

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEM

Faculté des Sciences
Département de Chimie
Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives

Thèse

Présenté pour obtenir le diplôme de :

DOCTORAT EN CHIMIE-PHYSIQUE

Option : **Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire**

Présenté Par : **Mr Ismail DAOUD**

Modélisation de l'interaction des ions de métaux lourds avec des colorants

Président :	Yahia HAREK	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs :	Safia TAÏRI-KELLOU	Professeur	Université d'Alger(USTHB)
	Ali RAHMOUNI	Professeur	Université de Saida
	Meriem BENYAROU	Professeur	Université de Tlemcen
Directeur de Thèse :	Said GHALEM	Professeur	Université de Tlemcen

Dédicaces

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail:

 *A mes très chers parents*

 *A mes frères et à ma sœur*

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été dirigé par Monsieur Said GHALEM, Professeur au Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université ABOU BEKR BELKAID DE TLEMCEM. Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe de Dynamiques des Biomolécules du laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives (LASNABIO).

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur Said GHALEM pour m'avoir guidé durant mon travail avec une disponibilité permanente et m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en chimie théorique et modélisation moléculaire.

J'exprime ma profonde et respectueuse gratitude à Monsieur Yahia HAREK, Professeur à l'Université de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse.

J'adresse à Madame Safia TAÏRI-KELLOU, Professeur à l'université d'Alger (USTHB), l'expression de mes sincères remerciements et de mon entière gratitude, pour faire partie du jury.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements et à exprimer ma profonde gratitude aux membres de jury : à Monsieur Ali RAHMOUNI, Professeur à l'université de Saida, Madame Meriem BENYAROU, Professeur à l'université de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous les collègues de l'équipe de «Dynamiques des Biomolécules» du laboratoire de recherche LASNABIO et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux

CHAPITRE I

Tableau 1 : Fonctions d'énergie associées aux atomes liés.....	17
Tableau 2 : Fonctions d'énergie associées aux atomes non liés.....	18
Tableau 3 : Classification des acides et bases de Lewis suivant Pearson.....	28

CHAPITRE II

Tableau 1 : Principaux groupements chromophores et auxochromes, classés par intensité croissante.....	49
Tableau 2 : Exemples de métaux dans l'environnement et leur toxicité.....	55
Tableau 3 :Résumé comparatif des effets de mercure lourds sur l'organisme.....	61

CHAPITRE III

Tableau 1 : les distances interatomique en (Å).....	75
Tableau 2 : les Angles de valence en (°).....	75
Tableau 3 : les Angles dièdres en (°).....	75
Tableau 4 : Energies de la HOMO, LUMO, Gap HOMO-LUMO, Moment dipolaire M, Energie d'ionisation I, Energie (HF), pour les composés L ₁ , L ₂ , L ₃ , L ₄ en u.a.....	77
Tableau 5 : Charges de Mulliken (q _N , q _{N+1}) des trois atomes N ₄ , N ₅ et de l'O ₁ dans les systèmes neutres et anioniques, respectivement pour les ligands L ₁ , L ₂ , L ₃ et L ₄	79
Tableau 6 : Indices de nucléophilie globales Ng(ev), Indices de Fukui f ⁻ _k , les indices de nucléophilie locales N _k pour les sites : N ₄ , N ₅ et O ₁ des ligands L ₁ , L ₂ , L ₃ et L ₄	80
Tableau 7 : Les distances interatomiques en (Å).....	83
Tableau 8 : Les valeurs d'angles de valence en (°).....	83
Tableau 9 : Angles dièdres en (°).....	84
Tableau 10 : Les distances interatomiques en (Å).....	86
Tableau 11 : Les Angles de valence en (°).....	86
Tableau 12 : Les Angles dièdres en.....	86

Tableau 13 : Énergies stériques (KJ/mol) des complexes de Cu(II) (Octaédrique n=6).....	87
Tableau 14 : Énergies stériques (KJ/mol) des complexes de Hg(II) (Plan carré n=4).....	87
Tableau 15 : Énergies d'optimisation des ligands par la DFT/B3LYP (6-31G*) en Kcal/mol.....	93
Tableau 16 : Volume et surface des 2 cavités détectées.....	97
Tableau 17 : Résultats de docking moléculaire des Ligands L ₁ , L ₂ , L ₃ , L ₅ , L ₆ , L ₇ avec le site actif de la PTP1B dans les deux cavités.....	99
Tableau 18 : Liste des d'acide aminé impliqués dans l'interaction E-S de type hydrogène et hydrophobe dans la cavité 1.....	100
Tableau 19 : Liste des d'acide aminé impliqués dans l'interaction E-S de type hydrogène et hydrophobe dans la cavité 2.....	103
Tableau 20 : Distances entre les acides aminés de site actif et les deux ligands L ₆ et L ₂ ...	105
Tableau 21 : Energies, volume et surface des ligands.....	109
Tableau 22 : Propriétés des cavités détectées.....	110
Tableau 23 : Résultats de docking moléculaire des Ligands L ₁ , L ₂ , L ₃ , L ₄ et L ₈ avec le site actif de la α-amylase dans les deux cavités.....	112
Tableau 24 : Distances entre les acides aminés de site actif et la tartrazine.....	113

Liste des figures

CHAPITRE I

- Figure 1** : Variation de l'énergie(E) du système en fonction du nombre total d'électrons (N).....29
- Figure 2** : Variation des potentiels chimiques des deux espèces A et B lors d'une réaction.....30

CHAPITRE II

- Figure 1** : Les différentes formes de mercure.....57

CHAPITRE III

- Figure 1** : Structures des ligands L_1 , L_2 , L_3 , et L_4 optimisées par la DFT(B3LYP/6-31G(d)..74
- Figure 2** : HOMO , LUMO et la surface d'énergie potentielle MEP pour les Ligands L_1 , L_2 , L_3 et L_478
- Figure 3** : La conformation la plus stable de divers géométries de complexes [(A): Jaune Orangé S-Cu²⁺, (B):Tartrazine-Cu²⁺, (C): Amarante-Cu²⁺, (D): Ponceau 4R-Cu²⁺]......82
- Figure 4** :La conformation la plus stable de divers géométries de complexes [(A') : Jaune Orangé S-Hg²⁺, (B') :Tartrazine-Hg²⁺, (C') : Amarante-Hg²⁺, (D') : Ponceau 4R-Hg²⁺]......85
- Figure 5** : Le modèle simplifié Tyrosine Phosphatases (PTP1B).....91
- Figure 6** : Les résidus du site actif91
- Figure 7** : Structure chimique des colorants alimentaires L_1 : Jaune Orangé S(E110), L_2 : Tartrazine (E102), L_3 : Amarante (E123), L_5 : Rouge Allura AC(E129), L_6 : Erythrosine B(E127), L_7 : Phloxine B.....92
- Figure 8** : Protocole de calcul.....94
- Figure 9** : Méthode de détection de cavité knob & hole.....96
- Figure 10** : Interface graphique des cavités 1 et 2 caractérisées par une ellipse identifiée par MolDock.....98
- Figure 11** : flexibilité de ligand.....98
- Figure 12** : Interactions entre les ligands (L_1 , L_2 , L_3 , L_5 , L_6 , L_7) et les acides aminés de la cavité 1, basées sur le calcul de l'énergie Mol Dock (liaison d'hydrogène et hydrophobe),

en utilisant le programme Ligplot+	101
Figure 13 : Interactions entre les ligands (L₁ , L₂ , L₃ , L₅ , L₆ , L₇) et les acides aminés de la cavité 2, basées sur le calcul de l'énergie Mol Dock (liaison d'hydrogène et hydrophobe), en utilisant le programme Ligplot+.....	104
Figure 14 : La forme dimère (Chaines : A, B) de la α -amylase.....	107
Figure 15 : Le modèle simplifié de la α -amylase.....	107
Figure 16 : Structures des ligands: L₁ : Jaune Orangé S: (E110), L₂ : Tartrazine, (E 102), L₃ : Amarante (E123), L₄ : Rouge Cochineal red A, (E 124), L₈ : Ponceau	108
Figure 17 : Illustration graphique des cavités 1 et 2 caractérisées par une ellipse identifiée par MolDock.....	111
Figure 18 : Interactions entre le tartrazine seul et les acides aminés dans les deux cavités (- - - - -: Interactions des liaisons Hydrogène, - - - - -: Interactions stériques).....	113
Figure 19 : Fixation de la Tartrazine au niveau du site actif.....	114
Figure 20 : Représentation Graphique des énergies de Mol Dock Score dans les deux cas de ligands, seuls et complexés avec le α -amylase dans la cavité 2.....	116
Figure 21 : Interactions entre le Jaune Orangé S seul et complexé avec les résidus de la cavité 2 (- - - - -:Interactions des liaisons Hydrogène, - - - - -: Interactions stériques).....	117

Liste des abréviations

AMBER : Assisted Model Building with Energy Refinement

AM1 : Austin Model 1

B3LYP : Becke 3-Parameter Lee-Yang-Parr

CC : Couped Clusters

CD : Capto-Donneur

CI : Configuration interaction

DFT : Density Functional Theory

EHT : Extended Hückel Theory

EMO : Energy MOlecular

FMO : Frontier Molecular Orbital

GGA : Generalized Gradient Approximation

GROMOS : Groningen Molecular Simulation Program Package

GTO : Gaussian Type Orbital

HF : Hartree-Fock

HMO : Hückel Molecular Orbital

HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital

HSAB : Hard and Soft Acids and Bases

IC₅₀ : Inhibitory Concentration of 50%.

IRC : Intrinsic Reaction Coordinate

KS : Kohn et Sham

KS-DFT : Kohn Sham-Density Functional Theory

LDA : Local Density Approximation

LSDA : Local Spin Density Approximation

LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MM : Molecular Mechanics

MD : Molecular Dynamics

MHP : Maximum Hardness Principle

MO-LCAO : Molecular Orbital-Linear Combination of Atomic Orbitals

MP3 : Moller-Plesset order 3

MVD : Molegro Virtuel Docker

NBO : Natural Bond Orbitals

NPA : Natural Population Analysis

OA : Orbitale Atomique

OM : Orbitale Moléculaire

OPLS : Optimized Potentials for Liquid Simulations

PCM : Polarized Continuum Model

PDB : Protein Data Bank

PM3 : Parametrization Method 3

QM : Quantum Mechanics

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationships

QSPR : Quantitative Structure-Propriety Relationships

SCF : Self Consistent Field

SCRf : Self-Consistent Reaction Field

SPASIBA : Spectroscopic Potentiel Algorithm for Simulating biomolecular conformational Adaptability.

SPE : Surface Potential Energy

STO : Slater Type Orbital

TCE : TétraCyanoÉthylène

TS : Transition State

TST : Transition State Theory

V.d.W : Van der Waals

Sommaire

Remerciements.....	i
Liste des tableaux	ii
Liste des figures.	iii
Liste des abréviations	iv

Introduction Générale

Références.....	6
-----------------	---

Chapitre I : Méthode de la Modélisation Moléculaire et Approche Théorique de la Réactivité Chimique

I. Méthodes de la modélisation moléculaire.....	9
I.1. Introduction.....	9
I.2. Mécanique Quantique (MQ).....	10
I.2.1. Méthodes empiriques.....	10
I.2.2. Méthodes semi-empiriques.....	11
I.2.3. Méthodes ab initio.....	11
I.2.4. Méthodes qui traitent la corrélation.....	12
I.2.4.1. Méthodes post-Hartree-Fock.....	12
I.2.4.2. Les méthodes de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)...	12
I.2.5. Fonctions de base.....	13
I.3. Mécanique Moléculaire (MM).....	14
I.3.1. Fonction d'énergie potentielle.....	15
I.3.2. Champs de force.....	16
I.3.2.1. Terme des atomes liés.....	16
I.3.2.2. Terme des atomes non liés.....	18
I.3.3. Différents champs de force en mécanique moléculaire.....	19
I.3.4. Minimisation de l'énergie.....	21
I.4. Dynamique Moléculaire (DM).....	22
I.5. Docking Moléculaire.....	23
I.5.1. Un programme de docking moléculaire.....	24
I.5.2. Le docking : du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité.....	24
I.5.3. Un processus de docking Moléculaire.....	25
II. Approches théoriques de la réactivité chimique.....	26
II.1. Introduction.....	26
II.2. Théorie de l'état de transition (TST).....	26
II.3. Théorie des orbitales moléculaires frontières (FMO).....	27
II.4. Principe HSAB.....	27
II.4.1. Concept chimiques de réactivité résultant du principe HSAB.....	29

II.4.1.1. Potentiel chimique électronique μ	29
II.4.1.2. Dureté (Hardness) absolue.....	31
II.4.1.3. Mollesse (Softness) absolue.....	31
II.4.2. Principe de dureté maximale MHP (Maximum Hardness Principe).....	32
II.5. Concept chimiques et indices de réactivité décrivant de la DFT.....	32
II.5.1. Concept et indices globaux de réactivité.....	32
II.5.1.1. Electronégativité et potentiel chimique électronique.....	34
II.5.1.2. Dureté et mollesse chimiques.....	34
II.5.1.3. Electrophilie globale.....	35
II.5.1.4. Indice de nucléophilie globale.....	35
II.5.2. Indices locaux de réactivité dérivant de la DFT conceptuelle.....	36
II.5.2.1. Fonction de Fukui.....	37
II.5.2.2. Mollesse locales.....	37
II.5.2.3. Electrophilie locale.....	38
II.5.2.4. Nucléophilie locale.....	38
III. Références.....	39

Chapitre II : Colorants et Métaux Lourds

I. Les colorants.....	47
I.1. Colorants alimentaires naturels et industriels.....	48
I.2. Classification des colorants.....	49
I.2.1. Classification chimique.....	50
I.2.1.1. Les colorants azoïques.....	50
I.2.1.2. Les colorants triphénylméthanes.....	50
I.2.1.3. Les colorants indigoides.....	51
I.2.1.4. Les colorants xanthènes.....	51
I.3. Utilisation des colorants.....	52
II. Les métaux lourds.....	52
II.1. Le Cuivre et le Mercure.....	56
II.1.1. Le Mercure.....	56
II.1.1.1. Les différentes formes de mercure.....	56
a. Forme organique.....	57
b. Forme inorganique.....	57
II.1.1.2. Source et utilisation du mercure.....	59
a. Les sources naturelles.....	59
b. Les sources anthropiques.....	59
II.1.1.3. Toxicité du mercure.....	60
II.1.2. Le Cuivre.....	62

II.1.2.1. Les différentes formes de cuivre.....	62
II.1.2.2. Sources et utilisation de cuivre.....	62
II.1.2.3. Toxicité de cuivre.....	63
a. Impact de cuivre sur la santé humaine.....	63
b. Impact du cuivre sur l'environnement.....	63
III. Références.....	65

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Introduction.....	71
II. Structures et propriétés électroniques des ligands et leurs complexes avec Hg et Cu..	72
II.1. Détails des calculs.....	72
II.2. Ligands.....	73
II.2.1. Propriétés structurales.....	75
II.2.2. Propriétés électroniques.....	76
II.3. Complexes.....	80
II.3.1. Complexes de cuivre.....	81
II.3.1.1. Propriétés structurales.....	81
II.3.2. Complexes de mercure.....	84
II.3.2.1. Propriétés structurales.....	84
II.3.2.2. Analyse des composantes énergétiques des deux complexes (Cuivre et Mercure)).....	87
II.4. Conclusion.....	88
III. Interaction de l'enzyme de la tyrosine phosphatase avec les colorants alimentaires	90
III.1. Détails des calculs.....	90
III.1.1. Préparation et optimisation de la Tyrosine Phosphatases.....	90
III.1.2. Préparation et optimisation des ligands.....	92
III.2. Docking moléculaire.....	93
III.2.1. Etape de docking moléculaire.....	95
III.2.2. Choix de logiciel de MolDock (MVD).....	96
III.3. Résultats du Docking moléculaire.....	97
III.3.1. Interaction : PTP1B-Ligands.....	97
III.3.2. Energie d'interaction.....	99
III.4. Conclusion.....	106
IV. Interaction de l'enzyme de la α -amylase avec les colorants alimentaires.....	106
IV.1. Détails des calculs.....	106
IV.1.1. Préparation et optimisation de l'enzyme de α -amylase.....	106
IV.1.2. Préparation et optimisation des ligands.....	107
IV.2. Docking moléculaire.....	110
IV.3. Résultats de docking moléculaire.....	110

IV.3.1. Interaction : α -amylase-Ligands.....	110
IV.3.2. Energie d'interaction.....	111
IV.3.2.1. Interaction des ligands seuls avec la α -amylase dans les deux cavités.....	111
IV.3.2.2. Interaction des ligands seuls et complexés avec la α -amylase dans la cavité 2.....	115
IV.4. Conclusion.....	117
V. Références.....	119
Conclusion générale	124
Annexes	

Introduction Générale

Depuis quelques décennies, l'industrie alimentaire mondiale utilise une quantité de plus en plus importante de colorants naturels ou artificiels surtout dans les conserves, les confiseries, les boissons, mais aussi dans la charcuterie, les fruits et légumes, les matières grasses (huile, beurre, fromage) et les sucres.

