	—	16.4	—	—	15.8	—	—	27.0
VIII	42.0	—	—	40.5	—	—	40.5	—	—	39.2	—	—
X	—	22.3	—	—	19.4	—	—	19.4	—	—	18.4	—
XI	—	—	-12.2	—	—	-10.6	—	—	-11.2	—	—	1.0
XII	—	-12.9	-12.9	—	-13.3	-13.0	—	-13.3	-13.3	—	-14.4	-14.4
XIV	29.0	—	—	29.9	—	—	29.3	—	—	38.9	—	—
XVI	-2.5	-2.5	-2.5	-0.4	-0.4	-0.4	-1.0	-1.0	-1.0	9.3	9.3	9.3

TAB. A.20.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 1-3 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.5. Réactivité intrinsèque du dianion 1-7 de l'acide urique

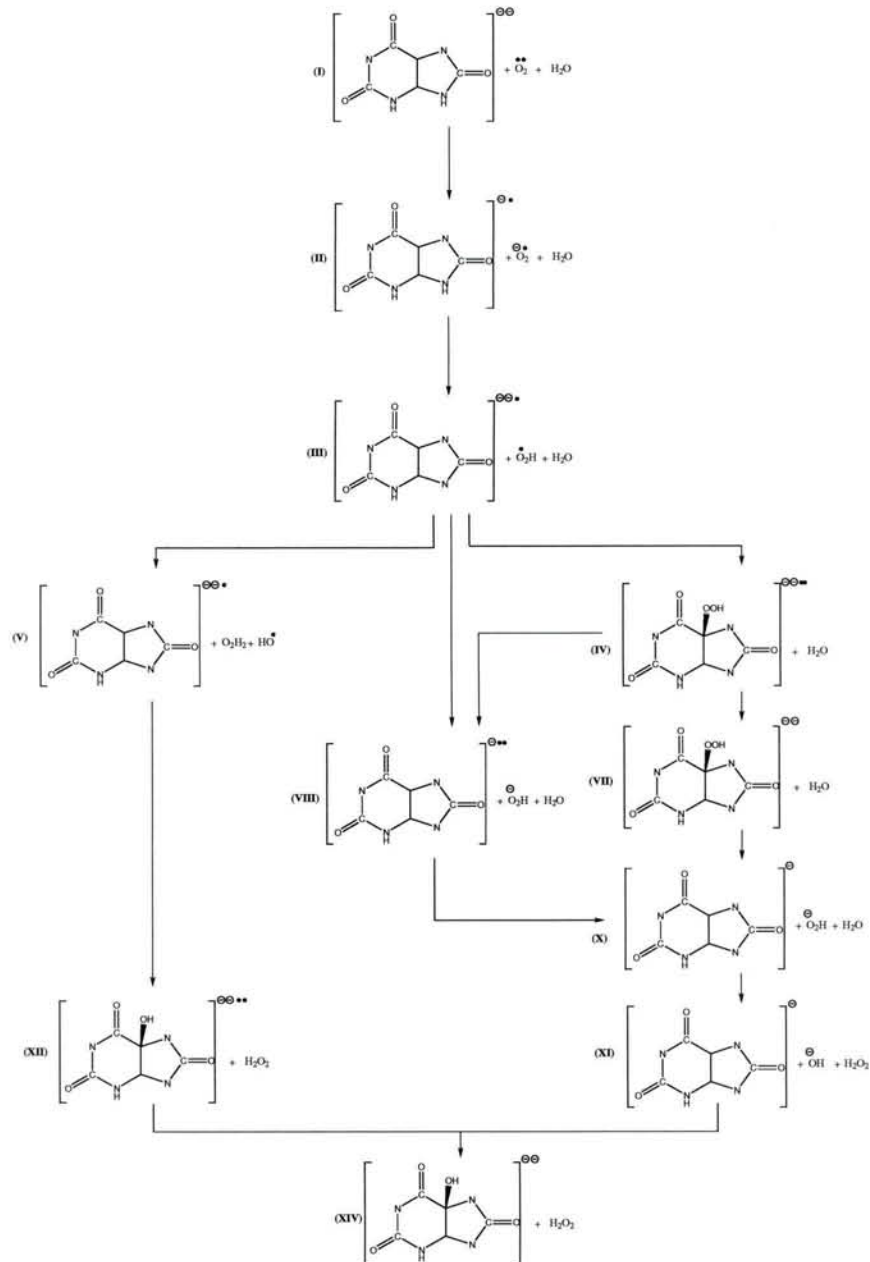


FIG. A.11.: Oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse A).

A.5. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 1-7 DE L'ACIDE URIQUE

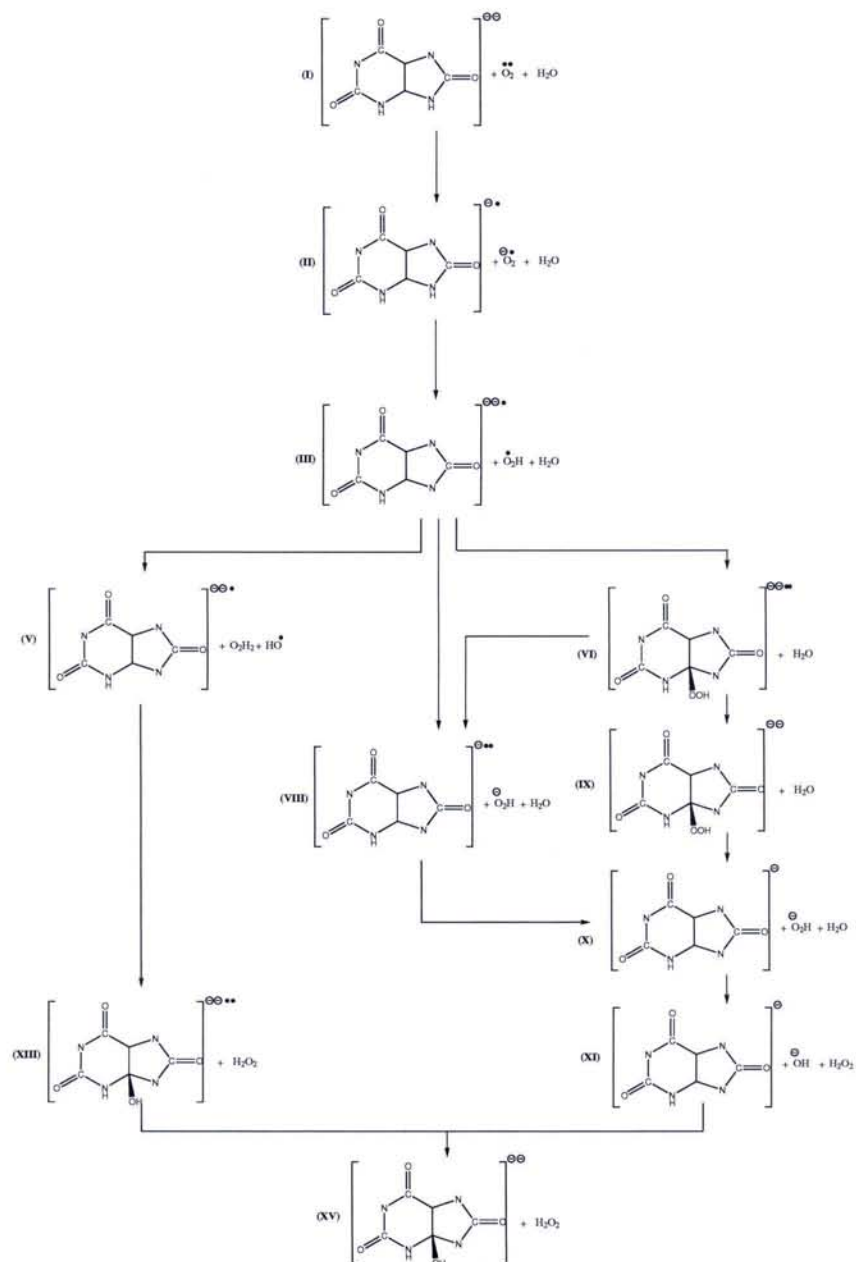


FIG. A.12.: Oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O_2 et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse A').