Les colorants alimentaires synthétiques sont fabriqués industriellement. Deux aspects sont signalés, le premier est de générer des analogues de colorants naturels (point de vue structure), le second réside dans la synthèse de colorants n'ayant pas d'analogues naturels. Il est à noter que les colorants synthétiques représentent une catégorie de substances importante et par conséquent se sont substitués aux colorants naturels.

Il y a lieu de faire la différence entre les colorants alimentaires naturels et synthétiques.

Ces colorants alimentaires naturels, dont la plupart sont d'origine végétale, occupent une place très importante dans l'alimentation depuis quelques décennies.

Les colorants naturels sont doués d'activités biologiques intéressantes, notamment antimicrobiennes [1], anti-oxydantes [2], antimutagènes et anti-carcinogènes [3].

Toutefois, ces activités dépendent essentiellement de leurs concentrations. Certains colorants naturels peuvent être toxiques à des doses élevées. Pour ces raisons, une dose journalière admissible (DJA) de chaque colorant est conseillée.

Malgré tous les avantages qu'ils présentent, l'usage des colorants naturels dans les produits alimentaires reste très limité par rapport aux colorants de synthèse. Ces derniers ont l'avantage d'être moins coûteux, peuvent être fabriqués en grande quantité, ils ont une durée de vie plus longue et utilisés à des quantités relativement faibles, donnant une coloration intense. Cependant, la plupart des colorants synthétiques sont toxiques même à de faibles concentrations [4], l'absorption des colorants de synthèse n'est pas toujours sans conséquences sur notre santé, certains d'entre eux sont mutagènes et génotoxiques [4,5] ou provoquent des cancers de la thyroïde [5].

Le classement des colorants industriels s'effectue selon leur structure chimique qui repose sur la nature du groupement chromophore. Il existe sept types :

- Les colorants azoïques,

- les triphénylméthanes,
- les indigoïdes,
- les xanthènes,
- les anthraquinoniques,
- les phtalocyanines,
- et les colorants nitrés et nitrosés.

Notant que les colorants azoïques sont les plus communément utilisés en raison de la présence du groupe azo (-N=N-) qui confère à ces produits chimiques, une certaine résistance à la lumière, aux acides, aux bases et à l'oxygène. Ils sont utilisés dans l'industrie textile [6,7].

Plus de 53% des colorants azoïques utilisés sont identifiés comme étant des composés stables, non biodégradables [8].

Les colorants alimentaires de synthèse considérés toxiques sont : la tartrazine E102 et l'amarante E123 (interdit aux Etats-Unis et réglementé en France).

Ces additifs sont suspectés de jouer un rôle dans le syndrome d'hyperactivité et pourraient contenir des substances cancérigènes, sachant que ces deux colorants appartiennent à la classe de types azoïques.

L'un des aspects de toxicité des colorants est le fait qu'ils peuvent se complexer avec certains éléments présents dans le corps humain. Les colorants alimentaires synthétiques peuvent jouer le rôle de ligands pour des métaux présents dans le corps. La formation de structures complexes peut provoquer des tumeurs cancéreuses.

Il est à noter que les métaux présents dans l'organisme ont un rôle physiologique primordial. Seuls deux métaux présents sous forme de trace [9] ont un caractère essentiel pour l'organisme : il s'agit du manganèse et du molybdène.

En revanche, beaucoup de ces métaux présents, même à faible dose ont une toxicité à long terme. Les toxicologues sont amenés à définir des valeurs maximales de contamination de ces éléments dans les différents milieux où ils se trouvent (textile, amalgames dentaires,...). Le mercure, le plomb et le cadmium présentent des effets nocifs tant sur le plan professionnel qu'environnemental. [10]

Bien que ces effets dépendent de la nature et de la concentration locale de l'ion, il est possible de citer deux caractéristiques communes à l'ensemble des ions :

- le maintien de l'équilibre osmotique.
- la création d'un environnement généralement cationique [11].

Les organismes sont capables, dans une certaine mesure, d'utiliser et de réguler les concentrations en métaux qui leur sont essentiels. Des effets toxiques apparaissent lorsque cette régulation ne peut plus avoir lieu [12]. Sachant que ces ions métalliques ne subsistent dans l'organisme que sous forme de chélates avec les molécules biologiques. Ces dernières sont de nature et de complexité très diverses. Si certaines espèces bio-métalliques ont vu leur structure résolue (hémoglobine, cytochrome,...), beaucoup d'autres restent mal connues.

Les tendances différentes des divers métaux à réagir avec un ligand ont engendré plusieurs théories cherchant à expliciter les caractères respectifs de l'ion métallique et de l'atome formant des complexes stables [13]. Une meilleure connaissance de ces complexes, en particulier de leur composition, de leur stabilité et de leur structure, permettrait d'élucider le rôle physiologique.

Les colorants jouent le rôle de ligands et plus précisément les colorants azoïques qui possèdent un groupe N=N qui ont une grande tendance à se complexer avec les ions métalliques.

De nombreux travaux ont été menés dans ce domaine, mais avec différents objectifs, citons quelques exemples :

- ✓ A.C.F. Ribeiro et al [14],
- ✓ H. Khanmohammadi et al [15],
- ✓ S. Kr Sardar et al [16],
- ✓ R. kilinçarslan et al [17],
- ✓ L. Szabo et al [18],
- ✓ A.C. Ribeiro Gomes et al [19],
- ✓ M. Szymczyk et al [20],
- ✓ J. Jayabharathi [21].

A.C.F. Ribeiro et al (2007) [14] ont montré qu'il existe des interactions entre les sucres et les ions qui sont libérés par les amalgames dentaires au niveau de la cavité buccale (étude théorique et expérimentale). De plus, plusieurs travaux antérieurs ont montré que le mercure libéré par les amalgames provoque une forte toxicité [22-29].

Malheureusement, la bibliographie ne fournit pas d'information concernant le pourcentage du métal libéré par ces amalgames. Ceci nous a mené à développer une étude théorique pour envisager comment ces complexes sont formés et analyser les interactions existantes entre ces ions métalliques et les colorants azoïques. Afin d'expliquer le mode d'intoxication par ces ions métalliques.

La modélisation et la simulation numérique sont devenues des pratiques courantes dans de nombreux domaines scientifiques et techniques et en particulier en chimie. Elle s'impose souvent lorsque l'expérience réelle est trop difficile, trop dangereuse, trop coûteuse, trop longue ou trop rapide, éthiquement inacceptable, ou même impossible à réaliser. Elle permet, actuellement, non seulement l'élaboration des mécanismes de complexation et les profils énergétiques mais également de justifier et prédire les conformères les plus stables et les interactions ligands - substrats.

Plusieurs approches ont été élaborées pour réaliser la modélisation moléculaire. Les méthodes les plus répandues et les plus utilisées sont :

- ✓ les méthodes quantiques (empiriques, semi empiriques, *ab-initio* , post SCF, et la DFT)
- ✓ La mécanique moléculaire
- ✓ La dynamique moléculaire
- ✓ Les méthodes QSAR, QSPR.
- ✓ Le Docking moléculaire

Dans le cadre de cette thèse on se propose dans une première étape d'élucider l'interaction de quelques colorants alimentaires azoïques avec deux ions métalliques, le cuivre Cu(II) et le mercure Hg(II) qui sont libérés par les amalgames dentaires, afin d'élucider les processus de complexation et par suite l'intoxication, et à une deuxième

etape d'étudier l'interaction des ligands avec deux enzymes : la Tyrosine Phosphatase 1B impliquée dans le diabète type II et l' α -amylase sécrétée au niveau de la cavité buccale .

L'étude a été menée en utilisant deux approches différentes de modélisation moléculaires :

- Une méthode quantique basée sur la théorie de la fonctionnelle de densité DFT (méthode post SCF)
- La mécanique moléculaire .
- Le docking moléculaire.

Le manuscrit de cette thèse est présentée en trois chapitres :

- Une introduction générale
- Dans le **premier chapitre** nous présenterons un rappel sur les différentes théories de modélisation les plus utilisées en particulier, les méthodes de la mécanique quantique, la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire et le docking moléculaire, de plus qu'une approche théorique de la réactivité chimique est aussi présentée.
- Le **deuxième chapitre** est consacré à un rappel sur les colorants (alimentaires et industriels) et leurs utilisations, suivi d'un bref rappel sur les métaux lourds, leurs sources et leurs utilisations. Les différents cas d'intoxications causées par ce type de métaux (le cas d'excès et dans le cas de carence) sont exposés.
- Le **troisième chapitre** et le dernier de cette thèse est dédié à la description des résultats obtenus, dans le quel les résultats sont détaillés en fonction des publications réalisées dans le cadre de cette thèse .
- Une conclusion générale.

Références

- [1] R. Singh, A. Jain, S. Panwar et al:“ Antimicrobial activity of some natural dyes”, *Dyes and Pigments.*, **2005**, 66, 99–102.
- [2] D. Liu, J. Shi, A.C. Ibarra et al:“ The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and betacarotene mixtures on the DPPH free radical”, *LWT.*, **2008**, 4, 1344–9.
- [3] C.B. Lynn, E. Rice, T. Fischer et al:“ Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and non-cancerous) in an in vitro system with doses cross the physiological range”, *Toxicol In Vitro.*, **2008**, 22, 1297–3000.
- [4] H. Ben Mansour, D. Corroler, D. Barillier et al:“ Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: acids yellow 17,violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2”, *Food Chem Toxicol.*, **2007**, 45, 1670 - 7.
- [5] F. Rafii, J.D. Hall, C.E. Cernigalia:“ Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract”, *Food Chem Toxicol.*, **1997**, 35, 897–901.
- [6] J. Wu, T. Wang:“ Ozonation of aqueous azo dye in a semi batch reactor”, *Wat. Res.*, **2001**, 35 (4), 1093–1099.
- [7] H.Y. Shu, M.C. Chang:“ Decolorization effects of six azo dyes by O₃, UV/O₃ and UV/H₂O₂ processes”, *Dyes and Pigments.*, **2005**, 65, 25–31.
- [8] U. Pagga, D. Brown:“ The degradation of dyestuffs. Part II. Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests”, *Chemosphere.*, **1986**, 15, 479–491.
- [9] E.O. Uthus and C.D. Seaborn:“Deliberations and evaluations of the approaches, endpoints and paradigms for dietary recommendations of the other trace elements”, *J. Nutr.*, **1996**, 126, 2452–2459.
- [10] M. Boisset. CNAM (Conservatoire National des Arts et Métiers): “Contamination des denrées alimentaires par les métaux toxiques”, Paris. **2000**.
- [11] S. Ghalem, thèse de doctorat, Université Paris 7, France, **1996**

- [12] M. Heitzmann, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier Grenoble 1, **2006**
- [13] A. Anouar, Abdellah, thèse de doctorat, Université Chouaib Doukkali, Settat, Maroc, **2001**.
- [14] A.C.F. Ribeiro a, M.A. Estesos, V.M.M. Lobo, A.J.M. Valente, S.M.N. Simo~, A.J.F.N. Sobral, H.D. Burrows: "Interactions of copper (II) chloride with sucrose, glucose, and fructose in aqueous solutions" *J. Mol. Struct.*, **2007**, 826, 113–118.
- [15] H. Khanmohammadi, K. Rezaeian, M. M. Amini, S. Weng Ng: "Azo-azomethine dyes with N, O, S donor set of atoms and their Ni(II) complexes: Synthesis, characterization and spectral properties", *Dyes and Pigments*, 2013, 98, 557–564.
- [16] S. KrSardar, P. K. Mandal, S. Bagchi: "Electronic spectral study of interaction of electron donor-acceptor dyes in the ground and excited state with a metal ion. Effect of molecular structure of the dye", *Journal of Luminescence*, **2014**, 145, 25–32.
- [17] R. kilinçarslan, E. Erdem, H. Kocaokutgen: "Synthesis and spectral characterization of some new azo dyes and their metal complexes", *Transition Metal Chemistry*, **2007**, 32, 102–106.
- [18] L. Szabo, K. Herman, N.E. Mircescu, A. Falamas, L.F. Leopold, N. Leopold, C. Buzumurga, V. Chis: "SERS and DFT investigation of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and its metal complexes with Al(III), Mn(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II) and Pb(II)", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.*, **2012**, 93, 266–273.
- [19] A.C. Ribeiro Gomes, L.D.F. Cafer, P. Homem-de-Mello, M.D Coutinho-Neto, I. Gaubeur: "The interaction of an azo compound with a surfactant and ion pair adsorption to solid phases", *Journal of Colloid and Interface Science.*, **2012**, 367, 370–377.
- [20] M. Szymczyk, A. El-Shafei, H.S. Freeman: "Design, synthesis, and characterization of new iron-complexed azo dyes", *Dyes and Pigments.*, **2007**, 72, 8–15.
- [21] J. Jayabharathi, V. Thanikachalam, M.V. Perumal, N. Srinivasan: "A physiochemical study of azo dyes: DFT based ES IPT process", *Spectrochimica Acta Part A.*, **2011**, 83, 200–206.
- [22] A.P. Souza, R.F. Gerlach, S.R.P. Line: "Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam", *Biomaterials.*, **2001**, 22(14), 2025–2030.

- [23] M. Pizzichini, M. Fonzi, L. Sugherini, L. Fonzi, A. Gasparoni, M. Comporti A. Pompella:“ Release of mercury from dental amalgam and its influence on salivary antioxidant activity “, *Science of The Total Environment.*, **2002**, *284(1-3)*, 19–25.
- [24] T. Okabe, B. Elvebak, L. Carrasco, J.L. Ferracane, R.G. Keanini, H. Nakajima:“ Mercury release from dental amalgams into continuously replenished liquids “, *Dental Materials.*, **2003**, *19(1)*, 38–45.
- [25] J. Mutter, J. Naumann, C. Sadaghiani, H. Walach, G. Drasch:“ Amalgam studies: Disregarding basic principles of mercury toxicity “, *International Journal of Hygiene and Environmental Health.*, **2004**, *207(4)*, 391–397.
- [26] S.K. Al-Salehi, P.V. Hatton, C.A. Miller, C. Mcleod, A. Joiner:“ The effect of carbamide peroxide treatment on metal ion release from dental amalgam “, *Dental Materials.*, **2006**, *22(10)*, 948–953.
- [27] Y. Xibiao, Q. Haojun, X. Peicheng, Z. Lin, P. Matthew, H.F. Longnecker:“ Nephrotoxicity, neurotoxicity, and mercury exposure among children with and without dental amalgam fillings “, *International Journal of Hygiene and Environmental Health.*, **2009**, *212(4)*, 378–386.
- [28] G.M. Richardson, R. Wilson, D. Allard, C. Purtill, S. Douma, J. Gravière:“ Mercury exposure and risks from dental amalgam in the US population, post-2000 “. *Science of the Total Environment.*, **2011**, *409(20)*, 4257–4268.
- [29] M.N. Bates:“ Dental Amalgam Fillings: A Source of Mercury Exposure “, *Encyclopedia of Environmental Health.*, **2011**, *2*, 11–20.

Chapitre I

Méthodes de la Modélisation Moléculaire et

Approches Théoriques de la Réactivité

I. Méthodes de la modélisation moléculaire

I.1. Introduction

On définit la modélisation moléculaire comme une application des méthodes théoriques et de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simple et utilisables rapidement ou au contraire elles peuvent être extrêmement complexes et coûteuses en temps de calcul sur ordinateur, même sur un superordinateur. De plus, ces méthodes utilisent souvent des moyens infographiques très sophistiqués qui facilitent grandement la transformation de quantités impressionnantes de nombres en quelques représentations graphiques facilement interprétables [1].

Ces dernières années les techniques de modélisation moléculaires sont considérées (au moins pour sa partie routine) comme une technique analytique au même titre que la RMN ou d'autres techniques spectroscopiques (IR, UV, dichroïsme,...) du côté prédiction et interprétation des résultats.

La conversion de la majorité des équipes de recherches à la réalisation de calculs théoriques avant le passage à la synthèse se justifie par la possibilité prédictive à une approche des phénomènes délicats au niveau atomique par ailleurs très difficiles à analyser avec des outils classiques. Un autre point non négligeable est la possibilité d'effectuer une étude préparatoire, en général peu coûteuse, d'un phénomène d'intérêt afin de planifier une analyse expérimentale qui sera coûteuse, cela dans le but d'éviter au maximum les gaspillages ou les mauvaises directions.

A cause de l'augmentation continue de la puissance des processeurs, et ce à cout quasiment constant, pratiquement tout le monde dispose sur son bureau d'une puissante machine de calcul largement suffisante pour effectuer des calculs routiniers de minimisation, drug design ou calculs de dynamique moléculaire pour des protéines ou de petits systèmes [2]. On peut donc dire que le but principal de la modélisation moléculaire est de prévoir la structure et la réactivité des molécules ou des systèmes de molécules. Les méthodes de la modélisation moléculaire peuvent être classées en deux catégories [3] :

✚ Les méthodes quantiques

✚ Les méthodes non quantiques

I.2. Mécanique Quantique (MQ)

Dans la MQ, la molécule est considérée comme un ensemble de noyaux atomiques, chacun d'eux étant entouré de ses électrons, qui sont entièrement décrits par l'équation de Schrödinger (Schrödinger, 1926) [4].

On peut résoudre l'équation de Schrödinger analytiquement seulement pour des problèmes très simples, tels que la particule unique dans une boîte, l'oscillateur harmonique ou l'atome d'hydrogène isolé. Afin d'effectuer des résolutions numériques complexes et d'obtenir des résultats dans un temps raisonnable, il est nécessaire d'introduire plusieurs approximations. L'**approximation de Born-Oppenheimer** [5] est la première et la plus fondamentale utilisée dans toutes les méthodes de MQ [6]. Selon cette approximation, le mouvement des électrons est séparé de celui des noyaux en prenant en compte le fait que les électrons sont beaucoup plus légers, et donc peuvent réagir à chaque changement de positions des noyaux presque immédiatement. On considère les noyaux comme fixes, donc la fonction d'onde électronique dépend seulement de leurs positions (et non de leurs mouvements). D'autres approximations généralement utilisées concernent la forme de la fonction d'onde, comme l'**approximation MO-LCAO** [7] qui représente l'orbitale moléculaire comme une combinaison linéaire d'orbitales atomiques. En fonction des autres approximations utilisées, les méthodes de MQ sont divisées en quatre groupes principaux:

I.2.1. Méthodes empiriques

Les méthodes empiriques, comme, par exemple, Hückel Molecular Orbital (HMO) or Extended Hückel Theory (EHT) réduisent considérablement les temps de calcul en ne considérant que les parties "nécessaires" ou "intéressantes" [8]. Ces méthodes utilisent des approximations très grossières qui produisent de grandes erreurs de calcul, et donc ne sont employées que très rarement.

I.2.2. Méthodes semi-empiriques

Toutes les méthodes semi-empiriques, telles que CNDO, INDO, NNDO, MNDO ou les bien-connues et encore utilisées **Austin Model 1 (AM1)** [9] et **Parametrization Method 3 (PM3)** [10a-b] négligent généralement le calcul de certaines intégrales et les remplacent par des paramètres expérimentaux. Ces paramètres peuvent être obtenus, par exemple, à partir des caractéristiques spectrales des atomes, de calcul *ab initio* de haut niveau ou d'autres méthodes expérimentales [11]. Une approximation supplémentaire des méthodes semi-empiriques est de considérer uniquement les électrons de valence dans le calcul, le reste des électrons étant inclus dans le "cœur" (avec le noyau), qui n'est pas pris en compte dans le calcul. De cette manière, tout en appartenant toujours aux méthodes QM, ces approches réduisent considérablement la puissance de calcul requis par rapport aux méthodes *ab initio* classiques et elles peuvent être utilisées dans l'étude des réactions chimiques.

I.2.3. Méthodes *ab initio*

Les méthodes *ab initio* résolvent l'équation de Schrödinger en utilisant un nombre minimal d'approximations, telles que celles de Born-Oppenheimer et de MO-LCAO. Elles ne comportent aucun paramètres expérimental ou empirique. Le problème principal des méthodes *ab initio* est la résolution des interactions électrostatiques entre les électrons.

La méthode **Hartree-Fock (HF)** [12] était la première théorie introduite pour donner une réponse à ce problème. L'ensemble des électrons est défini de manière à ce que chaque électron se déplace dans le champ électrostatique moyen des autres électrons. Le système entier est donc décrit par une série d'équations HF, qui sont résolues par un processus itératif en utilisant la méthode du **self-consistent field (SCF)**. Dans la procédure SCF, les fonctions « Ψ » de toutes les orbitales moléculaires (OM) sont initialement estimées et sont utilisées pour construire les opérateurs hamiltoniens de chaque électron. Ces opérateurs hamiltoniens sont nécessaires pour générer une nouvelle série de « Ψ », qui sera plus précise. Ce cycle est répété jusqu'à ce que la convergence soit atteinte. La qualité des résultats de méthodes HF dépend de la qualité de l'expansion de la fonction d'onde

dans l'ensemble des bases (voir le titre *I.2.5. Fonctions des bases* pour plus d'information). L'énergie calculée par la méthode HF convergera vers la meilleure énergie accessible (limite HF) avec l'ensemble des bases complet.

I.2.4. Méthodes qui traitent la corrélation

I.2.4.1. Méthodes post- Hartree-Fock

Malheureusement, la limite HF n'est pas encore l'énergie réelle à cause de quelques approximations supplémentaires dans la théorie HF. Cette théorie, par exemple, ne prend pas en compte les possibles effets relativistes, par exemple que la masse des électrons n'est pas forcément constante et qu'elle peut changer en fonction de leur vitesse.

Une autre approximation, selon laquelle l'électron est en mouvement dans le potentiel moyen des autres électrons, et donc que sa position n'est pas affectée par la position des électrons voisins, ne permet pas de représenter les effets de corrélation électronique. Cette **énergie de corrélation** est définie comme la différence entre l'énergie exacte et l'énergie limite de HF.

De nombreuses **méthodes qui traitent la corrélation électronique**, appelées aussi **méthodes post- Hartree-Fock**, ont été développées pour inclure l'énergie de corrélation dans le calcul [13]. Les méthodes les plus populaires et les plus fréquemment utilisées sont, par exemple,

- La méthode de **perturbation Møller-Plesset** [14] dans les versions MP2, MP4 et MP6.
- Les méthodes d'interaction de configuration « **configuration-interaction (CI)** » [6, 15-16] utilisées dans les niveaux CIS, CID, CISD ou QCISD.
- Les méthodes de **coupled clusters (CC)** [17] utilisées le plus fréquemment dans les variantes CCSD ou CCSD(T).

I.2.4.2. Les méthodes de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT)

Les méthodes de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) [18] dans leur utilisation comme alternatives aux méthodes *ab initio* sont fondées sur un autre niveau de théorie – les théorèmes de Hohenberg-Kohn [19].

Dans ces méthodes, la fonction d'onde « Ψ » de l'état fondamental non-dégénéré d'un système multi-électrons est substituée par la fonctionnelle apparente de la densité

électronique r . Le gros avantage de la DFT par rapport aux méthodes *ab initio* est qu'on n'a pas besoin de calculer la fonction d'onde entière du système à N particules, mais que seule la densité électronique totale est calculée pour obtenir toutes les propriétés de l'état fondamental [20]. La charge de calcul est beaucoup plus faible, car la densité électronique r , fonction de trois variables, est un objet plus simple que la fonction d'onde Ψ à N variables. Une autre simplification du calcul découle du fait que la DFT n'exige qu'une minimisation du potentiel d'énergie $E[r(r)]_{\text{vext}}$ au lieu de la solution exacte de l'équation Schrödinger comme c'est le cas dans les méthodes *ab initio*.

La première méthode DFT utilisable était la **théorie de la fonctionnelle de la densité de Kohn-Sham (KS-DFT)** [21] qui incluait la corrélation électronique et les effets d'échange. Généralement, les méthodes DFT nécessitent la construction de la fonctionnelle d'énergie. Les fonctionnelles utilisées le plus fréquemment sont la fonctionnelle d'énergie échange **Becke-88 (B88)** [22], les fonctionnelles d'énergie de corrélation de **Vosko-Wilk-Nussair** [23] et de **Lee-Yang-Parr** [24], la combinaison de B88 avec LYP appelée **BLYP**, ou bien la fonctionnelle hybride **B3LYP** (Becke 3-parameters Lee-Yang-Parr) est une fonctionnelle à trois paramètres combinant les fonctionnelles d'échange local, d'échange de Becke et d'échange HF, avec les fonctionnelles de corrélation locale (VWN) et corrigée du gradient de Lee, Yang et Parr :

$$E_{xc}^{B3LYP} = (1 - a_0 - a_x) E_x^{LDA} + a_0 E_x^{HF} + a_x E_x^{B88} + a_c E_c^{LYP} + (1 - a_c) E_c^{VWN}$$

Où les paramètres a_0 , a_x et a_c ont été ajustés respectivement à 0,20, 0,72 et 0,81 [25].

I.2.5. Fonctions de base

Les méthodes HF et DFT comportent un calcul d'intégrales de fonctions d'orbitales atomiques. Le nombre et la configuration de ces fonctions d'orbitales atomiques sont l'**ensemble des fonctions de base**. Les orbitales atomiques ont généralement la forme d'**orbitales de type Slater (STO)**, mais en raison de la complexité de leur manipulation, elles sont souvent réduites à des **orbitales de type Gaussian (GTO)**. Le plus petit ensemble de fonctions de base est appelé STO-3G. Il utilise seulement une STO avec des orbitales s

pour les atomes d'hydrogène et des orbitales s et p pour les autres atomes. La STO est alors développé en trois GTOs [11].

On peut améliorer la qualité des résultats en utilisant deux ou trois STOs pour les orbitales atomiques au lieu d'un ensemble de fonctions de base double ou triple Zéta. Une alternative à cette approche est l'utilisation d'ensembles de base **split-valence** 3-21G, 4-31G, 6-31G, ou 6-311G. Ces bases développent deux (ou trois) STOs pour les électrons de valence, et une STO pour les électrons des couches internes, en utilisant le nombre approprié de GTOs. Par exemple dans l'ensemble 6-31G, l'orbitale des couches internes est développée dans une série de six GTOs, tandis que les orbitales de valence sont développées dans une série de trois GTOs pour la première orbitale et une GTO pour la deuxième orbitale. Une autre amélioration consiste en l'addition de **fonctions de polarisation** (indiquées par *): on peut rajouter les orbitales d pour les atomes non-hydrogène (6-31G*) ainsi que les orbitales p pour les atomes hydrogènes (6-31G**). Pour les anions ou les composés riches en électrons, il est recommandé d'ajouter les **fonctions diffusées** (indiquées par +) à l'ensemble des fonctions de base. Ainsi, l'ensemble le plus fréquemment utilisé est le 6-31+G, qui rajoute les fonctions de diffuses s et p aux atomes non-hydrogènes et le 6-31++G, qui rajoute les fonctions p aux atomes hydrogène [26]. Il est également possible de combiner les fonctions de polarisation et les fonctions de diffuses [27].

I.3. Mécanique Moléculaire (MM)

Malgré le grand succès qu'ont reçu les méthodes de la mécanique quantique, leurs utilisations restent restreintes. En effet, les méthodes de MQ sont classées parmi les méthodes les plus vigoureuses mais elles sont très coûteuses en temps de calculs et parfois même il sera impossible de faire un calcul en utilisant les méthodes MQ pour des systèmes de grosse taille moléculaire même en utilisant les méthodes abrégées (semi empiriques). Si l'on désire donc modéliser une grosse molécule de taille supérieure à celles accessibles par la méthode semi-empirique alors il est possible d'éviter la mécanique quantique en utilisant la méthode de mécanique moléculaire (MM) [11].

La Mécanique Moléculaire permet le calcul de l'énergie d'interaction d'un système en fonction des seules positions des noyaux, en ignorant ainsi le mouvement des électrons.

L'approximation de Born-Oppenheimer est aussi utilisée, cependant, le mouvement des noyaux n'est plus décrit par un Hamiltonien quantique comme en Mécanique Quantique, mais par les descriptions de la mécanique classique où les atomes sont assimilés à des points massiques (éventuellement chargés) et les liaisons chimiques à des ressorts mécaniques.

I.3.1. Fonction d'énergie potentielle

La plupart des propositions de modèles moléculaires est basée sur l'utilisation d'une fonction d'énergie potentielle empirique V en fonction des coordonnées atomiques r_i , avec $i = 1, 2 \dots N$ avec N : le nombre d'atomes constituant le système. La fonction d'énergie est donc une fonction du jeu de coordonnées cartésiennes R spécifiant les positions de tous les atomes à partir desquelles sont calculées les coordonnées internes du système.

La fonction énergie potentielle est représentée comme une hyper-surface à $3N-6$ dimensions. Elle est définie empiriquement comme étant la somme des différentes contributions traduisant les interactions physiques inter et intramoléculaires du système étudié. La fonction d'énergie est généralement décrite en termes internes reliés directement aux liaisons covalentes des atomes (interactions liantes) et en termes externes traduisant les interactions entre atomes non liés de manière covalente (interactions non liantes).