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₁ N ₇ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-35.4	-35.4	-35.4	-35.2	-35.2	-35.2	-42.4	-42.4	-42.4	-31.0	-31.0	-31.0
III	5.1	5.1	5.1	3.6	3.6	3.6	5.3	5.3	5.3	20.8	20.8	20.8
IV	—	—	-1.0	—	—	26.3	—	—	29.9*	—	—	43.7*
V	23.2	—	—	25.6	—	—	37.9	—	—	48.5	—	—
VII	—	—	-26.5	—	—	-17.1	—	—	-33.2	—	—	-37.2
VIII	—	-3.2	—	—	-4.3	—	—	5.5	—	—	43.7	—
X	—	-36.8	-36.8	—	-28.5	-28.5	—	-37.4	-37.4	—	-35.4	-35.4
XI	—	-17.7	-17.7	—	0.1	0.1	—	-10.8	-10.8	—	-9.3	-9.3
XII	-2.4	—	—	34.0	—	—	36.5	—	—	48.7	—	—
XIV	-28.0	-28.0	-28.0	-6.9	-6.9	-6.9	-18.4	-18.4	-18.4	-20.1	-20.1	-20.1

TAB. A.21.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₁ N ₇ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-35.4	-35.4	-35.4	-35.2	-35.2	-35.2	-42.4	-42.4	-42.4	-31.0	-31.0	-31.0
III	5.1	5.1	5.1	3.6	3.6	3.6	5.3	5.3	5.3	20.8	20.8	20.8
V	23.2	—	—	25.6	—	—	37.9	—	—	48.5	—	—
VI	—	—	2.3	—	—	21.9	—	—	19.8	—	—	29.3
VIII	—	-3.2	—	—	-4.3	—	—	5.5	—	—	43.7	—
IX	—	—	-23.0	—	—	-9.7	—	—	-32.7	—	—	-38.2
X	—	-36.8	-36.8	—	-28.5	-28.5	—	-37.4	-37.4	—	-35.4	-35.4
XI	—	-17.7	-17.7	—	0.1	0.1	—	-10.8	-10.8	—	-9.3	-9.3
XIII	8.5	—	—	40.3	—	—	30.1	—	—	41.6	—	—
XV	-30.8	-30.8	-30.8	-3.9	-3.9	-3.9	-15.6	-15.6	-15.6	-19.8	-19.8	-19.8

TAB. A.22.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

A.5. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 1-7 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₁ N ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-42.4	-42.4	-42.4	-41.3	-41.3	-41.3	-41.3	-41.3	-41.3	-43.0	-43.0	-43.0
III	5.3	5.3	5.3	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	3.3	3.3	3.3
IV	—	—	29.9*	—	—	30.0	—	—	30.0	—	—	39.9
V	37.9	—	—	38.2	—	—	28.2	—	—	36.0	—	—
VII	—	—	-33.2	—	—	-29.1	—	—	-30.2	—	—	-20.1
VIII	—	5.5	—	—	3.0	—	—	3.0	—	—	0.4	—
X	—	-37.4	-37.4	—	-36.8	-36.8	—	-36.8	-36.8	—	-39.2	-39.2
XI	—	-10.8	-10.8	—	-10.0	-10.0	—	-10.0	-10.0	—	-11.8	-11.8
XII	36.5	—	—	39.6	—	—	39.0	—	—	46.9	—	—
XIV	-18.4	-18.4	-18.4	-14.0	-14.0	-14.0	-14.7	-14.7	-14.7	-5.7	-5.7	-5.7

TAB. A.23.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 1-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

AUN ₁ N ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-42.4	-42.4	-42.4	-41.3	-41.3	-41.3	-41.3	-41.3	-41.3	-43.0	-43.0	-43.0
III	5.3	5.3	5.3	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	3.3	3.3	3.3
V	37.9	—	—	38.2	—	—	28.2	—	—	26.0	—	—
VI	—	—	19.8	—	—	21.9	—	—	21.1	—	—	30.4
VIII	—	5.5	—	—	3.0	—	—	3.0	—	—	0.4	—
IX	—	—	-32.7	—	—	-30.3	—	—	-29.7	—	—	-18.9
X	—	-37.4	-37.4	—	-36.8	-36.8	—	-36.8	-36.8	—	-39.2	-39.2
XI	—	-10.8	-10.8	—	-10.0	-10.0	—	-10.0	-10.0	—	-11.8	-11.8
XIII	30.1*	—	—	30.0	—	—	30.4	—	—	39.0	—	—
XV	-15.6	-15.6	-15.6	-13.9	-13.9	-13.9	-14.0	-14.0	-14.0	-3.0	-3.0	-3.0

TAB. A.24.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A' pour le dianion 1-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.6. Réactivité intrinsèque du dianion 1-9 de l'acide urique

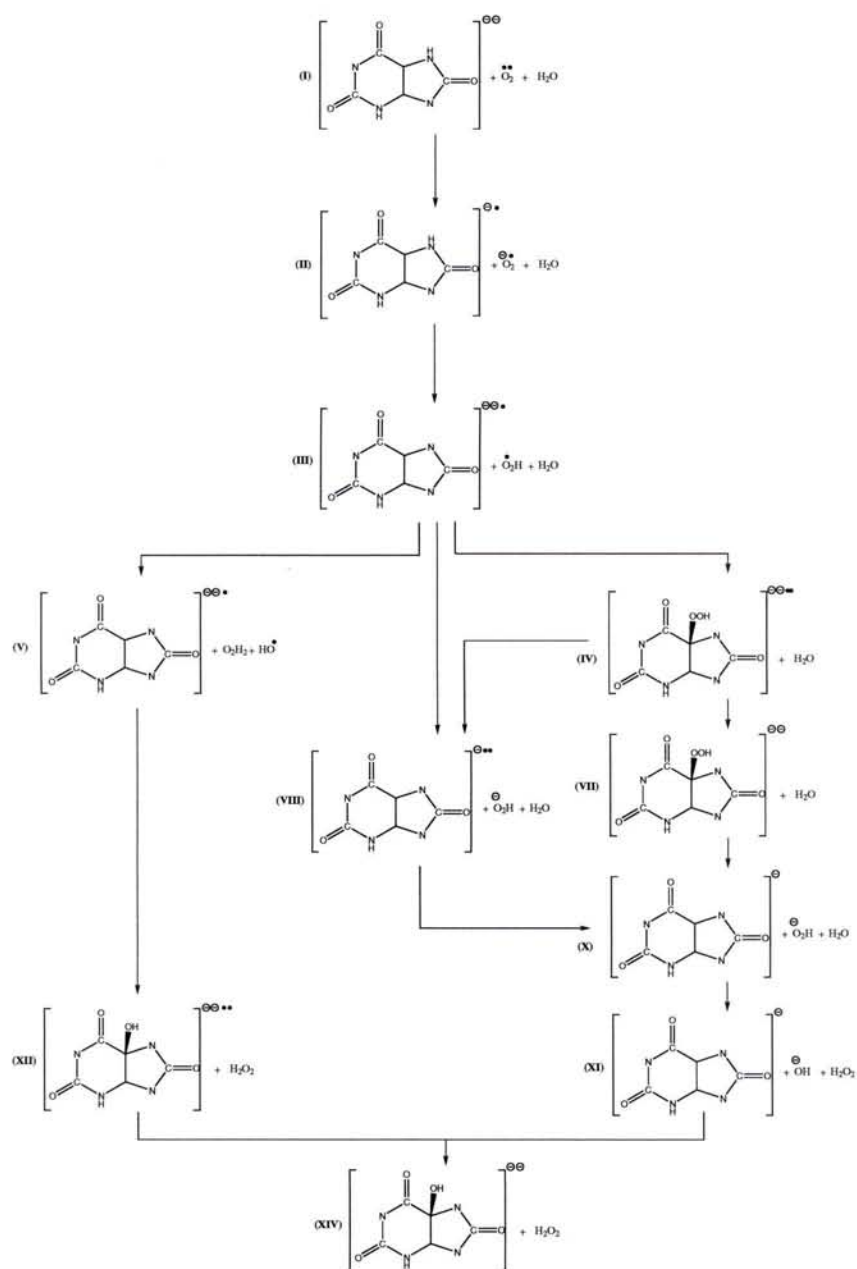


FIG. A.13.: Oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse B).

A.6. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 1-9 DE L'ACIDE URIQUE

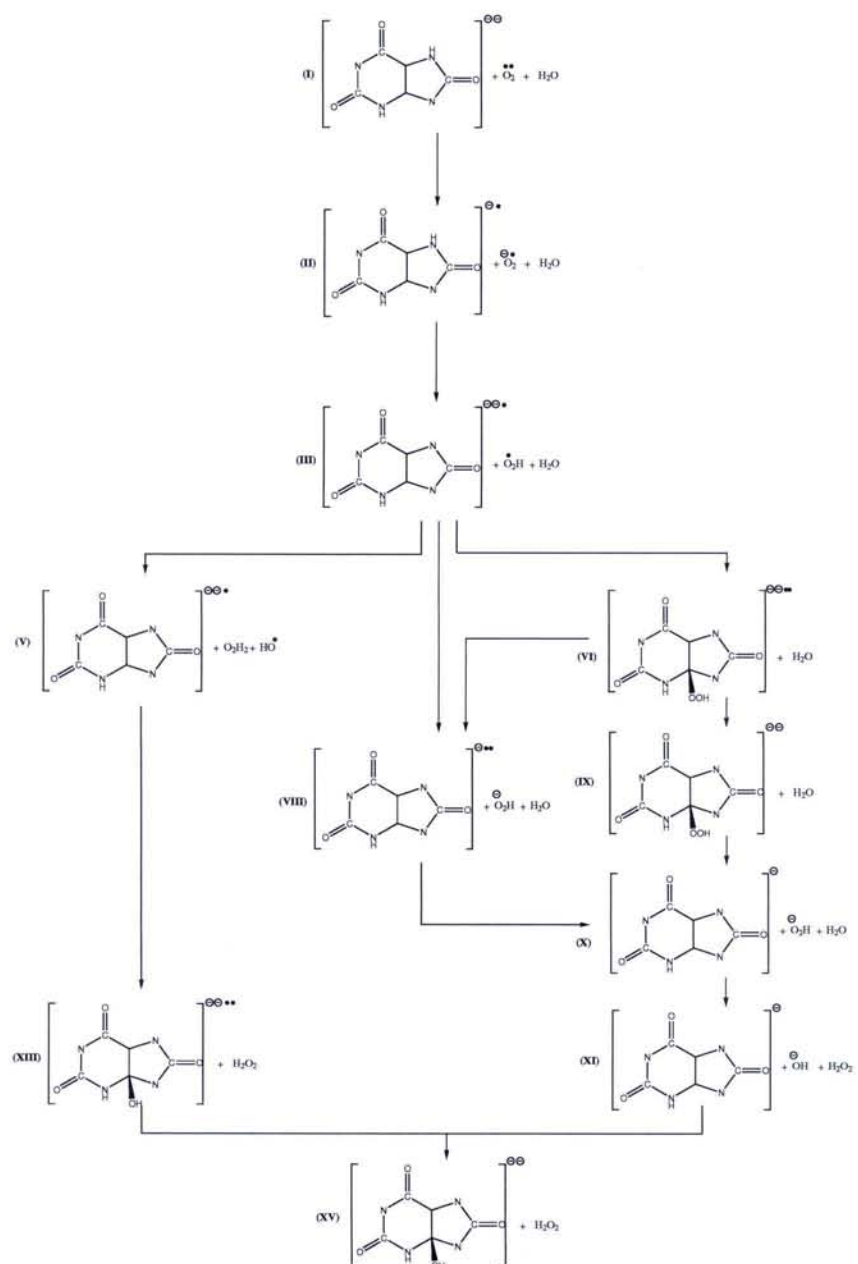


FIG. A.14.: Oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse B).