L'ensemble de ces termes et ces paramètres sont utilisés pour décrire chaque type d'atome rencontré qui se traduit par un champ de forces qui comporte généralement cinq contributions principales [28].

$$E_{stérique} = E_{liaison} + E_{angle} + E_{torsion} + E_{VdW} + E_{elec} + E_{hydrogen}$$

L'expression de l'énergie d'un composé est exprimée par des équations algébriques simples dans la méthode de MM.

La MM n'utilise pas de fonction d'onde d'électron ni de densité électronique. Les constantes des équations sont obtenues à partir des données expérimentales spectroscopiques et à partir des calculs *ab initio*.

I.3.2. Champs de force

On appelle champ de force le modèle mathématique représentant l'énergie potentielle d'une molécule en mécanique moléculaire.

Le champ de force exprime réellement la moyenne les interactions électroniques entre les atomes [25].

Le champ de force permet d'accéder à l'hyper-surface énergétique d'une molécule en établissant un lien entre les déformations structurales du système et son énergie potentielle. Il désigne à la fois l'équation mathématique (fonction d'énergie potentielle) et les paramètres qui la composent [29]. La fonction d'énergie potentielle définit une énergie empirique, l'énergie totale étant décomposée en une somme de termes additifs représentant chacune des interactions inter atomiques. Elle est exprimée comme une somme de contributions de plusieurs types d'interaction [30-31,25, 32-34]. Elle peut se décomposer en termes d'interaction intramoléculaire (Terme des atomes liés) et un terme d'interaction intermoléculaire (Terme des atomes non liés).

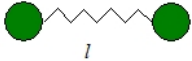
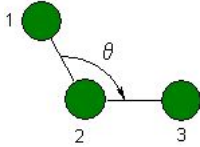
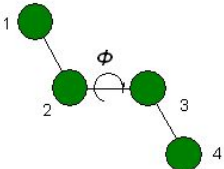
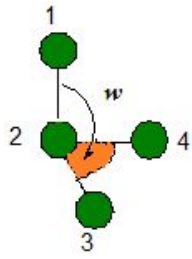
I.3.2.1. Terme des atomes liés

Les interactions intramoléculaires ne dépendent que des coordonnées internes des molécules c'est-à-dire des liaisons, des angles de valence, et de torsions. En fait pour, affiner l'expression du terme potentiel et rendre plus fidèle la description du système, des termes de couplages entre différents atomes ont été introduits. Le terme d'interaction d'énergie intramoléculaire peut s'écrire sous la forme :

$$E_{\text{atomes-liés}} = E_{\text{liaisons}} + E_{\text{angles}} + E_{\text{diédres}} + E_{\text{impropres}}$$

Chacun des termes de $E_{\text{atomes-liés}}$ est décrit et illustré dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Fonctions d'énergie associées aux atomes liés.

Terme du champ de force	Expression générale	Description	Illustration
Energie de liaisons	$E_{liaisons} = \sum_l k_l (l - l_0)^2$ <p>l_0 : longueur de liaison à l'équilibre k_l : constante de force</p>	Définit l'énergie mise en jeu par les variations de la longueur r des liaisons après extension et compression à partir de leurs valeurs d'équilibre.	
Energie de déformation des angles de valence	$E_{angles} = \sum_{\theta} k_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$ <p>θ_0 : angle à l'équilibre k_{θ} : constante de force</p>	Définit l'énergie impliquée dans les variations d'angle θ entre deux liaisons contiguës, autour d'une valeur d'équilibre θ_0	
Energie de torsion	$E_{torsions} = \sum_{\phi} K_{\phi} [1 + \text{Cos}(n\phi)]$ <p>k_{ϕ} : constante de force n : périodicité ($n = 1, 2, 3, 4, 6$)</p>	Définit l'énergie impliquée dans la rotation d'une partie d'une molécule autour d'une liaison	
Energie des angles impropres	$E_{impropres} = \sum_w k_w (w - w_0)^2$ <p>k_{ω} : constante de force ω_0 : valeur idéale définie dans le champ de force</p>	Assure le maintien de la planéité ou de la chiralité d'un groupe d'atomes déterminés	

I.3.2.2. Terme des atomes non liés

Les interactions intermoléculaires prennent en compte les interactions qui n'interagissent pas par des termes de liaison, d'angle de courbure et d'angle de torsion. Le potentiel non liant s'exprime en trois termes : un terme de Van der Waals, terme d'énergie électrostatique et un terme des liaisons hydrogène.

Ce terme s'exprime sous la forme :

$$E_{\text{atomes-non-liés}} = E_{V.d.W} + E_{\text{électrostatique}} + E_{\text{liaisons-hydrogène}}$$

L'expression générale de ces termes est reportée dans le Tableau 2

Tableau 2 : Fonctions d'énergie associées aux atomes non liés.

Terme du champ de force	Expression générale
Energie de van der Waals	$E_{\text{Van_der_waals}} = \sum_{i < j} \left[\left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} \right) - \left(\frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \right]$ <p>A_{ij}, B_{ij} : paramètres dépendant de la nature des atomes i et j, distants de r_{ij}.</p>
Energie des interactions électrostatiques	$E_{\text{électrostatique}} = \sum_{i < j} \left(\frac{q_i q_j}{\epsilon_{ij} r_{ij}} \right)$ <p>q_i, q_j : charges partielles des atomes i et j, distants de r_{ij}. ϵ_{ij} : constante diélectrique rendant compte de l'atténuation de l'interaction électrostatique par l'environnement (solvant ou molécule elle-même).</p>
Energie des liaisons hydrogène	$E_{\text{Liaisons_hydrogène}} = \sum_{i < j} \left[\left(\frac{A'}{r_{AD}^{12}} \right) - \left(\frac{B'}{r_{AD}^{10}} \right) \right] \text{Cos}^m \theta_{A-H-D} \text{Cos}^n \theta_{AA-A-H}$ <p>A', B' : paramètres dépendant de la nature du donneur et de l'accepteur de liaisons H, distants de r_{AD}. θ_{A-H-D} : angle formé par l'accepteur (A), l'hydrogène (H) et le donneur (D). θ_{AA-A-H} : angle formé par l'antécédent de l'accepteur (AA), A et H. m, n : exposants donnés par le type de D et A, $m = 0, 2, 4$; $n = 0, 2$.</p>

Il est important de noter que les champs de forces constituent une approche purement empirique. Ils sont paramétrés de manière à ce que l'ensemble des différentes contributions permette de reproduire une série de résultats expérimentaux. Un champ doit donc toujours être considéré comme une entité indivisible et il est exclu de combiner les termes et/ou les paramètres de deux champs dans l'espoir d'obtenir un meilleur ensemble [35]. En outre, le paramétrage vise souvent à ce que le champ de forces puisse traiter de manière réaliste une catégorie particulière de composés. On peut ainsi trouver des champs destinés plus spécialement à la modélisation de petites molécules organiques [36] de macromolécule comme les protéines et les acides nucléiques [36], de nucléotides [37] de complexes organométalliques [36], quant à elle, permet de modéliser tous les éléments du tableau périodique. Il est donc dans un premier temps important de vérifier si le champ choisi est adapté au système à étudier.

I.3.3. Différents champs de force en mécanique moléculaire

Différents champs de force utilisent le même type de termes énergétiques mais paramétrés de manières différentes. Les champs de forces en MM peuvent être groupés en trois classes principales [38] :

- Champs de force contenant uniquement les termes harmoniques.
- Champs de force utilisant les termes d'ordre supérieur (cubique, quadratique,...).
- Champs de force suggérés par *Allinger et col* [39] ne considérant pas que les termes de la mécanique moléculaire classique mais aussi les effets chimiques comme l'électronégativité.

Dans ce qui suit on va présenter les principaux champs de forces utilisés dans les calculs de la MM.

MM2/MM3/MM4 :

MM2 est le premier champ de force développé par Allinger et col [40-42]. Il a été conçu au début pour les molécules simples (alcane, alcène, alcyne non conjugués,

amines...), mais ses versions améliorées MM3 (1989) [43] et MM4 (1996) [44] permettent de traiter des molécules organiques de plus en plus complexes.

OPLS:

Le programme OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations), comme l'indique son nom, est conçu pour optimiser le potentiel qui permet la description des propriétés de solvation. Il est élaboré par W. L. Jorgensen et J. Tirado Rives [45].

GROMOS:

GROMOS (Groningen Molecular Simulation Program Package), développé par Van Gunsteren [46] il est conçu spécialement pour les biomolécules en milieu aqueux en vue de l'étude des interactions entre les molécules d'eau et les groupements polaires des protéines.

CHARM (Bio+):

Développé par Karplus et col [47-50], pour le calcul de biomolécules. Son concept est semblable à celui d'AMBER. Bien qu'au début, ce champ de force était conçu pour les acides aminés et les protéines, actuellement on l'utilise pour étudier d'autres biomolécules.

SPASIBA:

(Spectroscopic Potential Algorithm for Simulating biomolecular conformational Adaptability), élaboré par Gérard Vergoten et col. (1995). Il combine le champ de force spectroscopique modifié de Urey-Bradley-Shimanouchi [51] et le champ de force AMBER.

Il permet de trouver les structures, les énergies de conformation et les fréquences vibrationnelles au minimum énergétique d'une molécule [52].

AMBER:

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) réalisé par Kollman [53]. Ce champ de force est paramétré pour les protéines et les acides nucléiques (UCSF, 1994). Il a été utilisé pour les polymères et pour d'autres petites molécules.

EMO:

Le programme EMO (Energy Of Molecule), est développé par B. Blaive [54-56-37], il est basé sur un champ de force qui contient trois menus :

- Menu 1 : entrée de la molécule à l'aide d'un clavier.
- Menu 2 : manipulation géométrique sur la molécule.
- Menu 3 : minimisation de l'énergie par mécanique moléculaire.

I.3.4. Minimisation de l'énergie

La mécanique moléculaire nous permet de minimiser l'énergie stérique [57]. Le rôle de la minimisation est essentiellement de relaxer la structure initiale et d'éliminer les mauvais contacts interatomiques.

Les structures « minimisées » correspondent généralement au minimum local le plus proche de la structure de départ plutôt qu'au minimum global d'énergie.

La minimisation permet aussi de trouver le minimum d'énergie potentielle suivant le champ de force utiliser et sous les contraintes imposées. Ces méthodes autorisent généralement des changements de conformation plus importants grâce à la réduction du nombre et de la nature des variables ou la simplification du champ de force.

Les méthodes de minimisation sont basées sur le calcul des dérivées de la fonction d'énergie et utilisent des processus itératifs : à partir de l'énergie potentielle et du gradient, calculés pour un jeu de coordonnées, ces algorithmes génèrent un nouveau jeu de coordonnées correspondant à une énergie potentielle plus basse.

D'autre part, il existe également des méthodes hybrides de Mécanique Moléculaire / Mécanique Quantique (QM/MM) qui ont été développées pour essayer de profiter des avantages des deux méthodes. Le principe de base étant d'utiliser la Mécanique Quantique pour une zone restreinte d'intérêt comme le site actif d'une protéine et de traiter le reste du système avec la mécanique moléculaire pour gagner du temps de calcul [58].

I.4. Dynamique Moléculaire (DM)

La dynamique moléculaire est la méthode la plus fréquemment utilisée pour la simulation de systèmes réels. Le principe de base de cette méthode est l'échantillonnage de l'espace conformationnel du système étudié par l'intégration des équations du mouvement de Newton pour tous les atomes présents dans le système.

Les simulations de DM consistent à calculer les positions et les vitesses d'un système d'atomes [59]. Elles sont très importantes pour la recherche du comportement structural des biomolécules en fonction du temps. En utilisant la DM, on peut étudier la flexibilité ou la rigidité des biomolécules, mesurer les interactions intermoléculaires entre la protéine et les ligands ou d'autres biomolécules, calculer l'énergie libre ou bien étudier l'effet du solvant sur la structure des biomolécules. Ainsi, au contraire de la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire produit des conformations qui dépendent moins de la structure initiale.

Les champs de forces utilisés sont les mêmes que ceux employés dans les méthodes de minimisation. La dynamique moléculaire introduit donc la dimension du temps dans l'étude des molécules. L'évolution temporelle ou trajectoire d'une molécule est décrite par la résolution des équations du mouvement de Newton :

$$\vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2}$$

Où :

\vec{F}_i : Vecteur force agissant sur l'atome i, m_i est la masse d'atome, \vec{a}_i est son accélération, t est le temps, \vec{r}_i : est le vecteur de position, sont les coordonnées Cartésiennes de l'atome (position de l'atome i).

La force F_i agissant sur l'atome i se calcule à partir de l'énergie potentielle totale (E) de la molécule:

$$\vec{F}_i = -\frac{dE}{d\vec{r}_i}$$

L'intégration des équations de mouvement est rendue possible par l'utilisation d'algorithmes comme celui de Verlet.

Une simulation de dynamique moléculaire se réalise généralement en quatre étapes:

- 1- Une étape de minimisation de la structure initiale destinée à éliminer les contacts stériques.
- 2- Une étape dite de thermalisation au cours de laquelle les vitesses des atomes sont augmentées progressivement afin d'atteindre la température finale choisie.
- 3- Une étape d'équilibration pendant laquelle les vitesses ne sont plus modifiées. L'énergie cinétique se répartit sur toute la molécule afin d'atteindre son état d'équilibre.
- 4- Enfin, pendant la dernière étape, appelée dynamique productive, les coordonnées et les vitesses sont sauvegardées pour une analyse de la dynamique.

Deux points importants doivent être pris en compte:

La température d'une molécule ou agitation thermique correspond en réalité à l'énergie cinétique des atomes de la molécule puisque :

$$E_{\text{cinétique}} = \frac{1}{2} \sum m_i v_i^2 = \frac{3}{2} N K_b T$$

Ou :

v_i^2 : Valeur de la moyenne carrée de la vitesse.

N : Nombre d'atomes du système.

K_b : Constante de Boltzmann.

T : Température absolue.

I.5. Docking Moléculaire

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les molécules. De même, la découverte de nouvelles molécules activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "amarrage moléculaire" ou "docking", ont été développées. Il est à noter que les substrats et les inhibiteurs sont définis par le

terme générique de "ligand", tandis que le terme "récepteur" est utilisé pour la cible sur laquelle le ligand va se fixer, que ce soit une enzyme ou un récepteur protéique.

Afin d'obtenir le minimum global d'énergie d'interaction entre le ligand et le récepteur, la plupart des méthodes d'amarrage moléculaire repose donc sur des minimisations d'énergie, des recuits simulés, des calculs de Monte-Carlo, de complémentarité de surface, d'énergie libre ou encore sur des algorithmes génétiques.

I.5.1. Un programme de docking moléculaire

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles [60].

Parmi tous ces programmes d'amarrage moléculaire qui ont déjà prouvé leur efficacité, on peut trouver : comme GOLD [61], FlexX [62], DOCK [63], AutoDock [64], MOE [65] ou bien UCSF Chimera [66] Molegro Virtuel Docker (MVD) [67,68] et Glide [69].

R. Thomsen et al [70] ont fait une comparaison entre 4 logiciels de docking et ils ont montré que le MVD est le plus précise (MVD: 87%, Glide: 82%, Surflex: 75%, FlexX: 58%).

Le MVD permet d'imposer au système l'exploration de l'espace conformationnel en autorisant certains degrés de liberté au ligand, tout en maintenant fixe le récepteur.

En fin, le Docking Moléculaire est l'étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes moléculaires telles que:

- Les interactions V.d.W.
- Les interactions électrostatiques (dipôle-dipôle, Leonard Johns).
- Les interactions Hydrogènes.

I.5.2. Le docking : du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité

Les premiers logiciels de docking développés au début des années 80 considéraient le récepteur et le ligand rigides en se basant sur le modèle « clé-serrure ». C'est sans aucun doute la catégorie la plus simple et rapide de docking. Mis en marche plus tard, ils ont distingué deux niveaux de docking :

-Le *docking semi-flexible* est "asymétrique" et généralement utilisé pour l'amarrage protéine-ligand, le ligand étant considéré comme flexible, la protéine gardée rigide.

-Le *docking flexible* enfin, traite la flexibilité des deux molécules, mais la flexibilité permise est limitée pour simplifier les modèles.

La quasi-totalité des programmes de docking utilisés actuellement proposent une approche qui prend en compte la flexibilité du ligand, tout en considérant le récepteur rigide (docking semi-flexible).

L'utilisation de tels programmes mènent à de bons résultats, principalement quand la protéine a une flexibilité limitée. En effet, dans de tels cas, la structure cristallographique peut être considérée comme plus représentative de l'état de la protéine dans son environnement naturel, ce qui augmente les chances de simuler correctement le mode d'interaction protéine-ligand [71].

I.5.3. Un processus de Docking Moléculaire

Le but du Docking Moléculaire est de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou de plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur [72].

Un processus de « Docking Moléculaire » peut être résumé en trois étapes :

- Caractérisation du récepteur et l'identification du site de fixation.
- L'orientation du ligand dans le site du récepteur.
- L'évaluation de l'orientation du ligand et de son adéquation au récepteur.

II. Approches théoriques de la réactivité chimique

II.1. Introduction

L'une des principales propriétés d'une molécule, c'est sa réactivité chimique, l'étude de cette réactivité et surtout sa prédiction permet de faciliter et d'orienter les expérimentateurs pour leurs synthèses, beaucoup de méthodes théoriques basées sur les principes de la mécanique quantique sont employées actuellement pour étudier la réactivité chimique [73,74]. Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories:

1- Les méthodes statiques dans lesquelles la réactivité est exprimée par des indices caractérisant la molécule à l'état isolé.

2- Les méthodes dynamiques dans lesquelles la réactivité est exprimée par des indices caractérisant la molécule en état d'interaction avec d'autres molécules.

Dans ce chapitre nous avons présenté les théories les plus utilisées pour l'étude de la réactivité chimique, à savoir:

- La théorie de l'état de transition (TST) [75].
- La théorie des orbitales moléculaires frontières (FMO) [76,77].
- Le principe HSAB (*Hard and Soft Acids and Bases*) global [78,79].
- Les concepts chimiques et indices de réactivité dérivant de la DFT [80,81].

II.2. Théorie de l'état de transition (TST)

La théorie de l'état de transition a été développée par Eyring en 1931 [75] pour expliquer les vitesses réactionnelles observées en fonction des paramètres thermodynamiques. Elle préconise que les réactifs doivent franchir un état de transition sous forme de complexe activé et que la vitesse de cette réaction est proportionnelle à la concentration de ce complexe activé. L'avantage primordial de cette théorie est de relier la cinétique à la thermodynamique.

Les résultats obtenus par cette théorie sont avérés très satisfaisants comparés aux résultats expérimentaux disponibles. Cependant, le domaine d'application de cette théorie reste restreint étant donné que la localisation des états de transitions dans certains cas n'est pas toujours facile. En effet, la présence de substituant trop volumineux, la présence

de catalyseurs organiques ou organométalliques et la présence de solvants peuvent rendre la localisation des états de transition très difficile.

A cet égard, plusieurs solutions ont été proposées pour essayer de surmonter ces contraintes, où les chimistes théoriciens ont pensé à faire appel à d'autres théories qui conduisent aux mêmes résultats que la TST mais en étant plus pratiques et moins coûteuses en temps de calcul. Parmi ces théories, on peut citer la théorie FMO et la théorie de la DFT conceptuelle.

II.3. Théorie des orbitales moléculaires frontières (FMO)

Durant les années 50, La théorie des orbitales moléculaires frontières FMO a été développée par Fukui pour expliquer la régiosélectivité observée lors de réactions mettant en jeu des composés aromatiques. Notamment aux systèmes π , puis aux systèmes σ , où l'idée originale de Fukui consiste à postuler qu'au cours d'une réaction entre un nucléophile et un électrophile, le transfert de charge qui a lieu au voisinage de l'état de transition met en jeu principalement les électrons de l'orbitale moléculaire la plus haute occupée (HOMO) du nucléophile.

La théorie FMO joue un rôle primordial dans la rationalisation de la réactivité chimique. Cependant, elle a échoué dans plusieurs cas. La principale raison en est son champ d'application, qui n'a été correctement établi qu'à partir de l'équation de Klopman-Salem proposé en 1968 et qui a été critiquée également dans les années 89 par Dewar [82].

II.4. Principe HSAB

En 1960 Pearson a introduit, le principe HSAB (Hard and Soft Acids and Bases) afin d'interpréter une grande part des interactions entre espèces chimiques par des interactions de type acido-basique. Sur la base de résultats expérimentaux, le concept de *dureté* et *mollesse* a alors été introduit et les acides et les bases de Lewis ont été classés en deux catégories : dur ou mou présentés dans le tableau suivant.

Tableau 3: Classification des acides et bases de Lewis suivant Pearson [83]

	Durs	Intermédiaires	Mous
Acides de Lewis	H ⁺ , Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Cs ⁺ , Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Sr ²⁺ Sn ²⁺ , Al ³⁺ , Cr ³⁺ , Fe ³⁺ Ti ⁴⁺ , Pu ⁴⁺ , UO ₂ ²⁺ , Ln ³⁺	Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺	Cu ⁺ , Ag ⁺ , Au ⁺ , Hg ₂ ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Pt ²⁺ , Hg ²⁺
Bases de Lewis	H ₂ O, OH ⁻ , F ⁻ , AcO ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , ROH, RO ⁻ , R ₂ O, NH ₃ , RNH ₂	C ₆ H ₅ NH ₂ , C ₅ H ₅ N, N ₃ ⁻ , Br ⁻ , SO ₃ ²⁻	

R=alkyle ou aryle

En se basant sur cette classification, Pearson [79] a formulé son principe HSAB comme suit :

« Les acides durs préfèrent réagir avec les bases dures et les acides mous préfèrent réagir avec les bases molles ».

Sachant que :

Les acides *durs* comportent généralement des atomes accepteurs de petite taille, hautement chargés et ne possédant pas de doublets non liants sur leur couche de valence et les acides *mous* possèdent des atomes accepteurs peu chargés et de grande taille, facilement polarisables et peu électronégatifs.

Les atomes donneurs des bases *dures* se caractérisés par une électronégativité forte, une faible polarisabilité et sont difficiles à oxyder. Une base avec des atomes donneurs présentant des propriétés inverses est dite *molle*.

II.4.1. Concepts chimiques de réactivité résultant du principe HSAB

II.4.1.1. Potentiel chimique électronique μ

La figure 1 montre la variation de l'énergie totale d'une espèce chimique en fonction du nombre d'électrons. Le système peut être un atome, un ion ou un radical. Les énergies sont toutes négatives. Expérimentalement, on ne peut connaître que les points sur la courbe correspondants à des valeurs entières de N (nombre d'électrons). Cependant, il est plus commode de considérer une courbe de lissage liant les points.

Potentiel d'ionisation I: C'est l'énergie nécessaire pour arracher un électron d'un système. C'est-à-dire l'énergie nécessaire pour passer de la molécule neutre (N électrons) au cation (N-1 électrons) : $(M + I \rightarrow M^+)$

$$I = E(N-1) - E(N)$$

Affinité électronique A: C'est l'énergie gagnée par un système lorsqu'il capte un électron. C'est à dire le gain d'énergie qu'accompagne le passage d'un système neutre à un anion. $(M \rightarrow M^- + A)$

$$A = E(N) - E(N+1)$$

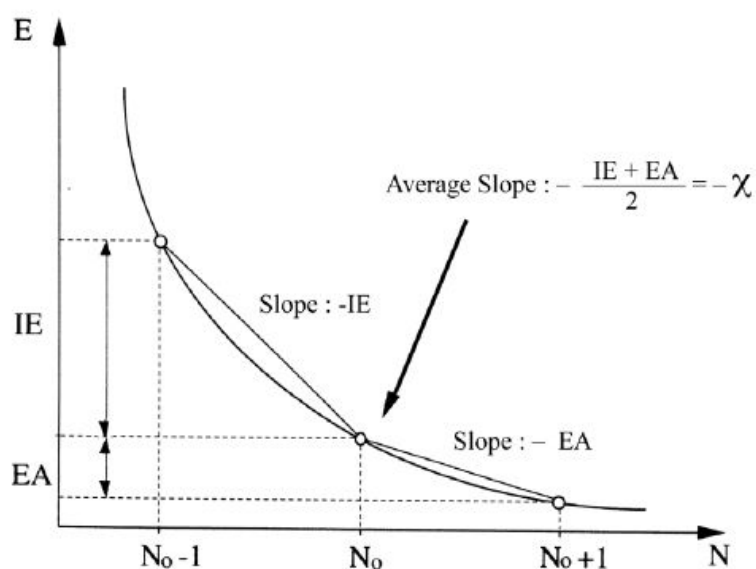


Figure 1 : Variation de l'énergie(E) du système en fonction du nombre total d'électrons (N)

En analysant la figure1, on peut déduire que :

La pente P1 du segment liant les points (N-1) et N n'est autre que $-I$. La pente P2 du

segment liant les points N et (N+1) n'est autre que $-A$.

Par conséquent, la pente moyenne au point N peut être approchée comme la valeur moyenne des deux pentes P1 et P2 :

$$pente = \frac{P1 + P2}{2} = \frac{-I - A}{2} \quad (1)$$

Cependant, la quantité $(-I-A)/2$ n'est autre que l'électronégativité de Mulliken au signe près.

Parr [9] a montré que la pente de la courbe (figure 1) est égale au potentiel chimique électronique μ .

$$pente = \mu = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right) \quad (2)$$

Cette propriété mesure la tendance des électrons à s'échapper d'une molécule. C'est une constante caractéristique de la molécule.

A partir des résultats précédentes, il vient :

$$\mu = -\chi \quad (3)$$

Si on fait réagir deux espèces chimiques A (acide) et B (base), les électrons vont se transférer de B vers A pour former une liaison de coordination. Mais cela ne peut se produire que si le potentiel chimique électronique de B est supérieur à celui de A ($\mu_B > \mu_A$). De plus, le transfert d'électrons va accroître le potentiel de A (μ_A) et décroître le potentiel de B (μ_B) jusqu'à ce qu'ils deviennent égaux au potentiel de la molécule AB (μ_{AB}) comme c'est illustré par la figure 2.

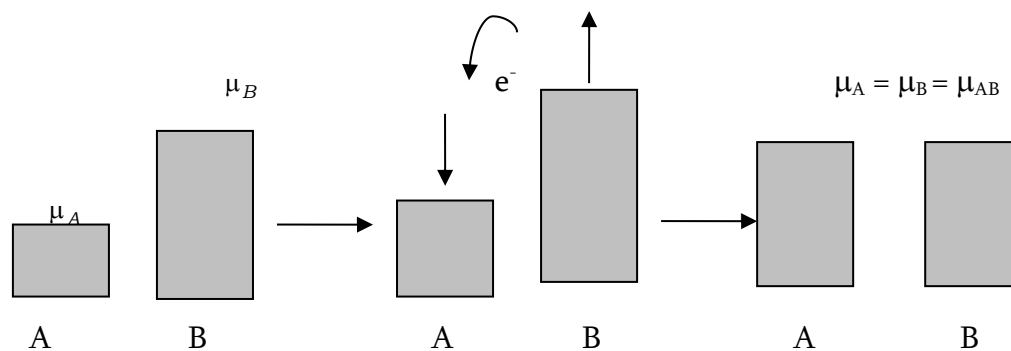


Figure 2: Variation des potentiels chimiques des deux espèces A et B lors d'une réaction

II.4.1.2. Dureté (Hardness) absolue

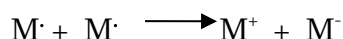
La deuxième propriété qu'on peut tirer à partir de la figure 2 est celle qui exprime la vitesse de changement de direction de la pente. Cette propriété est définie comme la dureté (*Hardness*) chimique :

$$\eta = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial^2 E}{\partial N^2} \right) = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial \mu}{\partial N} \right) \quad (4)$$

En utilisant la méthode des différences finies, on obtient :

$$\eta = \frac{I - A}{2} \quad (5)$$

La dureté (*Hardness*) absolue exprime la résistance d'un système au changement de son nombre d'électrons. Pour illustrer cette notion de résistance, nous considérons la réaction suivante :



Dans cette réaction un électron est pris de M et donné à M.

Le changement d'énergie correspondant est :

$$\Delta E = (E_{M^+} + E_{M^-}) - (E_{M \cdot} + E_{M \cdot}) = (E_{M^+} - E_{M \cdot}) + (E_{M^-} - E_{M \cdot}) = I - A$$

Par conséquent :

$$\Delta E_M = \frac{I - A}{2} \quad (6)$$

ΔE_M exprime la dureté de M. Une valeur nulle ou faible de la dureté signifie qu'il est facile pour les électrons de partir de M et vice-versa.

Par conséquent, on peut conclure que :

- Si ΔE_M est faible, la molécule M est dite molle (*soft*).
- Si ΔE_M est grande, la molécule M est dite dure (*hard*).

II.4.1.3. Mollesse (softness) absolue

La mollesse (*softness*) absolue d'un système est définie comme l'inverse de la dureté (*hardness*) :

$$S = \frac{1}{2 \eta} \quad (7)$$

Remarque :

Sachant que le succès d'un modèle de réactivité vient avant tout de sa capacité à rationaliser des principes de réactivité empiriques comme le principe HSAB de Pearson. D'autre part, Les mêmes concepts chimiques ont été dérivés à partir de la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT). Mais un des reproches qui a été fait à Pearson a propos du principe HSAB est le manque d'une définition rigoureuse de la dureté et de la mollesse.

Dans le cadre de la DFT, la dureté chimique est clairement définie (4) et une expression en est fournie par Parr (5). La classification des acides et des bases dans la catégorie « dur » ou « mou » que permet cette définition est en accord avec le principe HSAB. De plus, il a été récemment montré par Ayers [84] que la dureté chimique, telle qu'elle est définie dans le cadre de la DFT, peut être reliée à la charge, à la taille et à la polarisabilité d'un cation ou d'un anion, confirmant que l'utilisation de la DFT doit permettre de rationaliser le principe HSAB.

II.4.2. Principe de la dureté maximale MHP (Maximum Hardness Principle)

Pearson a formulé son principe de la dureté maximale (MHP) [85,86] comme suit « *Il paraît que les molécules s'arrangent de telle façon à être les plus dures possibles* ». Après plusieurs années et en se basant sur les concepts de la mécanique statistique et de la DFT, Parr et Chattaraj [87] ont fourni une justification théorique du principe MHP. Chattaraj et al [88] ont stipulé que la dureté chimique a été un indice primordial de stabilité de structures moléculaires (i.e. quand la molécule évolue d'une forme instable vers une forme équilibrée sa dureté globale augmente). La diminution de la dureté globale implique l'évolution d'une forme stable vers une autre moins stable [89].