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₁ N ₉ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-29.6	-29.6	-29.6	-30.4	-30.4	-30.4	-36.6	-36.6	-36.6	-25.9	-25.9	-25.9
III	18.7	18.7	18.7	23.1	23.1	23.1	21.8	21.8	21.8	36.3	36.3	36.3
IV	—	—	12.6	—	—	45.7	—	—	46.5*	—	—	59.2*
V	36.8	—	—	45.0	—	—	54.5	—	—	64.0	—	—
VII	—	—	-13.9	—	—	2.3	—	—	-16.6	—	—	-21.6
VIII	—	10.4	—	—	15.2	—	—	22.1	—	—	59.2	—
X	—	-23.2	-23.2	—	-9.0	-9.0	—	-20.8	-20.8	—	-19.9	-19.9
XI	—	-4.0	-4.0	—	19.5	19.5	—	5.8	5.8	—	6.2	6.2
XII	11.2	—	—	53.5	—	—	53.1	—	—	64.3	—	—
XIV	-14.4	-14.4	-14.4	12.6	12.6	12.6	-1.8	-1.8	-1.8	-4.6	-4.6	-4.6

TAB. A.25.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₁ N ₉ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-29.6	-29.6	-29.6	-30.4	-30.4	-30.4	-36.6	-36.6	-36.6	-25.9	-25.9	-25.9
III	18.7	18.7	18.7	23.1	23.1	23.1	21.8	21.8	21.8	36.3	36.3	36.3
V	34.8	—	—	45.0	—	—	54.5	—	—	64.0	—	—
VI	—	—	15.9	—	—	41.4	—	—	36.1	—	—	44.8
VIII	—	10.4	—	—	15.2	—	—	22.1	—	—	59.2	—
IX	—	—	-9.3	—	—	9.8	—	—	-16.4	—	—	-22.7
X	—	-23.2	-23.2	—	-9.0	-9.0	—	-20.8	-20.8	—	-19.9	-19.9
XI	—	-4.0	-4.0	—	19.5	19.5	—	5.8	5.8	—	6.2	6.2
XIII	17.1	—	—	59.8	—	—	46.5	—	—	57.1	—	—
XV	-17.2	-17.2	-17.2	15.6	15.6	15.6	0.8	0.8	0.8	-4.3	-4.3	-4.3

TAB. A.26.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

A.6. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 1-9 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₁ ⁻ N ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-36.6	-36.6	-36.6	-36.3	-36.3	-36.3	-36.3	-36.3	-36.3	-36.9	-36.9	-36.9
III	21.8	21.8	21.8	21.4	21.4	21.4	21.4	21.4	21.4	19.3	19.3	19.3
IV	—	—	46.5*	—	—	46.5	—	—	46.5	—	—	55.9
V	54.5	—	—	53.6	—	—	53.6	—	—	51.9	—	—
VII	—	—	-16.6	—	—	-14.3	—	—	-14.9	—	—	-3.6
VIII	—	22.1	—	—	18.3	—	—	18.3	—	—	16.4	—
X	—	-20.8	-20.8	—	-21.5	-21.5	—	-21.5	-21.5	—	-23.2	-23.2
XI	—	5.8	5.8	—	5.3	5.3	—	5.3	5.3	—	4.2	4.2
XII	53.1	—	—	54.9	—	—	54.3	—	—	62.9	—	—
XIV	-1.8	-1.8	-1.8	1.3	1.3	1.3	0.7	0.7	0.7	10.3	10.3	10.3

TAB. A.27.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 1-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

AUN ₁ ⁻ N ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-36.6	-36.6	-36.6	-36.3	-36.3	-36.3	-36.3	-36.3	-36.3	-36.9	-36.9	-36.9
III	21.8	21.8	21.8	21.4	21.4	21.4	21.4	21.4	21.4	19.3	19.3	19.3
V	54.5	—	—	53.6	—	—	53.6	—	—	51.9	—	—
VI	—	—	36.1	—	—	37.0	—	—	36.4	—	—	46.3
VIII	—	22.1	—	—	18.3	—	—	18.3	—	—	16.4	—
IX	—	—	-16.4	—	—	-13.8	—	—	-14.4	—	—	-2.9
X	—	-20.8	-20.8	—	-21.5	-21.5	—	-21.5	-21.5	—	-23.2	-23.2
XI	—	5.8	5.8	—	5.3	5.3	—	5.3	5.3	—	4.2	4.2
XIII	46.5	—	—	46.5	—	—	46.8	—	—	55.0	—	—
XV	0.8	0.8	0.8	2.6	2.6	2.6	2.5	2.5	2.5	13.0	13.0	13.0

TAB. A.28.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le dianion 1-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.7. Réactivité intrinsèque du dianion 3-7 de l'acide urique

AUN ₃ N ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-47.7	-47.7	-47.7	-47.6	-47.6	-47.6	-47.6	-47.6	-47.6	-47.9	-47.9	-47.9
III	19.0	19.0	19.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	16.3	16.3	16.3
IV	—	—	51.4	—	—	50.1	—	—	50.1	—	—	60.3
V	51.6	—	—	50.2	—	—	50.2	—	—	48.9	—	—
VII	—	—	-17.7	—	—	-16.1	—	—	-16.7	—	—	-5.2
VIII	—	17.2	—	—	13.8	—	—	13.8	—	—	12.0	—
X	—	-26.5	-26.5	—	-27.5	-27.5	—	-27.5	-27.5	—	-29.0	-29.0
XI	—	0.2	0.2	—	-0.7	-0.7	—	-0.7	-0.7	—	-1.6	-1.6
XII	70.7	—	—	69.9	—	—	69.9	—	—	79.0	—	—
XIV	-1.1	-1.1	-1.1	1.3	1.3	1.3	0.7	0.7	0.7	10.5	10.5	10.5

TAB. A.29.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₃ N ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-47.7	-47.7	-47.7	-47.6	-47.6	-47.6	-47.6	-47.6	-47.6	-47.9	-47.9	-47.9
III	19.0	19.0	19.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	16.3	16.3	16.3
V	51.6	—	—	50.2	—	—	50.2	—	—	48.9	—	—
VI	—	—	35.7	—	—	35.7	—	—	35.1	—	—	45.0
VIII	—	17.2	—	—	13.8	—	—	13.8	—	—	12.0	—
IX	—	—	-5.2	—	—	-3.8	—	—	-4.4	—	—	6.9
X	—	-26.5	-26.5	—	-27.5	-27.5	—	-27.5	-27.5	—	-29.0	-29.0
XI	—	0.2	0.2	—	-0.7	-0.7	—	-0.7	-0.7	—	-1.6	-1.6
XIII	44.9	—	—	46.0	—	—	45.4	—	—	54.4	—	—
XV	12.5	12.5	12.5	14.5	14.5	14.5	13.9	13.9	13.9	23.5	23.5	23.5

TAB. A.30.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

A.7. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 3-7 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₃ N ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-52.1	-52.1	-52.1	-52.0	-52.0	-52.0	-52.0	-52.0	-52.0	-52.3	-52.3	-52.3
III	19.3	19.3	19.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	16.6	16.6	16.6
IV	—	—	52.1	—	—	52.0	—	—	52.0	—	—	60.0
V	52.0	—	—	50.6	—	—	50.6	—	—	49.3	—	—
VII	—	—	-13.7	—	—	-12.1	—	—	-12.7	—	—	-1.1
VIII	—	-2.8	—	—	-4.9	—	—	-4.9	—	—	-7.0	—
X	—	-35.5	-35.5	—	-36.4	-36.4	—	-36.4	-36.4	—	-37.8	-37.8
XI	—	-20.3	-20.3	—	-20.8	-20.8	—	-20.8	-20.8	—	-21.6	-21.6
XII	70.0	—	—	69.1	—	—	69.1	—	—	79.0	—	—
XIV	0.4	0.4	0.4	2.9	2.9	2.9	2.3	2.3	2.3	12.2	12.2	12.2

TAB. A.31.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 3-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

AUN ₃ N ₇ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-52.1	-52.1	-52.1	-52.0	-52.0	-52.0	-52.0	-52.0	-52.0	-52.3	-52.3	-52.3
III	19.3	19.3	19.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	18.3	16.6	16.6	16.6
V	52.0	—	—	50.6	—	—	50.6	—	—	49.3	—	—
VI	—	—	38.4	—	—	38.5	—	—	37.9	—	—	47.9
VIII	—	-2.8	—	—	-4.9	—	—	-4.9	—	—	-7.0	—
IX	—	—	-2.0	—	—	-0.6	—	—	-0.6	—	—	10.2
X	—	-35.5	-35.5	—	-36.4	-36.4	—	-36.4	-36.4	—	-37.8	-37.8
XI	—	-20.3	-20.3	—	-20.8	-20.8	—	-20.8	-20.8	—	-21.6	-21.6
XIII	46.0	—	—	47.2	—	—	46.6	—	—	55.6	—	—
XV	13.6	13.6	13.6	15.7	15.7	15.7	15.1	15.1	15.1	24.6	24.6	24.6

TAB. A.32.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A' pour le dianion 3-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

A.8. Réactivité intrinsèque du dianion 3-9 de l'acide urique

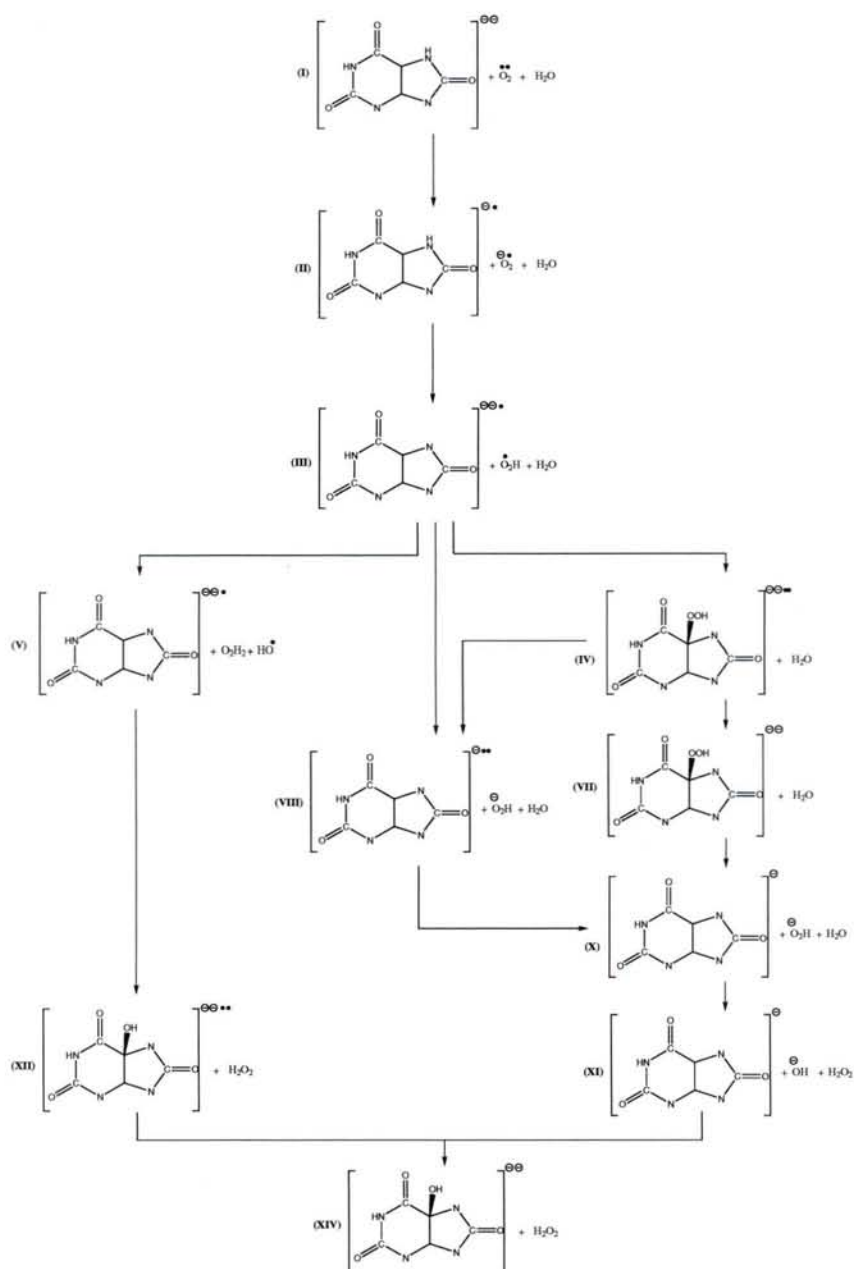


FIG. A.15.: Oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse B).

A.8. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 3-9 DE L'ACIDE URIQUE

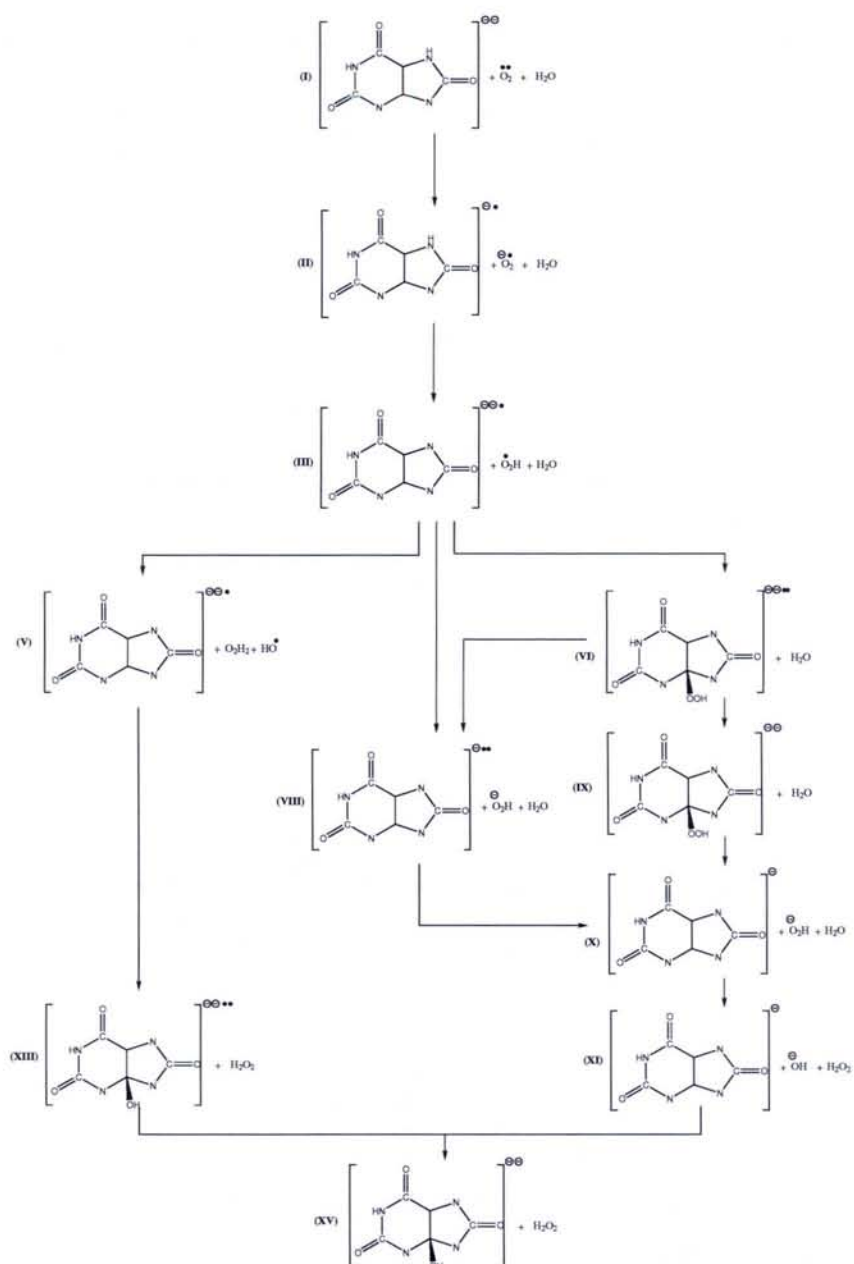


FIG. A.16.: Oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O_2 et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse B').

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₃ N ₉ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-35.0	-35.0	-35.0	-31.8	-31.8	-31.8	-38.1	-38.1	-38.1	-28.3	-28.3	-28.3
III	17.1	17.1	17.1	21.8	21.8	21.8	21.3	21.3	21.3	37.0	37.0	37.0
IV	—	—	29.2	—	—	63.0	—	—	55.7*	—	—	73.2*
V	35.2	—	—	43.7	—	—	53.9	—	—	64.7	—	—
VII	—	—	-12.2	—	—	3.5	—	—	-15.4	—	—	-21.1
VIII	—	-15.7	—	—	30.2	—	—	19.5	—	—	44.0	—
X	—	-28.6	-28.6	—	-12.7	-12.7	—	-24.2	-24.2	—	-24.3	-24.3
XI	—	-9.4	-9.4	—	15.9	15.9	—	2.5	2.5	—	1.8	1.8
XII	21.7	—	—	70.7	—	—	73.0*	—	—	87.7*	—	—
XIV	-12.8	-12.8	-12.8	15.2	15.2	15.2	1.2	1.2	1.2	-2.1	-2.1	-2.1

TAB. A.33.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

AUN ₃ N ₉ ⁻	PM3			HF/6-31G**			B3LYP/6-31G**			MP2//DFT/6-31G**		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-35.0	-35.0	-35.0	-31.8	-31.8	-31.8	-38.1	-38.1	-38.1	-28.3	-28.3	-28.3
III	17.1	17.1	17.1	21.8	21.8	21.8	21.3	21.3	21.3	37.0	37.0	37.0
V	35.2	—	—	43.7	—	—	53.9	—	—	64.7	—	—
VI	—	—	23.8	—	—	47.7	—	—	38.0	—	—	46.2
VIII	—	-15.7	—	—	30.2	—	—	19.5	—	—	44.0	—
IX	—	—	-2.8	—	—	18.7	—	—	-2.9	—	—	-11.1
X	—	-28.6	-28.6	—	-12.7	-12.7	—	-24.2	-24.2	—	-24.3	-24.3
XI	—	-9.4	-9.4	—	15.9	15.9	—	2.5	2.5	—	1.8	1.8
XIII	23.8	—	—	65.4	—	—	47.2	—	—	57.2	—	—
XV	-4.3	-4.3	-4.3	32.1	32.1	32.1	14.8	14.8	14.8	8.8	8.8	8.8

TAB. A.34.: Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).