II.5. Concepts chimiques et indices de réactivité dérivant de la DFT**II.5.1. Concepts et indices globaux de réactivité**

La DFT utilisée pour la détermination des propriétés électroniques d'un système est appelée DFT fondamentale ou computationnelle, c'est une méthode de calcul qui s'est

imposée comme une méthode crédible aux méthodes quantiques *ab initio*. Mais il existe un autre aspect qui n'a pas été mentionné. La DFT est pratique pour la détermination de concept. Plusieurs concepts chimiques de base (dureté, électronégativité) apparaissent naturellement. Ainsi la DFT est utile non seulement pour leur calcul mais aussi pour mieux comprendre cet aspect de la DFT est la cause d'une nouvelle branche qu'on a nommé DFT conceptuelle.

La théorie de la DFT fondamentale est basée sur deux théorèmes :

➤ **Premier théorème de Hohenberg et Kohn :**

Le premier théorème de Hohenberg et Kohn (H-K), expose que la densité électronique, $\rho(r)$, détermine le potentiel externe (i. e. du aux noyaux), $v(r)$. La démonstration de ce théorème a été qualifiée d'extrêmement simple par Parr et Yang [90].

L'énergie totale d'un système d'électrons dont la densité électronique est $\rho(r)$ et soumise à un potentiel $v(r)$, est donc :

$$E_v[\rho(r)] = \int \rho(r)v(r)dr + F[\rho(r)] \quad (8)$$

Tel que ; $F[\rho(r)] = T[\rho(r)] + V_{ee}[\rho(r)]$

➤ **Deuxième théorème de Hohenberg et Kohn :**

Le deuxième théorème de H-K généralise le principe variationnel. Il indique que pour une densité d'essai, $\rho'(r)$, tel que $\rho'(r) \geq 0$, et

$$\int \rho'(r)dr = N \quad (9)$$

Cette condition est vérifiée pour n'importe quelle densité électronique.

On a $E_0 < E_v[\rho'(r)]$ ou $E_v[\rho'(r)]$ est la fonctionnelle exprimé dans l'équation 8.

La recherche de la densité électronique optimale sous la contrainte de l'équation 9 conduit

à :

$$\delta \left\{ E_v[\rho(r)] - \mu \left[\int \rho(r)dr - N \right] \right\} = 0$$

Ou μ est le multiplicateur de Lagrange associé à la contrainte. On obtient donc :

$$\frac{\delta E_v[\rho(r)]}{\delta[\rho(r)]} - \mu = 0 \quad (10)$$

$$\mu = v(r) + \delta \frac{F[\rho(r)]}{\delta \rho(r)}$$

D'après les résultats obtenus par les deux théorèmes on constate que : Ce résultat indique que le potentiel externe et le potentiel d'interaction créé par la densité électronique est constant en tous point. μ qui été au départ introduit comme multiplicateur de Lagrange a une signification physique dont la découverte a fait le point de départ de la DFT conceptuelle.

II.5.1.1. Electronégativité et potentiel chimique électronique

Parr a défini le potentiel chimique électronique et l'électronégativité par :

$$\mu = -\chi = \left(\frac{\partial E}{\partial N} \right)_{v(r)} \quad (11)$$

La définition de μ dans l'équation (28) est plus préférable que celle donnée dans l'équation (10) qui donne μ comme une fonctionnelle $E[\rho(r)]$ dépendante ρ , qui n'est pas bien définie. Tandis qu'on peut avoir la variation de E par rapport à N

Cette définition est exactement la même déduite par Pearson à partir de la figure1.

II.5.1.2. Dureté et mollesse chimiques

Vue la discontinuité de l'énergie en fonction de N , on utilise généralement l'approximation de la différence finie pour obtenir η et S . Dans le cadre de cette approximation, η et S peuvent être écrits comme suit [81]:

$$\eta = \frac{I - A}{2} \quad (12)$$

$$S = \frac{1}{I - A} \quad (13)$$

I et A sont le potentiel de la 1^{ère} ionisation verticale et l'affinité électronique de la molécule respectivement.

Remarque : Le potentiel chimique électronique μ et la dureté globale η peuvent être calculés à partir des énergies des orbitales moléculaires frontières $\varepsilon_{\text{HOMO}}$ et $\varepsilon_{\text{LUMO}}$ comme suit [81,91]:

$$\mu = (\varepsilon_{\text{HOMO}} + \varepsilon_{\text{LUMO}}) / 2 \quad (14)$$

$$\eta = (\varepsilon_{\text{LUMO}} - \varepsilon_{\text{HOMO}}) \quad (15)$$

II.5.1.3. Electrophilie globale

L'indice d'électrophilie ω est lié au potentiel chimique μ par la relation suivante [92] :

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (16)$$

Cet indice exprime la capacité d'un électrophile d'acquérir une charge électronique supplémentaire.

On note que cet indice d'électrophilie a été utilisé pour classer une série de réactifs présents dans les réactions Diels–Alder et les cycloadditions 1,3-dipolar [93]. Une bonne corrélation entre la différence d'électrophilicite pour les couples (diène-diènophile) ou (dipôle - dipolarophile) et la faisabilité de cycloaddition [94].

II.5.1.4. Indice de nucléophilie globale

On note que l'indice de nucléophilie ne peut pas être définie par une procédure variationnelle, parce qu'il n'y a pas une stabilisation électronique moléculaire le long de la soustraction de la densité électronique d'une molécule.

En absence d'un descripteur de nucléophile, Domingo et al [95] ont proposé que le fait que si une molécule est faiblement électrophile, alors elle est systématiquement fortement nucléophile n'est vraie que pour des molécules simples. Par contre, les éthylènes capto-donneurs (CD) et les molécules complexes portant plusieurs groupements fonctionnels, peuvent être à la fois de bons nucléophiles et de bons électrophiles [96]. Par conséquent, l'indice de nucléophilie ne peut pas être défini comme l'inverse de l'électrophilie. Très récemment, Domingo et al [90] ont prouvé que le caractère nucléophile d'une molécule peut être relié à l'aptitude de supprimer sa densité électronique. La plus simple approche de nucléophilie est de la considérer comme une valeur négative des potentiels d'ionisation de la phase gazeuse (intrinsèque), IP, à savoir, $N = -IP$.

Pour des valeurs élevées de nucléophilies correspondent des valeurs faibles de potentiels d'ionisation et inversement. Domingo et al. ont utilisé les énergies (HOMO) obtenus par la méthode de Kohn-Sham.

L'indice de nucléophilie (N) empirique (relatif) est défini comme suit [90] :

$$N_u = \varepsilon_{HOMO(Nu)} - \varepsilon_{HOMO(TCE)} \quad (17)$$

On note que l'échelle de la nucléophilie est référencée par rapport à la molécule tetracyanoethylene (TCE) prise comme une référence car elle présente la plus basse énergie HOMO dans une grande série de molécules déjà étudiées dans le cadre des cycloadditions polaires de Diels-Alder.

Sachant que cet indice a été validé avec succès par les données expérimentales cinétiques disponibles pour des amines, des di-imines, des anilines, des alcools, des éthers, des alcènes, et des Π -nucleophiles.

II.5.2. Indices locaux de réactivité dérivant de la DFT conceptuelle

Le principe HSAB appliqué dans un sens global nous permet de calculer le potentiel chimique électronique μ , l'électronégativité χ , la dureté globale η et la mollesse globale S d'une molécule. Toutes ces propriétés caractérisent le système moléculaire à l'état isolé. Cependant, les chimistes s'intéressent surtout aux interactions entre molécules, c'est à dire à la réactivité chimique.

Pour déterminer les sites réactifs d'une molécule lors de l'approche d'un agent électrophile, nucléophile ou radicalaire, les chimistes utilisent les charges nettes pour favoriser une interaction par rapport à une autre. Cependant, il est bien connu que les charges nettes calculées sur les différents sites d'une molécule ne sont pas un bon descripteur pour décrire les interactions entre molécules, particulièrement, pour les réactions contrôlées par les frontières c'est à dire les interactions *Soft-Soft*. En effet, la prédiction de la réactivité à l'aide des charges nettes peut conduire à des prédictions contradictoires avec l'expérience [96,80].

Comme alternative au calcul des charges, les études récentes [97,98] ont bien montré l'utilité d'appliquer le principe HSAB dans un sens local pour l'étude des interactions entre molécules donc pour la réactivité locale :

Dans ce qui suit, nous présentons succinctement le fondement théorique des principaux indices locaux utilisés actuellement pour la prédiction des sites réactifs d'une molécule, en l'occurrence : les indices de Fukui et les nucléophilies locales.

II.5.2.1 Fonction de Fukui

La fonction de Fukui f_k , correspondant au site k d'une molécule, est définie comme la première dérivée de la densité électronique $\rho(r)$ d'un système par rapport au nombre d'électrons N à un potentiel externe $v(r)$ constant [81] :

$$f_k = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right]_{v(r)} = \left[\frac{\delta \mu}{\delta v(r)} \right]_N \quad (18)$$

La forme condensée des fonctions de Fukui dans une molécule avec N électrons a été proposée par Yang et Mortier [99]:

$$f_k^+ = [q_k(N+1) - q_k(N)] \quad \text{pour une attaque nucléophile} \quad (19)$$

$$f_k^- = [q_k(N) - q_k(N-1)] \quad \text{pour une attaque électrophile} \quad (20)$$

$$f_k^0 = [q_k(N+1) - q_k(N-1)]/2 \quad \text{pour une attaque radicalaire} \quad (21)$$

$q_k(N)$: population électronique de l'atome k dans la molécule neutre.
 $q_k(N+1)$: population électronique de l'atome k dans la molécule anionique.
 $q_k(N-1)$: population électronique de l'atome k dans la molécule cationique.

Il a été montré [100], pour les réactions contrôlées par les frontières, qu'une grande valeur de l'indice de Fukui signifie une grande réactivité du site.

II.5.2.2. Mollesses locales

La mollesse locale s_k est définie par [81] :

$$s_k = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial \mu} \right]_{v(r)} = \left[\frac{\partial \rho(r)}{\partial N} \right] \left[\frac{\partial N}{\partial \mu} \right]_{v(r)} = S f_k \quad (22)$$

Les molleses locales condensées S_k^\pm peuvent être facilement calculées à partir des fonctions de Fukui condensées f_k^\pm et de la mollesse globale S :

$$s_k^- = S [q_k(N) - q_k(N-1)] = S f_k^- \quad (23)$$

$$s_k^+ = S [q_k(N+1) - q_k(N)] = S f_k^+ \quad (24)$$

II.5.2.3. Electrophilie locale

Le site le plus électrophile peut être facilement identifié par l'indice de l'électrophilie locale, ω_k [101]; défini comme le produit de l'indice d'électrophilie globale ω et l'indice de Fukui électrophilique f_k^+ .

$$\omega_k = \omega f_k^+ \quad (25)$$

$$\text{Avec } \sum \omega_k = \omega$$

II.5.2.4. Nucléophilie locale

Il a été montré récemment que le site le plus nucléophile peut être facilement identifié par l'indice de la nucléophilie locale, N_k [102]; défini comme le produit de l'indice de nucléophile globale N_u et l'indice de fukui nucléophilique f_k^- .

$$N_{uk} = N_u f_k^- \quad (27)$$

$$\text{Avec } N_u = \sum N_{uk} \quad (28)$$

III. Références

- [1] D. Liotta: "Advances in Molecular Modeling", Ed, Vol.1. JAI Press, **1988**.
- [2] Michel LAGUERRE: "Molecular modeling and drug design", Bull Cancer; 94(Suppl.FMC) : F115-28. **2007**.
- [3] J. Debord: "Introduction à la modélisation moléculaire", 37-41, **2004**.
- [4] E. Schrödinger: "Quantisierung als Eigenwert problem", *Annalen der Physik.*, **1926**, 79, 361-376.
- [5] M. Born, R. Oppenheimer: "Quantum theory of the molecules", *Annalen der Physik.*, **1927**, 84, 457-484.
- [6] W.J. Hehre, L. Radom, P.V.R. Schleyer, J.A. Pople: "Ab Initio Molecular Orbital Theory", John Wiley and Sons, New York. **1986**.
- [7] R.S. Mulliken: "Electronic population analysis on LCAO-MO molecular wave functions", *The Journal of Chemical Physics.*, **1955**, 23, 1833-1846.
- [8] A.R. Leach: "Molecular Modelling: Principles and Applications", Pearson: Prentice Hall, Harlow, **2001**.
- [9] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J.P. Stewart: "AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model", *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3902-3909.
- [10] a) J.P.P. Stewart: "Optimization of parameters for semi-empirical methods I. Method", *The Journal of Computational Chemistry.*, **1989**, 10, 209-220.
b) J.P.P. Stewart: "Optimization of parameters for semi-empirical methods II. Applications", *Journal of Computational Chemistry.*, **1989**, 10, 221-264.
- [11] D.C. Young: "Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems", Éditions Wiley Inter-Science, Chapitre 6 - *Molecular Mechanics*, 49-59, **2001**.
- [12] V. Fock: "Näherungsmethode zur losung des quanten-mechanischen mehrkörperprobleme", *Zeitschrift für Physik .*, **1930**, 61, 126-148.
- [13] C.J. Cramer: "Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models", John Wiley and Sons, New York, **2002**.

- [14] C. Møller, M.S. Plesset:” Note on an Approximation Treatment for Many-Electron Systems”, *Phys. Rev.*, **1934**, 46, 618–622.
- [15] I. Shavitt, H.F. Shaefer:” Methods of Electronic Structure Theory”, Ed., Plenum Press, New-York, 189, **1977**.
- [16] A. Jugl :” Chimie Quantique Structurale et Éléments de Spectroscopie Théorique“, **1978**.
- [17] J. Cizek:” On the Correlation Problem in Atomic and Molecular Systems. Calculation of Wavefunction Components in Ursell-Type Expansion Using Quantum-Field Theoretical Methods”, *Journal of Chemical Physics.*, **1966**, 45, 4256–4266.
- [18] W. Koch, M.C. Holthausen:” A Chemists's guide to Density Function Theory”.Wiley-VCH, Weinheim. **2001**.
- [19] P. Hohenberg, W. Kohn:” Inhomogeneous electron gas”, *Physical Review B.*, **1964**, 136, 864-871.
- [20] M. Springborg:” Density-Functional Methods in Chemistry and Materials Science”, Wiley-Interscience. **1997**.
- [21] W. Kohn, L.J. Sham:” Self consistent equations including exchange and correlation effects”, *Phys. Rev.*, **1965**, 140, 1133–1138.
- [22] A.D. Becke:” Density-functional exchangeenergy approximation with correct asymptotic behavior”, *Physical Reviews A.*, **1988**, 38, 3098–3100.
- [23] S.J. Vosko, L.Wilk, M. Nusair:” Accurate spin-dependent electron liquid correlation energies for local spin density calculations: a critical analysis”, *Canadian Journal of Physics.*, **1980**, 58, 1200–1211.
- [24] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr:” Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density”, *Phys Rev B Condens Matter.*, **1988**, 37, 785–789.
- [25] F. Jensen:” Introduction to Computational Chemistry”, John Wiley and Sons, Chichester. **1999**.
- [26] N. G. J. Richards:” In Molecular Orbital Calculations for Biological Systems”, ed. A.-M. Sapse, Oxford University Press, New York, **1998**, p. 11.