A.8. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DU DIANION 3-9 DE L'ACIDE URIQUE

AUN ₃ N ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-38.1	-38.1	-38.1	-37.8	-37.8	-37.8	-37.8	-37.8	-37.8	-38.7	-38.7	-38.7
III	21.3	21.3	21.3	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	18.7	18.7	18.7
IV	—	—	55.7*	—	—	?	—	—	?	—	—	?
V	53.9	—	—	53.1	—	—	53.1	—	—	51.3	—	—
VII	—	—	-15.4	—	—	-15.4	—	—	-13.8	—	—	-2.8
VIII	—	19.5	—	—	16.7	—	—	16.7	—	—	14.4	—
X	—	-24.2	-24.2	—	-24.6	-24.6	—	-24.6	-24.6	—	-26.6	-26.6
XI	—	2.5	2.5	—	2.2	2.2	—	2.2	2.2	—	0.8	0.8
XII	73.0*	—	—	?	—	—	?	—	—	?	—	—
XIV	1.2	1.2	1.2	4.3	4.3	4.3	3.6	3.6	3.6	12.9	12.9	12.9

TAB. A.35.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

AUN ₃ N ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-38.1	-38.1	-38.1	-37.8	-37.8	-37.8	-37.8	-37.8	-37.8	-38.7	-38.7	-38.7
III	21.3	21.3	21.3	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	20.9	18.7	18.7
V	53.9	—	—	53.1	—	—	53.1	—	—	51.3	—	—
VI	—	—	38.0	—	—	38.6	—	—	38.0	—	—	47.4
VIII	—	19.5	—	—	16.7	—	—	16.7	—	—	14.4	—
IX	—	—	-2.9	—	—	-0.9	—	—	-1.5	—	—	9.3
X	—	-24.2	-24.2	—	-24.6	-24.6	—	-24.6	-24.6	—	-26.6	-26.6
XI	—	2.5	2.5	—	2.2	2.2	—	2.2	2.2	—	0.8	0.8
XIII	47.2	—	—	48.9	—	—	48.3	—	—	56.8	—	—
XV	14.8	14.8	14.8	17.4	17.4	17.4	16.8	16.8	16.8	25.9	25.9	25.9

TAB. A.36.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).

ANNEXE A. RÉACTIVITÉ INTRINSÈQUE DE L'ACIDE URIQUE ET DE SES ANIONS

AUN ₃ N ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-42.6	-42.6	-42.6	-42.3	-42.3	-42.3	-42.3	-42.3	-42.3	-43.2	-43.2	-43.2
III	22.1	22.1	22.1	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	19.7	19.7	19.7
IV	—	—	?	—	—	?	—	—	?	—	—	?
V	54.9	—	—	54.1	—	—	54.1	—	—	52.4	—	—
VII	—	—	-10.8	—	—	-8.6	—	—	-9.2	—	—	2.0
VIII	—	0.1	—	—	-1.4	—	—	-1.4	—	—	-3.9	—
X	—	-32.6	-32.6	—	-32.9	-32.9	—	-32.9	-32.9	—	-34.3	-34.3
XI	—	-17.4	-17.4	—	-17.3	-17.3	—	-17.3	-17.3	—	-18.5	-18.5
XII	?	—	—	?	—	—	?	—	—	?	—	—
XIV	3.3	3.3	3.3	6.5	6.5	6.5	5.8	5.8	5.8	15.3	15.3	15.3

TAB. A.37.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

AUN ₃ N ₉ ⁻	ΔE			ΔE _{ZPE}			ΔH			ΔG		
I	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0	00.0
II	-42.6	-42.6	-42.6	-42.3	-42.3	-42.3	-42.3	-42.3	-42.3	-43.2	-43.2	-43.2
III	22.1	22.1	22.1	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	21.8	19.7	19.7	19.7
V	54.9	—	—	54.1	—	—	54.1	—	—	52.4	—	—
VI	—	—	41.3	—	—	45.1	—	—	41.1	—	—	51.0
VIII	—	6.1	—	—	-1.4	—	—	-1.4	—	—	-3.9	—
IX	—	—	0.9	—	—	-2.9	—	—	-2.3	—	—	13.3
X	—	-32.6	-32.6	—	-32.9	-32.9	—	-32.9	-32.9	—	-34.3	-34.3
XI	—	-17.4	-17.4	—	-17.3	-17.3	—	-17.3	-17.3	—	-18.5	-18.5
XIII	48.9	—	—	50.7	—	—	50.1	—	—	58.7	—	—
XV	16.5	16.5	16.5	19.2	19.2	19.2	19.6	19.6	19.6	27.7	27.7	27.7

TAB. A.38.: Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).

Table des figures

2.1.	Réaction globale de l'acide urique avec O ₂	21
2.2.	Détail de la réaction de transformation de l'acide urique en allantoïne par l'urate oxydase.	22
2.3.	Structure tridimensionnelle de l'urate oxydase (a. monomère; b. dimère et c. tétramère).	24
2.4.	Structure de l'acide urique et de quelques inhibiteurs connus de l'urate oxydase.	25
2.5.	Position de la 8-azaxanthine et des molécules d'eau dans le site actif de 2UOX.	26
2.6.	Les liaisons hydrogènes entre l'acide urique et le site actif de l'urate oxydase d'après 2UOX.	27
2.7.	Mécanisme réactionnel proposé par Tipton <i>et al.</i> ^{76,85}	28
3.1.	Les quinze formes tautomères de l'acide urique. L'indexation de ces formes est celle de Chen <i>et al.</i> ⁹²	30
3.2.	Structures des monoanions de l'acide urique.	37
3.3.	Structures des dianions de l'acide urique.	38
4.1.	Trois hypothèses envisageables concernant l'initiation de la réaction d'oxydoréduction de l'acide urique par O ₂	50
4.2.	Deux transferts possibles de proton de l'acide urique vers O ₂	51
4.3.	Hypothèse A : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂ . (Par commodité, les représentations des composés dérivés de l'acide urique ne contiennent pas ici des ordres de liaisons correctes selon Lewis.)	53
4.4.	Hypothèse B : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂	54
4.5.	Réactivité du monoanion 3 de l'acide urique selon l'hypothèse A (transfert du proton H9 vers O ₂).	56
4.6.	Réactivité du monoanion 3 de l'acide urique selon l'hypothèse B (transfert du proton H7 vers O ₂).	57
4.7.	Réactivité du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A (transfert du proton H9 vers O ₂ et obtention du 5-hydroxyisourate).	62
4.8.	Réactivité du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' (transfert du proton H9 vers O ₂ et obtention du 4-hydroxyisourate).	63
5.1.	Position de la 8-azaxanthine et des molécules d'eau dans le site actif de 2UOX.	68

5.2. Les liaisons hydrogènes entre la 8-azaxanthine et le site actif de l'urate oxydase d'après 2UOX.	68
5.3. A la recherche des états de protonation de l'acide urique à l'intérieur du site actif de 2UOX.	69
5.4. Positionnement de l'intermédiaire 5-hydroperoxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.	73
5.5. Positionnement de l'intermédiaire 4-hydroperoxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.	74
5.6. Positionnement du produit 5-hydroxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.	75
5.7. Positionnement du produit 4-hydroxyisourate à l'intérieur du site actif de 2UOX.	77
6.1. Mécanisme réactionnel envisagé avec deux molécules d'eau.	83
6.2. Positionnement des réactifs (dianion 3-7, molécules d'eau W1 et W2, et dioxygène) à l'intérieur du site actif de 2UOX (optimisation PM3).	84
6.3. Chemin réactionnel avec deux molécules d'eau.	85
6.4. Diagramme énergétique du chemin réactionnel avec deux molécules d'eau.	90
6.5. Positionnement des réactifs (dianion 3-7, molécule d'eau W1 et dioxygène) à l'intérieur du site actif de 2UOX (optimisation PM3).	92
6.6. Chemin réactionnel avec une molécule d'eau.	92
6.7. Diagramme énergétique du chemin réactionnel avec une molécule d'eau.	95
6.8. Comparaison des diagrammes énergétiques des deux mécanismes incluant une ou deux molécules d'eau.	97
7.1. Structures des formes cationiques, neutres et anioniques dérivées à partir de la 8-azaxanthine déprotonée en position 3.	100
7.2. Réactivité de la 8-azaxanthine selon l'hypothèse A : transfert du proton H9 vers O ₂ et formation du 5-hydroxyiso-8-azaxanthine.	104
7.3. Réactivité de la 8-azaxanthine selon l'hypothèse A' : transfert du proton H9 vers O ₂ et formation du 4-hydroxyiso-8-azaxanthine.	105
7.4. A la recherche des états de protonation de la 8-azaxanthine à l'intérieur du site actif de 2UOX.	108
7.5. Structures possibles des monoanions de l'acide 9-méthyl urique.	110
7.6. Structures des dianions du 9-méthyl urique.	111
7.7. A la recherche des états de protonation de l'acide 9-méthyl urique à l'intérieur du site actif de 2UOX.	113
7.8. Quelques ligands connus de l'urate oxydase (charge moléculaire entre parenthèses).	115
8.1. Réactivité de la 8-hydroxyxanthine selon l'hypothèse A : transfert du proton H9 vers O ₂ et obtention du 5-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine.	123
8.2. Réactivité de la 8-hydroxyxanthine selon l'hypothèse A' : transfert du proton H9 vers O ₂ et obtention du 4-hydroxyiso-8-hydroxyxanthine.	124
8.3. Interactions des formes anioniques de la 8-hydroxyxanthine avec le site actif de 2UOX.	127