- [27] L. Šnajdrová, Thèse de doctorat, Université de Joseph Fourier, France, **2006**.
- [28] M. LEDECQ, Thèse de doctorat, Université de Notre-Dame de la Paix, France, **2004**.
- [29] G. Monard :“ Introduction à la Modélisation Moléculaire » Formation continue CNRS-Nancy, **2003**.
- [30] J.P. Browen, N.L. Allinger, K.B. Boyd;“ Reviews in computational chemistry”, VCH, New York ,2,81. **1991**.
- [31] J.R. Maple, P.V.R. Schleyer:“ Encyclopedia of Computational Chemistry”, Wiley, Chichester, 2, 1015, **1998**.
- [32] J. Goodman:“ Chemical Applications of Molecular Modelling”, Royal society of Chemistry, Cambridge, UK, **1998**.
- [33] U. Brkert, N. L. Allinger:“ Molecular Mechanics”, American Chemical Society Monograph 177, ACS, Washington, D. C, **1982**.
- [34] P. Comba, T.W. Hambley:“ Molecular Modelling of Inorganic Compounds”, VCH, New York, **1995**.
- [35] K.B. Lipkowitz:” Abuses of molecular mechanics: Pitfalls to avoid”, *J. Chem*, **1995**, 22, 1070–1075.
- [36] San Diego; Biosym/MSI, Discover User Guide,. October **1995**.
- [37] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, D.A. Case:” An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids”, *J. Comp. Chem.*, **1986**, 7, 230–252.
- [38] U. Dinur, A.T. Hagler:” New Approaches to Empirical Force Fields”, *Reviews in computational Chemistry*, vol 2, K.B. Lipkowitz and D.B. Boyd, Eds VCH, Weinheim ,Germany pp. 2-99, **1991**.
- [39] N.L. Allinger, J.A. Chen, S.R Katzenellenbogen, G.M. Anstead:“ Hyperconjugative effect on carbon-carbon bond lengths in molecular mechanics (MM4)“, *J. Comp. Chem.*,**1996**, 17, 747.
- [40] N.L. Allinger:” Calculation of Molecular Structure and Energy by Force-Field Methods”, *Adv. Phys. Org. Chem.*, **1976**, 13, 1-82.
- [41] N.L. Allinger:“ Conformational Analysis MM2, A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms “, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 8127.

- [42] U. Burkert, N.L. Allinger:“ Molecular Mechanics”, ACS Monograph 177”, American Chemical Society, Washington DC. **1982**.
- [43] N.L. Allinger, Y. H. Yuh, J-H. Li:” Molecular Mechanics, The MM3 Force Field for Hydrocarbons”, *J. Am .Chem. Soc.*, **1989**,111, 8551.
- [44] N.L. Allinger, K. Chen, J-H. Lii:” An improved force field (MM4) for saturated Hydrocarbons”, *J. Comp. Chem.*, **1996**, 17, 642.
- [45] W.L. Jorgensen, J.T. Rives:” The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin”, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 1657–1666.
- [46] W.F. Van Gunsteren, M. Karplus:” Protein dynamics in solution and in a crystalline environment: a molecular dynamics study”, *Biochemistry.*, **1982**, 21 (10), 2259–2274.
- [47] B.R. Brooks, R.E. bruccoleri, B.D. Olafson, D.J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. M. Charmm:” A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations”*, *Comp.Chem.*, **1983**, 4, 187–217.
- [48] I.K. Roterman, M.H. Lambert, K.D. Gibson, H.A. Scheraga:” Comparison of the CHARMM, AMBER and ECEPP Potentials for Peptides. I. Conformational Predictions for the Tandemly Repeated Peptide (Asn-Ala-Asn-Pro)”, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **1989**, 7, 391–419.
- [49] F.A. Momany, R. Ronte:” Validation of the general purpose QUANTA 3.2/CHARMm force field”, *J. Comp. Chem.*, **1992**, 13, 888–900.
- [50] J.C. Smith, M. Karplus:“ Empirical force field study of geometries and conformational transitions of some organic molecules” *J. Am Chem. Soc.*, **1992**, 114 (3), 801–812.
- [51] T. Shimanouchi:“ Force constants of small molecules“, *Pure. Appl. Chem.*, **1963**, 7, 131-146.
- [52] F. Tristram, V. Durier, G. Vergoton:“ The structures and vibrational frequencies of a series of aliphatic alcohols as obtained using the spectroscopic potential SPASIBA” , *Journal of Molecular Structure.*, **1996**, 378, 249-256.

- [53] A. Bouraoui, M. Fath allah, B. Blaive, R. Gallo:“ Design and molecular mechanics calculations of new iron chelates”, *J.Chem.Soc. Perkin Trans 2*. **1990**, 1211-1214.
- [54] A. Bouraoui, M. Fath allah, F. M’Henni, B. Blaive, R. Gallo:“ Modeling of Molecular Structures and Properties ”, *Proceeding of an International Meeting* Nancy, France, 11-15, *Studies in Physical and Theoretical chemistry*, 71,381-393. **1989**.
- [55] A. Zinelabidine, A. Bouraoui, M. Fath allah, F. M’Henni, B. Blaive, R. Gallo:” Molecular mechanics modelling of siderophores”, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **1993**, 286, 267-274.
- [56] B. Blaive, G. Legsaï, R. Lai:” Utilization of d^0 , d^1 , d^2 electron configurations to obtain parameters for transition metals in the molecular mechanics of dioxo- or diimido-tetrahedral complexes (Cr, Mo, Re, Os)”, *J. Mol. Struct.*, **1995**, 354, 245-250.
- [57] M. Baaden:“ Outils pour étudier la structure et la dynamique des peptides et des protéines“, (Institut de Biologie Physico-Chimique, PARIS) *CNRS UPR9080*, 36. **2003**.
- [58] H. Dugas:“ Principes de base en modélisation moléculaire, Aspects théorique et pratiques“, Chapitre 3 introduction aux méthodes de minimisation d’énergie ,quatrième édition, Librairie de L’Université de Montréal, **1996**.
- [59] J.A. McCammon, S.C. Harvey:“ Dynamics of Proteins and Nucleic Acids ”, Cambridge, **1987**.
- [60] A. Grosdidier:“ Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives“, Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. p 90, **2007**.
- [61] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen:” Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation”, *J Mol Biol.*, **1995**, 245, 43-53.
- [62] M. Rarey, S. Wefing, T. Lengauer:” Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins”, *J Comput Aided Mol Des.*, **1996**, 10(1), 41-54.
- [63] I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin:” A geometric approach to macromolecule-ligand interactions”, *J Mol Biol.*, **1982**, 161, 269-288.
- [64] D.S. Goodsell, A.J. Olson:” Structure, Function and Genetics”, *Proteins.*, **1990**, 8, 195-202.

- [65] S. Vilar, G. Cozza, S. Moro:” Medicinal chemistry and the molecular operating environment (MOE): application of QSAR and molecular docking to drug discovery”, *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1555–1572.
- [66] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, et al.” UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis”, *J Comput Chem*, **2004**; *25(13)*, 1605–1612.
- [67] Molegro Virtual Docker v. 5.1. Molegro ApS. Aarhus, Denmark, **2012**.
- [68] F. F. da Cunha. Elaine, F. B. Edilaine, A. Aline:” Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors”, *J. Biom. Struct Dyn.*, **2010**, *27*, 619–625.
- [69] Schrodinger, L.L.C., New York. The Glide 2.5 calculations used FirstDiscovery, version 2.5021, which was released in June 2003.
- [70] R. Thomsen, M. Christensen:” MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking”, *J Med Chem*, **2006**, *49(11)*, 3315–3321.
- [71] E. B. De Oliveira:“ Simulation moléculaire appliquée à l’acétylation de flavonoïdes catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la régiosélectivité de la bioconversion“, Thèse de doctorat d’université : Procédés biotechnologiques et alimentaires. Nancy : Institut National Polytechnique de Lorraine.France. p 187. **2009**.
- [72] D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson:“ Efficient unbound docking of rigid molecules“, **2002**.
- [73] H. Chermette:” Chemical reactivity indexes in density functional theory”, *J. Comp. Chem.*, **1999**, *20*, 129–154.
- [74] F. De Proft, P. Geerlings:” Conceptual and computational DFT in the study of aromaticity”, *Chem. Rev.*, **2001**, *101*, 1451–1464.
- [75] a) H. Eyring, M. Polanyi:” Uber Einfache Gasreaktionen” (On Simple Gas Reactions)”, *J. Phys. Chem.*, **1931**, *12*, 279–311.
b) Eyring H:” The Activated Complex in Chemical Reactions”, *J. Chem. Phys.*, **1935**, *3*, 107–115.

- [76] K. Fukui: "Theory of Orientation and Stereoselection", Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, **1975**.
- [77] K. Fukui, Y. Yonezawa, H. Shingu: "A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons", *J. Chem. Phys.*, **1952**, 20, 722–725.
- [78] R.G. Pearson: "Hard and soft acids and bases", *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 3533–3539.
- [79] R.G. Pearson: "Chemical Hardness", Wiley-VCH, Weinheim, **1997**.
- [80] P. Geerlings, F. De Proft, W. Langenaeker: "Conceptual density functional theory", *Chem. Rev.*, **2003**, 103(5), 1793–873
- [81] R.G. Parr, W. Wang: "Density Theory for atoms and Molecules", Oxford University Press: Oxford, **1989**.
- [82] M.J.S. Dewar: "A Critique of Frontier Orbital Theory", *J. Mol. Struct (Theochem)*, **1989**, 259, 301–323.
- [83] R.G. Pearson: "Hard and Soft Acids and Bases, HSAB, Part 1", *J. Chem. Educ.*, **1968**, 45, 581–587.
- [84] C. Morell, A. Grand, A. Toro-Labbe: "Theoretical support for using the Delta f(r) descriptor", *Chem. Phys. Lett.*, **2006**, 425, 342–346.
- [85] R.G. Pearson: "Recent advances in the concept of hard and soft acids and bases", *J. Chem. Educ.*, **1987**, 64(7), 561–562.
- [86] R.G. Pearson, W.E. Palke: "Support for a Principle of Maximum Hardness", *J. Phys. Chem.*, **1992**, 96, 3283–3285.
- [87] R.G. Parr, P.K. Chattaraj: "Principle of maximum hardness", *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 1854–1855.
- [88] P.K. Chattaraj, S.J. Sengupta: "Chemical Hardness as a Possible Diagnostic of the Chaotic Dynamics of Rydberg Atoms in an External Field", *Phys. Chem A.*, **1999**, 103, 6122–6126.
- [89] A. Ghomri, Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen, Algerie **2012**.
- [90] G.N. Lewis: "Valence and the structure of atoms and molecules", **1923**.
- [91] T.M. Lowry: "The uniqueness of Hydrogen", *Chem. Ind (London)*, **1923**, 42, 43.

- [92] R.G. Parr, L.V. Szentpaly, S. Liu: "Electrophilicity Index", *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121(9)*, 1922-1924.
- [93] P. Perez, L.R. Domingo, M.J. Aurell, R. Contreras: "Quantitative characterization of the global electrophilicity pattern of some reagents involved in 1,3-dipolar cycloaddition reactions", *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3117-3125
- [94] L.R. Domingo, M. Arno, R. Contreras, P. Perez: "Density functional theory study for the cycloaddition of 1,3-butadienes with dimethyl acetylenedicarboxylate. Polar stepwise vs concerted mechanisms", *J. Phys. Chem. A*, **2002**, *106(6)*, 952-961.
- [95] C.K. Ingold: "The principles of aromatic substitution, from the standpoint of the electronic theory of valency", *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **1929**, *48(8)*, 797-812.
- [96] W. Langenaeker, K. Demel, P. Geerlings: "Quantum-chemical study of the Fukui function as a reactivity index Part 3. Nucleophilic addition to α,β -unsaturated compounds", *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, **1992**, *259*, 317-330.
- [97] R.G. Pearson: "Maximum Chemical and Physical Hardness", *J. Chem. Educ.*, **1999**, *76*, 267.
- [98] K.R.S. Chandrakumar, Sourav Pal: "The Concept of Density Functional Theory Based Descriptors and its Relation with the Reactivity of Molecular Systems: A Semi-Quantitative Study", *Int. J. Mol. Sci.*, **2002**, *3*, 324-337.
- [99] W.T. Yang, W.J. Mortier: "The use of Global and Local Molecular-Parameters for the Analysis of the Gas-Phase Basicity of Amines", *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 5708.
- [100] P.K. Chattaraj, S. Nath, A.B. Sannigrahi: "Hardness, chemical potential and valency profiles of molecules under internal rotation", *J. Phys. Chem.*, **1994**, *98*, 9143.
- [101] a) P. Pérez, A. Toro-Labbe', A. Aizman, R. Contreras: "Comparison between Experimental and Theoretical Scales of Electrophilicity in Benzhydryl Cations", *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 4747-4752.
b) E. Chamorro, P.K. Chattaraj, P. Fuentealba: "Variation of the electrophilicity index along the reaction path", *J. Phys. Chem. A*, **2003**, *107*, 7068.
- [102] P. Pérez, L.R. Domingo, M. Duque-Noreña, E. Chamorro: "A condensed-to-atom nucleophilicity index. An application to the director effects on the electrophilic aromatic substitutions", *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **2009**, *895*, 86-91.

Chapitre II

Colorants et Métaux Lourds

I. Les colorants

Les colorants alimentaires synthétiques sont créés industriellement par l'homme ; soit ils sont des copies conformes de colorants naturels, soit ils n'existent pas dans la nature. Ils ont pris une place de plus en plus importante et ont fini par supplanter les colorants naturels (dont la plupart sont encore utilisés aujourd'hui). Ces derniers sont sensibles à la lumière, à l'oxygène ou à l'action des microorganismes. Ainsi, les colorants de synthèse, qui sont plus stables, ont une durée de vie plus longue et ont une coloration plus forte, ce qui permet de les utiliser à des quantités relativement faibles. Un autre avantage, c'est qu'ils sont moins coûteux et peuvent être fabriqués en grande quantité.

Bien que les colorants de synthèse embellissent nos assiettes et ravissent petits et grands en apportant de la couleur et de l'originalité dans leurs gourmandises, il semble important de se poser cette question : le plaisir des yeux prime-t-il sur la santé ? Chacun doit garder à l'esprit que ces substances sont continuellement étudiées, car leurs méfaits réels sont souvent mal connus. Il convient donc de surveiller la composition de son alimentation, car certaines études prouvent que la réglementation n'est pas toujours respectée de manière rigoureuse.

L'absorption des colorants de synthèse n'est pas toujours sans conséquences sur notre santé. En effet, certains d'entre eux sont mutagènes et génotoxiques [1,2] ou encore provoquent des cancers de la thyroïde, voire même des tumeurs des glandes surrénales et des reins chez les animaux [2].

Les colorants alimentaires de synthèse que l'on peut considérer comme toxiques pour l'homme et qui sont à éviter sont la tartrazine E102 et l'amarante E123 (interdit aux Etats-Unis et très réglementé en France). Ces additifs sont, entre autres, suspectés de jouer un rôle dans le syndrome d'hyperactivité et pourraient contenir des substances cancérigènes.

Contrairement aux colorants de synthèse, ceux d'origine végétale sont généralement bénéfiques pour la santé. En effet, beaucoup d'études ont prouvé leurs effets antioxydants [3], antimicrobiens [4] et anti-carcinogènes [5].

I.1. Colorants alimentaires naturels et industriels

Qu'est ce qu'un colorant ?

Un colorant est défini comme étant un produit capable de teindre une substance d'une manière durable. Il possède des groupements qui lui confèrent la couleur: appelés chromophores et des groupements qui permettent sa fixation: auxochromes.

« On appelle couleur propre d'un corps, la propriété qu'il possède d'absorber une partie des rayons colorés du spectre et de laisser traverser les autres, s'il est transparent, ou de les réfléchir, s'il est opaque [6] ».