8.4. Une première réactivité possible de la 8-hydroxyxanthine dans 2UOX.	130
8.5. Une deuxième réactivité possible de la 8-hydroxyxanthine dans 2UOX.	131
8.6. La réactivité directe possible du monoanion 3 de l'acide urique dans 2UOX.	132
A.1. Hypothèse A : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂	138
A.2. Hypothèse B : oxydation de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂	139
A.3. Oxydation du monoanion 1 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂ (Hypothèse A).	142
A.4. Oxydation du monoanion 1 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ (Hypothèse B).	143
A.5. Oxydation du monoanion 7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂ et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse A).	146
A.6. Oxydation du monoanion 7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂ et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse A').	147
A.7. Oxydation du monoanion 9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse B).	150
A.8. Oxydation du monoanion 9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse B').	151
A.9. Oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂ (Hypothèse A).	154
A.10. Oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ (Hypothèse B).	155
A.11. Oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂ et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse A).	158
A.12. Oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique avec transfert du proton H9 vers O ₂ et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse A').	159
A.13. Oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse B).	162
A.14. Oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse B).	163
A.15. Oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ et formation du 4-hydroxyisourate (Hypothèse B).	168
A.16. Oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique avec transfert du proton H7 vers O ₂ et formation du 5-hydroxyisourate (Hypothèse B').	169

Liste des tableaux

2.1. Longueurs d'onde maximales des intermédiaires proposées par Tipton <i>et al.</i> (INT I : forme dianionique de l'acide urique dans l'urate oxydase ; INT II : intermédiaire 5-hydroperoxyisourate ; HIU : intermédiaire 5-hydroxyisourate ; OHCU : allantoïne).	23
3.1. Energies totales (E, en hartrees), énergies relatives (ΔE , en kcal/mol), et moments dipolaires (μ , en Debye) de l'acide urique et de ses formes tautomères en phase gazeuse et en solution.	32
3.2. Correction d'énergie de point zéro (ZPE), énergie libre relative (ΔG) et entropie (S) pour l'acide urique et ses tautomères dans le vide (en kcal/mol).	34
3.3. Energie relative en phase gazeuse et dans l'eau, énergie totale de solvatation, interaction soluté-solvant, énergie de polarisation et moment dipolaire en solution pour l'acide urique et ses tautomères au niveau de B3LYP/6-31G** (énergies en kcal/mol, moments dipolaires en Debye).	35
3.4. Charges atomiques selon Mülliken et Löwdin en <i>u.a.</i> pour l'acide urique naturel (U0A) en phase gazeuse et dans le solvant au niveau de B3LYP/6-31G**.	36
3.5. Ordres de liaisons pour l'acide urique naturel (U0A) en phase gazeuse et dans le solvant au niveau de B3LYP/6-31G**.	36
3.6. Energies relatives des monoanions dérivés de l'acide urique par rapport au monoanion 3 (en kcal/mol).	39
3.7. Energies relatives des dianions dérivés de l'acide urique par rapport au dianion 3-9 (en kcal/mol).	40
3.8. Potentiels d'ionisation (IP) de l'acide urique et de ses monoanions (en kcal/mol).	41
3.9. Potentiels d'ionisation (IP) des dianions de l'acide urique (en kcal/mol).	41
3.10. Affinité électronique (EA) du dioxygène (en kcal/mol).	42
3.11. Longueurs d'onde maximales d'absorption de l'acide urique et de ses anions entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode ZINDO en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).	44
3.12. Longueurs d'onde maximales d'absorption de l'acide urique et de ses anions entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode CIS en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).	45

3.13. Longueurs d'onde maximales d'absorption de l'acide urique et de ses mono-anions entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode TD-DFT en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).	46
3.14. Longueurs d'onde maximales d'absorption des dianions de l'acide urique entre 200 et 340 nm déterminées par la méthode TD-DFT en phase gazeuse et dans le solvant (λ_{max} en nm et forces d'oscillateur correspondantes en a.u.).	47
4.1. Energies relatives des réactions de transfert d'hydrure (Hyp1), de proton (Hyp2) et d'hydrogène (Hyp3) pour l'acide urique, le monoanion 3 et le dianion 3-7 (en kcal/mol).	50
4.2. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 3 selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	55
4.3. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 3 selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	55
4.4. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	59
4.5. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	60
4.6. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	60
4.7. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 3 d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	61
4.8. Energies relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 3-7 et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	61
4.9. Energies relatives selon l'hypothèse A' pour le dianion 3-7 et en fonction différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	64
5.1. Energies relatives de stabilité des monoanions de l'acide urique dans le site actif de 2UOX par rapport au monoanion 3 (en kcal/mol).	70
5.2. Energies relatives de stabilité des dianions de l'acide urique par rapport au dianion 3-7 (en kcal/mol).	71
5.3. Potentiels d'ionisation des formes monoanioniques de l'acide urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	71
5.4. Potentiels d'ionisation des formes dianioniques de l'acide urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	72

5.5. Energies relatives de stabilité des monoanions 5-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	73
5.6. Energies relatives de stabilité des dianions 5-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	74
5.7. Energies relatives de stabilité des monoanions 4-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	74
5.8. Energies relatives de stabilité des monoanions 4-hydroperoxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	75
5.9. Energies relatives de stabilité des monoanions 5-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	76
5.10. Energies relatives de stabilité des dianions 5-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	76
5.11. Energies relatives de stabilité des monoanions 4-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	77
5.12. Energies relatives de stabilité des dianions 4-hydroxyisourate par rapport à leurs réactifs respectifs (en kcal/mol).	77
5.13. Energies relatives des produits par rapport aux réactifs monoanioniques dans le site actif de 2UOX et d'après le niveau B3LYP/6-31G**//PM3 (en kcal/mol).	78
5.14. Energies relatives des produits par rapport aux réactifs dianioniques dans le site actif de 2UOX et d'après le niveau B3LYP/6-31G**//PM3 (en kcal/mol).	78
6.1. Variations de quelques distances dans le chemin réactionnel avec deux molécules d'eau par PM3 (distance en angströms).	86
6.2. Variations de quelques angles dans le chemin réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3 (angles en degrés).	87
6.3. Energies relatives des différentes structures apparaissant dans le mécanisme réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3 (en kcal/mol).	87
6.4. Densités de spin des différentes structures du chemin réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3.	89
6.5. Charges atomiques de Mulliken pour les différentes structures du chemin réactionnel avec deux molécules d'eau selon PM3.	91
6.6. Variations de quelques distances dans le chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3 (distance en angströms).	93
6.7. Variations des angles dans le chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3 (angles en degrés).	94
6.8. Energies relatives des différentes structures apparaissant dans le mécanisme réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3 (en kcal/mol).	94
6.9. Densités de spin des différentes structures du chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3.	96
6.10. Charges atomiques de Mulliken pour les différentes structures du chemin réactionnel avec une molécule d'eau selon PM3.	97

7.1. Energies relatives des formes neutres de la 8-azaxanthine Aza-7, Aza-8 et Aza-9 (en kcal/mol).	101
7.2. Energies relatives des monoanions de la 8-azaxanthine Aza-7-9, Aza-7-8 et Aza-8-9 (en kcal/mol).	101
7.3. Potentiels d'ionisation de la 8-azaxanthine et ses formes neutres déprotonées en position 3 (en kcal/mol).	102
7.4. Potentiels d'ionisation des monoanions Aza-7-9, Aza-7-8 et Aza-8-9 de la 8-azaxanthine (en kcal/mol).	102
7.5. Energies relatives, énergies relatives avec correction d'ordre zéro, enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour la 8-azaxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	103
7.6. Energies relatives, énergies relatives avec correction d'ordre zéro, enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour la 8-azaxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	106
7.7. Energies relatives des formes neutres de la 8-azaxanthine par rapport à la forme Aza-9 (en kcal/mol).	107
7.8. Energies relatives des monoanions de la 8-azaxanthine par rapport à la forme Aza-7-8 (en kcal/mol).	108
7.9. Potentiels d'ionisation des formes neutres de la 8-azaxanthine dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	109
7.10. Potentiels d'ionisation des monoanions de la 8-azaxanthine dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	109
7.11. Energies relatives des monoanions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme monoanion 3 (en kcal/mol).	110
7.12. Energies relatives des dianions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme dianionique 3-7 (en kcal/mol).	111
7.13. Potentiels d'ionisation de l'acide 9-méthyl urique et de ses monoanions (en kcal/mol).	112
7.14. Potentiels d'ionisation des dianions de l'acide 9-méthyl urique (en kcal/mol).	112
7.15. Energies relatives de stabilité des monoanions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme dianionique 3 dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	112
7.16. Energies relatives de stabilité des dianions de l'acide 9-méthyl urique par rapport à la forme dianionique 3-7 dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	113
7.17. Potentiels d'ionisation des monoanions de l'acide 9-méthyl urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	114
7.18. Potentiels d'ionisation des dianions de l'acide 9-méthyl urique dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	114
7.19. Stabilités relatives des ligands dans le site actif de 2UOX par les méthodes PM3, B3LYP/6-31G**//PM3 et B3LYP/6-31+G**//PM3 (en kcal/mol).	117
7.20. Quelques charges atomiques de Mulliken pour les ligands et O ₂ , selon la méthode PM3, dans le site actif de 2UOX (en u.a.).	118
7.21. Densités de spin pour les ligands et O ₂ selon la méthode PM3.	118

8.1.	Energies relatives de la forme tautomère 8-hydroxyxanthine par rapport au monoanion 3 de l'acide urique (en kcal/mol).	121
8.2.	Potentiels d'ionisation du monoanion 3 de l'acide urique et de la 8-hydroxyxanthine (en kcal/mol).	122
8.3.	Energies relatives, énergies relatives avec la correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour la 8-hydroxyxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	125
8.4.	Energies relatives, énergies relatives avec la correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour la 8-hydroxyxanthine et selon la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	125
8.5.	Energies relatives de la 8-hydroxyxanthine par rapport au monoanion 3 de l'acide urique à l'intérieur de site actif de 2UOX (en kcal/mol).	127
8.6.	Potentiels d'ionisation du monoanion 3 de l'acide urique et de la 8-hydroxyxanthine dans le site actif de 2UOX (en kcal/mol).	128
A.1.	Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	140
A.2.	Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	140
A.3.	Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	140
A.4.	Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	141
A.5.	Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 1 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	144
A.6.	Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 1 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	144
A.7.	Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 1 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	144
A.8.	Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 1 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	145

A.9. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 7 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	148
A.10. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	148
A.11. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le monoanion 7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	149
A.12. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A' pour le monoanion 7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	149
A.13. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 9 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	152
A.14. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du monoanion 9 de l'acide urique selon l'hypothèse B' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	152
A.15. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le monoanion 9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	153
A.16. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le monoanion 9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	153
A.17. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	156
A.18. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-3 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	156
A.19. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 1-3 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	156
A.20. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 1-3 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	157

A.21. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	160
A.22. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	160
A.23. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 1-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	161
A.24. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A' pour le dianion 1-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	161
A.25. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	164
A.26. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 1-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	164
A.27. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 1-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	165
A.28. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le dianion 1-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	165
A.29. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	166
A.30. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-7 de l'acide urique selon l'hypothèse A' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	166
A.31. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A pour le dianion 3-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	167
A.32. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse A' pour le dianion 3-7 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	167

A.33. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	170
A.34. Energies relatives de réaction par rapport aux réactifs du mécanisme d'oxydation du dianion 3-9 de l'acide urique selon l'hypothèse B' et en fonction de différentes méthodes quantiques (en kcal/mol).	170
A.35. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	171
A.36. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31G** (en kcal/mol).	171
A.37. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	172
A.38. Energies internes relatives, énergies internes relatives avec correction de point zéro (ZPE), enthalpies relatives et énergies libres relatives selon l'hypothèse B' pour le dianion 3-9 de l'acide urique d'après la méthode B3LYP/6-31+G** (en kcal/mol).	172

Bibliographie

- [1] Rivail, J. L. *Eléments de Chimie Quantique à l'Usage des Chimistes* ; InterEditions : Paris, CNRS Editions ed. ; 1994.
- [2] Szabo, A. ; Ostlund, N. S. *Modern Quantum Chemistry : Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. ; McGraw-HILL : New York, 1989.
- [3] McWeeny, R. ; Sutcliffe, B. T. *Methods of Molecular Quantum Mechanics* ; Academic Press : London and New York, 1969.
- [4] Atkins, P. W. *Molecular Quantum Mechanics* ; Oxford University Press : Oxford, 1983.
- [5] Schrödinger, E. *Ann. Phys.* **1926**, 79, 361.
- [6] Born, M. ; Oppenheimer, J. R. *Ann. Physik.* **1927**, 84, 457-84.
- [7] Pauli, W. *Z. Physik* **1925**, 31, 765.
- [8] Slater, J. *Phys. Rev.* **1929**, 34, 1293.
- [9] Berthier, G. *J. Chim. Phys.* **1954**, 51, 363-371.
- [10] Pople, J. A. ; Nesbet, R. K. *J. Chem. Phys.* **1954**, 22, 571-572.
- [11] Chen, W. ; Schlegel, H. B. *J. Chem. Phys.* **1994**, 101, 5957-5968.
- [12] Hartree, D. *Proc. Cambridge Phil. Soc.* **1928**, 24, 89-110.
- [13] Fock, V. *Z. Physik* **1930**, 61, 126.
- [14] Roothaan, C. C. J. *Rev. Mod. Phys.* **1951**, 23, 69-89.
- [15] Löwdin, P. O. *Adv. Chem. Phys.* **1959**, 2, 207.
- [16] Møller, C. ; Plesset, M. S. *Phys. Rev.* **1934**, 46, 618-622.
- [17] Brillouin, L. *Actualités Sci. Ind.* **1933**, 71,.
- [18] Pople, J. A. ; Seeger, R. ; Krishnan, R. *Int. J. Quantum Chem.* **1977**, 11, 149.
- [19] Hohenberg, P. ; Kohn, W. *Phys. Rev.* **1964**, 136, B864-b871.
- [20] St-Amant, A. In Review in Computational Chemistry. In , Vol. 7 ; K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd ed., VCH : New York, 1996.
- [21] Kohn, W. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 12974.
- [22] Kohn, W. ; Sham, L. J. *Phys. Rev* **1965**, 140, A1133-A1138.
- [23] Slater, J. C. *Quantum Theory of Molecules and Solides* ; volume 4 McGraw-Hill : New York, 1974.

- [24] Vosko, S. H. ; Wilk, L. ; Nusair, M. *J. Can. Phys.* **1980**, *58*, 1200.
- [25] Becke, A. D. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098-3100.
- [26] Perdew, J. P. *Phys. Rev. B* **1992**, *46*, 6671.
- [27] Perdew, J. P. ; Yang, W. *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822.
- [28] Lee, C. ; Yang, W. ; Parr, R. G. *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785.
- [29] Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648-5652.
- [30] Stewart, J. J. P. Review in Computational Chemistry. In , Vol. 1 ; K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd ed., VCH : New York, 1990 ; Chapter 2, pages 45–81.
- [31] Zerner, M. C. Review in Computational Chemistry. In ; K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd ed., VCH : New York, 1991 ; Chapter 8, pages 313–365.
- [32] Pople, J. A. ; Santry, D. P. ; Segal, G. A. *J. Chem. Phys.* **1965**, *43*, S129.
- [33] Dewar, M. J. S. ; Zoebisch, E. G. ; Healy, E. F. ; Stewart, J. J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902.
- [34] Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10*, 221.
- [35] Stewart, J. J. P. *J. Comput. Chem.* **1989**, *12*, 320-341.
- [36] Pople, J. A. ; Segal, G. A. *J. Chem. Phys.* **1966**, *44*, 3289-3296.
- [37] Kirkwood, J. G. *J. Chem. Phys.* **1934**, *2*, 351.
- [38] Onsager, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *58*, 1486.
- [39] Baldrige, K. ; Klamt, A. *J. Chem. Phys.* **1997**, *106*, 6622.
- [40] Cossi, M. ; Mennucci, B. ; Pitarch, J. ; Tomasi, J. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 833.
- [41] Miertus, S. ; Scrocco, E. ; Tomasi, J. *J. Chem. Phys.* **1981**, *55*, 117-129.
- [42] Tomasi, J. ; Persico, M. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2027.
- [43] Cammi, R. ; Tomasi, J. *J. Comput. Chem.* **1995**, *16*, 1449-1458.
- [44] Barone, V. ; Cossi, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995-2001.
- [45] Rinaldi, D. ; Ruiz-Lopez, Rivail, J. L. *J. Chem. Phys.* **1983**, *78*, 834.
- [46] Rivail, J. L. ; Rinaldi, D. *Theor. Chim. Acta.* **1973**, *32*, 57.
- [47] Rivail, J. L. ; Rinaldi, D. *J. Chem. Phys.* **1976**, *18*, 233-242.
- [48] Rinaldi, D. ; Bouchy, A. ; Rivail, J.-L. ; Dillet, V. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 2343.
- [49] Franke, W. ; Taha, E. M. ; Krieg, L. *Arch. Mikrob.* **1952**, *17*, 255.
- [50] Franke, W. ; Taha, E. M. *Ber* **1952**, *85*, 779.
- [51] Franke, W. ; Krieg, L. *Ber* **1952**, *85*, 913.
- [52] Roush, A. H. ; Domnas, A. J. *Science* **1956**, *124*, 125.
- [53] Greene, R. G. ; Mitchell, H. K. *Arch. Biochem. Biophys.* **1957**, *70*, 603.
- [54] Thomas, R., J. ; Scharder, L. E. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 361.

- [55] Reynolds, P. H. S.; Boland, M. J.; Blevins, D. G.; Randall, D. D.; Schubert, K. R. *Trends Biochem. Sci.* **1982**, *7*, 366.
- [56] Yeldandi, A. V.; Chu, R.; Pan, J. and Zhu, Y.; Usuda, N. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *804*, 165.
- [57] Wu, X. W.; Muzny, D. M.; Lee, C. C.; Caskey, C. T. *J. Mol. Evol.* **1992**, *34*, 78-84.
- [58] Ames, B. N.; cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstien, P. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 6858-6862.
- [59] Howell, R. R.; Wyngaarden, J. B. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3544.
- [60] Koltz, I. M. *J. Chem. Educ.* **1994**, *71*, 1015.
- [61] Ronco, C.; Inguaggiato, P.; Bordoni, V.; De Cal, M.; Bonello, M.; Andrikos, E.; Assuman, Y.; Rattanarat, R.; Bellomo, R. *Contrib. Nephrol.* **2005**, *147*, 115-123.
- [62] Cheson, B. D.; Dutcher, B. S. *J. Support. Oncol.* **2005**, *3*, 127-128.
- [63] Tsimberidou, A. M.; Keating, M. J. *Contrib. Nephrol.* **2005**, *147*, 47-60.
- [64] Conley, T. G.; Priest, D. G. *J. Biochem.* **1980**, *187*, 733-738.
- [65] Simic, M. G.; Jovanovic, S. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5778.
- [66] Laboureur, P.; Langlois, C. *Bulletin de la société de chimie biologique* **1968**, *50*, 827.
- [67] Schuler, W.; Reindel, W. Z. *Physiol. Chem.* **1933**, *215*, 258.
- [68] Keilin, D.; Hartree, E. F. *Proc. R. Soc.* **1936**, *B119*, 114.
- [69] Bongaerts, G. A.; Utizetter, J.; Brouns, R.; Vogels, G. D. *Biochim. Biophys. Acta.* **1978**, *527*, 348-58.
- [70] Modric, N.; Derome, A. E.; Ashcroft, S. J. H.; Poje, M. *Tetrahedron. Lett.* **1992**, *33*, 6691.
- [71] Imhoff, R. D.; Power, N. P.; Borrok, M. J.; Tipton, P. A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4094.
- [72] Kahn, K.; Tipton, P. A. *Biochemistry* **1997**, *36*, 4731.
- [73] Kahn, K.; Serfozo, P.; Tipton, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5435.
- [74] Tipton, P. A. *Methods Enzymol.* **2002**, *354*, 310.
- [75] Bentley, R.; Neuberger, A. *J. Biochem.* **1952**, *52*, 694.
- [76] Kahn, K.; Tipton, P. A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11651.
- [77] Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22459-22462.
- [78] Sarma, A. D.; Serfozo, P.; Kahn, K.; Tipton, P. A. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33863-33865.
- [79] Colloc'h, N.; El Hajji, M.; Bachet, B.; L'Hermite, G.; Schiltz, M.; Prangé, T.; Castro, B.; Mornon, J. P. *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *187*, 727.
- [80] Colloc'h, N.; Poupon, A.; Mornon, J. P. *Proteins* **39**, *39*, 142-154.
- [81] Retailleau, P.; Colloc'h, N.; Vivarès, D.; Bonneté, F.; castro, B.; El Hajji, M.; Mornon, J. P.; Monard, G.; Prangé, T. *Acta. Cryst.* **2004**, *D60*, 453-462.

- [82] Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 2491.
- [83] Castro, B. Unpublished data.
- [84] Doll, C.; Bell, A. F.; Power, N.; Tonage, P. J.; Tipton, P. A. *Biochemistry* **2005**, *44*, 11440-11446.
- [85] Sarma, A. D.; Tipton, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11252.
- [86] Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*; Third Edition John Wiley and Sons Inc : New York, USA, 2004.
- [87] Podolyan, Y.; Gorb, L.; Leszczynski, J. *Int. J. Mol. Sci.* **2003**, *4*, 410.
- [88] Finlayson, B.; Smith, A. *J. Chem. Eng. Data* **1974**, *19*, 94-97.
- [89] Dougherty, D.; Younathan, E. S.; Voll, R.; Abdulnur, S.; McGlynn, S. P. *J. Electron Spectrosc Relat Phenom* **1978**, *13*, 379.
- [90] Bergmann, F.; Dikstein, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 691-696.
- [91] Shukla, M. K.; Mishra, P. C. *THEOCHEM* **1996**, *377*, 247-259.
- [92] Chen, W.-K.; Lu, C.-H.; Xu, J.; Yang, Y.-C.; Li, J.-Q. *Chinese J. Struct. Chem.* **2002**, *21*, 186.
- [93] Frisch, M. J. *et al.* "Gaussian 03, Revision B05", Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 2003.
- [94] Demir, T. A.; Ögretir, C.; Görgün, K.; Yaman, M. *THEOCHEM* **2004**, *684*, 149-157.
- [95] Allen, R. N.; Shukia, M. K.; Leszczynski, J. *Int. J. Quantum Chem.* **2004**, *100*, 801.
- [96] Ringertz, H. *Acta. Cryst.* **1966**, *20*, 397.
- [97] Frisch, M. J. *et al.* "Gaussian98 Revision A.9", Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, 1998.
- [98] Hehre, W.; J.,; Ditchfield, R.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56*, 2257.
- [99] Ditchfield, R.; Hehre, W. J.; Pople, J. A. *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724.
- [100] Hariharan, P. C.; Pople, J. A. *Theor. Chim. Acta.* **1973**, *28*, 213.
- [101] Chandrasekhar, J.; Andrade, J. G.; Schleyer, P. V. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5609-5612.
- [102] Mayer, I. *Chem. Phys. Lett.* **1983**, *97*, 270-274.
- [103] Maples, K. R.; Mason, P. R. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 1709-1712.
- [104] Stryer, L. *Biochemistry*; volume P757 W. H. Freeman : New York, 1995.
- [105] Yü, T.-F. *In Uric Acid, Handbook of experimental Pharmacology*; volume 51 of P398 Kelly, W. N., Weiner, I. M. : Berlin, Springer-Verlag ed. ; 1978.
- [106] Kahn, K. *Bioorganic Chemistry* **1999**, *27*, 351.
- [107] Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24*, 669-681.
- [108] Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Barone, V. *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 43.
- [109] Travers, M. J.; Cowles, D. C.; Ellison, G. B. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, *164*, 449.

- [110] Rienstra-Kiracofe, J. C. ; Tschumper, G. S. ; Schaefer, H. F. ; Nandi, S. ; Ellison, G. B. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 231.
- [111] Ding, X. ; Li, Z. ; Yang, J. ; Hou, J. G. ; Zhu, Q. *J. Chem. Phys.* **2004**, *120*, 9594.
- [112] Ridely, J. ; Zerner, M. C. *Theor. Chim. Acta.* **1973**, *32*, 111.
- [113] Foresman, J. B. ; Head-Gordon, M. ; Pople, J. A. ; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 135.
- [114] Casida, M. E. In *Recent Advances in Density Functional Methods*. In , Vol. 1, World Scientific ed. ; Chong, D. P. : Singapore, 1995.
- [115] Casida, M. E. In *Recent Developments and Application of Modern Density Functional Theory ; Theoretical and Computational Chemistry*. In , Vol. 4, Elsevier ed. ; Seminario, J. M. : Amsterdam, 1996.
- [116] Jamorski, C. ; Casida, M. E. ; Salahub, D. R. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104*, 5134.
- [117] Casida, M. E. ; Jamorski, C. ; Casida, K. C. ; Salahub, D. R. *J. Chem. Phys.* **1998**, *108*, 4439-4449.
- [118] Woon, D. E. ; Dunning Jr, T. H. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 1358.
- [119] Foresman, J. B. ; Keith, T. A. ; Wiberg, K. B. ; Snoonian, J. ; Frisch, M. J. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 16098.
- [120] Klamt, A. ; Schüürmann, G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, *2*, 799.
- [121] Adamo, C. ; Scuseria, G. E. *J. Chem. Phys.* **1999**, *111*, 2889-2899.
- [122] Boys, S. F. ; Bernardi, F. *Mol. Phys.* **1970**, *19*, 553-566.
- [123] Gonzalez, C. ; Schlegel, H. B. *J. Chem. Phys.* **1989**, *90*, 2154.
- [124] Gonzalez, C. ; Schlegel, H. B. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 5523.

Résumé :

L'objectif de ce travail est de comprendre le mécanisme catalytique de l'urate oxydase à l'aide des méthodes de la chimie quantique. Pour cela nous avons étudié ce mécanisme en trois étapes : *i*) étude des propriétés physico-chimiques de l'acide urique et de ses anions ; *ii*) étude de la réactivité intrinsèque de l'acide urique et de ses anions avec le dioxygène ; *iii*) étude de la réactivité du substrat réel dans un modèle de site actif. L'ensemble de ces études a été effectué selon différents niveaux de mécanique quantique : semi-empirique, DFT ou encore *ab initio* (niveaux HF et MP2).

L'ensemble de nos études a permis de mettre en évidence au moins deux particularités très importantes du mécanisme catalytique de l'urate oxydase : *i*) le substrat reconnu par l'enzyme est dianionique et ne correspond pas au dianion le plus stable en solution mais à la deuxième espèce la plus stable ; *ii*) le chemin réactionnel implique un changement d'état de spin de l'état réactif (triplet) à l'état final (singulet). Ce changement d'état de spin intervient sans transition d'état (*i.e.* sans émission de photon).

Mots Clés :

Urate oxydase ; Acide urique ; Modélisation moléculaire ; Catalyse enzymatique ; Inhibiteurs.