Les matières colorantes se caractérisent par leur capacité à absorber les rayonnements lumineux dans le spectre visible (de 380 à 750 nm). La transformation de la lumière blanche en lumière colorée par réflexion sur un corps, ou par transmission ou diffusion, résulte de l'absorption sélective d'énergie par certains groupes d'atomes appelés chromophores. La molécule colorante est un chromogène. Plus le groupement chromophore donne facilement un électron, plus la couleur est intense. Le tableau 1 donne les groupements chromophores classés par intensité décroissante. D'autres groupes d'atomes du chromogène peuvent intensifier ou changer la couleur due au chromophore, ils sont appelés les groupements auxochromes. Les chromophores sont des systèmes à liaisons π conjuguées ou des complexes de métaux de transition. Les colorants diffèrent les uns des autres par des combinaisons d'orbitales moléculaires. La coloration correspond aux transitions possibles après absorption du rayonnement lumineux entre ces niveaux d'énergie propres à chaque molécule [7].

Tableau 1: Principaux groupements chromophores et auxochromes, classés par intensité croissante

Groupes chromophores	Groupes auxochromes Groupes donneurs d'électrons
Azo ($-N=N-$)	Amino ($-NH_2$)
Nitroso ($-N=O$)	Méthylamino ($-NHCH_3$)
Carbonyle ($>C=O$)	Diméthylamino ($-N(CH_3)_2$)
Vinyle ($-C=CH_2$) ou méthine ($>C=$)	Hydroxyle ($-OH$)
Nitro ($-NO_2$)	Alkoxy ($-OR$)
Thiocarbonyle ($>C=S$)	

Un colorant doit posséder, outre sa couleur propre, la propriété de teindre. Cette propriété résultant d'une affinité particulière entre le colorant et la fibre, est à l'origine des principales difficultés rencontrées lors des traitements. En effet, selon le type d'application et d'utilisation, les colorants synthétiques doivent répondre à un certain nombre de critères afin de prolonger la durée de vie des produits textiles sur lesquels ils sont appliqués: résistance à l'abrasion, stabilité photolytique des couleurs, résistance à l'oxydation chimique (notamment les détergents) et aux attaques microbiennes. L'affinité du colorant pour la fibre est particulièrement développée pour les colorants qui possèdent un caractère acide ou basique accentué. Ces caractéristiques propres aux colorants organiques accroissent leur persistance dans l'environnement et les rendent peu disposés à la biodégradation [8].

I.2. Classification des colorants

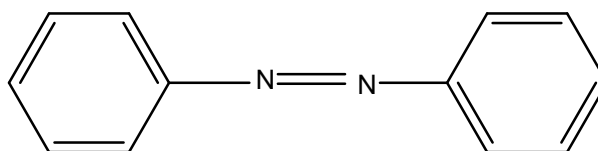
Les colorants synthétiques sont classés selon leur structure chimique et leur méthode d'application aux différents substrats (textiles, papier, cuir, matières plastiques, etc...).

I.2.1 Classification chimique

Le classement des colorants selon leur structure chimique repose sur la nature du groupement chromophore.

I.2.1.1. Les colorants azoïques

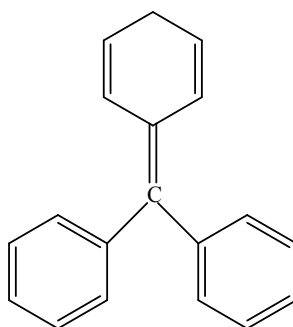
Les colorants azoïques sont caractérisés par la présence au sein de la molécule d'un groupement azoïque (-N=N-) reliant deux noyaux benzéniques. Cette catégorie de colorant est actuellement la plus répandue sur le plan de l'application, puisqu'ils représentent plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes [9,10]. Les colorants azoïques se répartissent en plusieurs catégories: les colorants basiques, acides, directs et réactifs solubles dans l'eau, et les azoïques dispersés et à mordant non-ioniques insolubles dans l'eau. Il est estimé que 10-15 % des quantités initiales sont perdues durant les procédures de teinture et sont évacués sans traitement préalable dans les effluents [10]. Or ces composés organiques cancérigènes sont réfractaires aux procédés de traitements habituellement mis en œuvre et sont très résistants à la biodégradation [8].



I.2.1.2. Les colorants triphénylméthanes

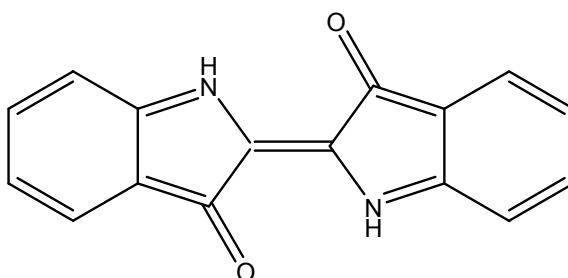
Les colorants triphénylméthanes dérivent du triphénylméthane, qui est un hydrocarbure possédant trois cycles phényle liés à un carbone central. On retrouve cette structure de base dans un grand nombre de composés organiques colorés. Les colorants triphénylméthanes et leurs dérivés hétérocycliques constituent la plus ancienne classe de colorants synthétiques. Actuellement bien moins importants que les colorants azoïques et anthraquinoniques, ils ont conservé une certaine valeur commerciale, car ils permettent de couvrir la totalité de la gamme de nuances. Les triphénylméthanes sont utilisés intensivement dans les industries papetières et textiles pour teindre le nylon, la laine, la

soie et le coton. Leur utilisation ne se limite pas à l'industrie. On les retrouve également dans le domaine médical comme marqueur biologique et comme agent antifongique chez les poissons et la volaille.



I.2.1.3. Les colorants indigoïdes

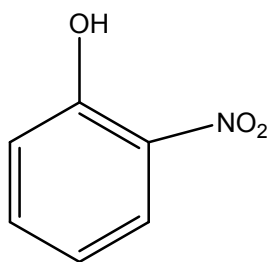
Les colorants indigoïdes tirent leur appellation de l'indigo dont ils dérivent. Ainsi, les homologues séléniés, soufrés et oxygénés du bleu indigo provoquent d'importants effets hypsochromes avec des coloris pouvant aller de l'orange au turquoise. Les colorants indigoïdes sont utilisés comme colorant en textile, comme additifs en produits pharmaceutiques, la confiserie, ainsi que dans des diagnostics médicaux [11-13].



I.2.1.4. Les colorants xanthènes

Les colorants xanthènes sont des composés qui constituent les dérivés de la fluorescéine halogénée. Ils sont dotés d'une intense fluorescence. Leur propriété de marqueurs lors d'accident maritime ou de traceurs d'écoulement pour des rivières

souterraines est malgré tout bien établie. Ils sont aussi utilisés comme colorant en alimentaire, cosmétique, textile et impression [14,15].



I.3. Utilisation des colorants

L'industrie des colorants constitue un marché économique considérable car de nombreux produits industriels peuvent être colorés, principalement :

- ✓ pigments (industrie des matières plastiques) ;
- ✓ encre, papier (imprimerie) ;
- ✓ colorants alimentaires (industrie agro-alimentaire) ;
- ✓ pigments des peintures, matériaux de construction, céramiques (industrie du bâtiment) ;
- ✓ colorants capillaires (industrie des cosmétiques) ;
- ✓ colorants et conservateurs (industrie pharmaceutique)
- ✓ carburants et huiles (industrie automobile etc.,...)
- ✓ colorants textiles à usage vestimentaire, de décoration, du bâtiment, du transport, colorants textiles à usage médical etc. [16].

II. Les métaux lourds

Les études récentes menées en biochimie révèlent le rôle indispensable des ions métalliques dans les fonctions vitales de notre organisme. En effet, le bon fonctionnement des phénomènes vitaux dépend directement des 3% de métaux contenus normalement dans le corps humain [17].

On sait depuis longtemps que le sodium, le potassium, le magnésium et le calcium sont nécessaires en macro-quantités au maintien des équilibres du métabolisme. Depuis quelques années, on sait qu'il existe également des ions métalliques essentiels bien que

n'intervenant qu'en micro-quantités. Il s'agit des ions des métaux lourds comme le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc, le cobalt, le molybdène, le chrome, l'étain, le vanadium et le nickel [18-20].

Les techniques analytiques actuelles permettent de détecter des quantités infimes de ces métaux, de l'ordre de la partie de billion dans le corps humain [21]. Il est donc aisément possible de mesurer la présence de traces d'ions métalliques dans les milieux naturels qu'ils s'agissent des sols, des eaux, de l'air et, ce qui est un peu plus difficile, de la flore et de la faune.

D'autre part plusieurs travaux de recherche ont montré qu'il peut exister des accumulations métalliques dans les organismes vivants. Certaines plantes, en fonction de la nature des sols, accumulent jusqu'à dix milles fois plus de chrome que d'autre. L'emploi en agriculture moderne de biocides à base d'ions cuivriques comme l'oxynate de cuivre se traduit par des teneurs croissantes et préoccupantes de ce métal dans certaines plantes. Les thons peuvent accumuler un million de fois plus de mercure et il en est de même avec le cadmium pour les mollusques. Il est admis que la régulation des teneurs en ions métalliques entrant dans la composition des espèces vivantes, est contrôlée génétiquement [22].

Les métaux lourds présents dans l'environnement peuvent altérer les fonctions immunitaires et en particulier celles des lymphocytes [23,24].

Certains d'entre eux peuvent avoir un effet uniquement catastrophique sur les processus normaux du métabolisme comme on peut le comprendre à la vue du comportement des métaux toxiques [25]. Donc la toxicité croit avec la concentration, ces ions doivent impérativement être extraits de l'organisme. La façon d'extraction la plus efficace est de piéger ces ions métalliques par des substances chimiques chélatantes. Par exemple, dans le cas de la maladie de Wilson, on utilise la D-pénicilamine ou triéthylène tétramine pour extraire l'excès d'ions cuivriques. On envisage également l'usage de peptides synthétiques [26,27].

Dans le coté industriel, l'activité humaine peut conduire à des pollutions qui vont déséquilibrer les répartitions de certains ions métalliques dans l'environnement donc dans

la flore et la faune. Parmi les polluants actuels, le plomb qui provient d'origines diverses : anti-détonateurs pour les moteurs à essence, peinture etc.... L'aluminium est toxique [28], il existe en grande quantité dans les sols ou il est stabilisé. Malheureusement la pollution a engendré des pluies acides qui ont eu pour résultat une diminution du pH des sols ce qui se traduit par la formation d'ions solubles de l'aluminium. L'augmentation du nombre des cas de maladie d'Alzheimer est due aux ions de l'aluminium et de mercure. Fort heureusement la nature a développé des moyens de lutte contre les accumulations d'ions métalliques. Des travaux récents ont montré que les plantes fabriquent, si le besoin s'en fait sentir, des peptides qui piègent et éliminent les ions métalliques toxiques. C'est le cas de la phyto-chélatin [26] .

Dans le même ordre d'idée, les mammifères, en réponse à une pollution par les ions métalliques, produisent une protéine très complexe ; la thionine qui est composée de 45 à 48 résidus dont 6 à 8 cystéines (3 à 4 ponts disulfures).

Les défenses naturelles existent donc et semblent efficaces. Malheureusement, les pollutions industrielles sont parfois trop rapides et trop importantes de telle manière que la défense naturelle devient insuffisante. Par exemple, dans le cas extrême d'une irradiation au plutonium on ne dispose que de deux heures pour éliminer le métal du sang. Passé ce délai, il se fixe définitivement dans les tissus.

L'homme moderne est amené à vivre avec la pollution métallique à des degrés divers. En effet, un grand nombre de dérivés métalliques ont une importance pharmacologique certaine. D'autres entrent dans la composition de nombreux alliages utilisés en artisanat dentaire, orthopédie et traumatologie.

La connaissance des interactions entre les ions métalliques et les molécules « biologiques » dans le métabolisme s'accroît rapidement. La collectivité scientifique commence à prendre de plus en plus conscience de leur importance. C'est le cas des acides aminés constitutifs des peptides, des protéines et des glycoprotéines. Un nombre considérable de peptides modèles a été synthétisé afin d'étudier leur comportement vis-à-vis des cations métalliques [26]. La nature des acides aminés et de leur enchaînement conduit à la formation de structures spécifiques de coordination. Ces modélisations

permettent d’appréhender le comportement extrêmement sélectif des peptides vis-à-vis des ions métalliques et donc de comprendre le transport des métaux dans leur environnement qu’il s’agisse des sols, de la flore ou de la faune [28].

Les interactions de certaines molécules avec les ions métalliques en solution ont une importance industrielle [30-32] ou biologique [33-35].

Le type de métal est aussi à prendre en considération. Des analyses *in vitro* de la toxicité des métaux sur la réponse immunitaire humorale classifient les métaux comme suit: Hg > Cu > Cd > Co > Cr > Mn > Zn > Sn démontrant hors de tout doute que le mercure est le métal le plus toxique pour le système immunitaire [36].

Tableau 2 : Exemples de métaux dans l’environnement et leur toxicité [37].

Métal	Organes cibles	Risques associés
Cuivre	rein, foie	IRA, cirrhose infantile
Mercure	rein, foie, SN, SC, poumon	IRA, hépatotoxicité
Plomb	rein, sang, SN, poumon	Saturnisme, néphropathie Anémie, encéphalopathie carcinogène
Cadmium	rein, os, foie, poumon	IRA, IRC, Ostéoporose ostéomalacie, carcinogène
Arsenic	rein, SC, poumon, peau, vessie	Maladie cardiovasculaire, diabète carcinogène
Nickel	rein, foie, poumon peau	Anémie, allergie, carcinogène
Uranium UN ou UA	rein, foie, SN, os, poumon	IRA

SN : système nerveux ; SC : système cardiaque ; IRA : Insuffisance rénale aiguë ; IRC : Insuffisance rénale chronique, UN : Uranium ; UA : Uranium appauvri.

Les points communs de ces différentes toxicités avec le cuivre et le mercure, sont le fait qu’ils sont présents dans l’environnement de façon naturelle ou consécutive à leur utilisation dans l’industrie, et que le rein peut être le siège de la toxicité qu’ils engendrent. De plus, hormis les pathologies qu’ils induisent (Tableau 2), ils sont capables d’activer

différents processus cellulaires tels que l'apoptose, le stress oxydant, l'activation de mécanismes de détoxification cellulaire comme la synthèse de métallothionéine.

La connaissance des données relatives sur la toxicité générée par ces différents agents toxiques, connus pour présenter une toxicité chimique de part leur aspect de métal lourd, devrait permettre de mieux situer et comprendre celle qui est induite par le mercure et le cuivre.

II.1. Le Cuivre et le Mercure

II.1.1. Le Mercure

II.1.1.1. Les différentes formes de mercure

Le mercure est un métal ubiquitaire lourd selon la classification de Mendeleïev. Présent naturellement dans l'environnement c'est le seul métal liquide à température ambiante, il se combine très facilement avec d'autres molécules que ce soit des métaux (amalgames), les molécules inorganiques (sels de mercure) ou organiques (carbone).

Sur le plan physico-chimique, le mercure est un métal qui change facilement de forme et de propriétés, sous l'effet de divers facteurs environnants : acidité, température, présence de certaines molécules, très volatil, il passe facilement de l'état liquide à l'état gazeux à température ambiante. En présence d'oxygène, le mercure s'oxyde très vite passant de l'état métallique Hg à l'état ionisé Hg^{2+} [38].

Dans ce cas Le mercure possède 3 degrés d'oxydation : Hg(0) à l'état élémentaire (Hg° ou mercure métallique), Hg(I) ion mercurieux, et Hg(II), ion mercurique ; les principales formes sont : Hg(I) Hg_2SO_4 , Hg(II) HgO [39,40]..

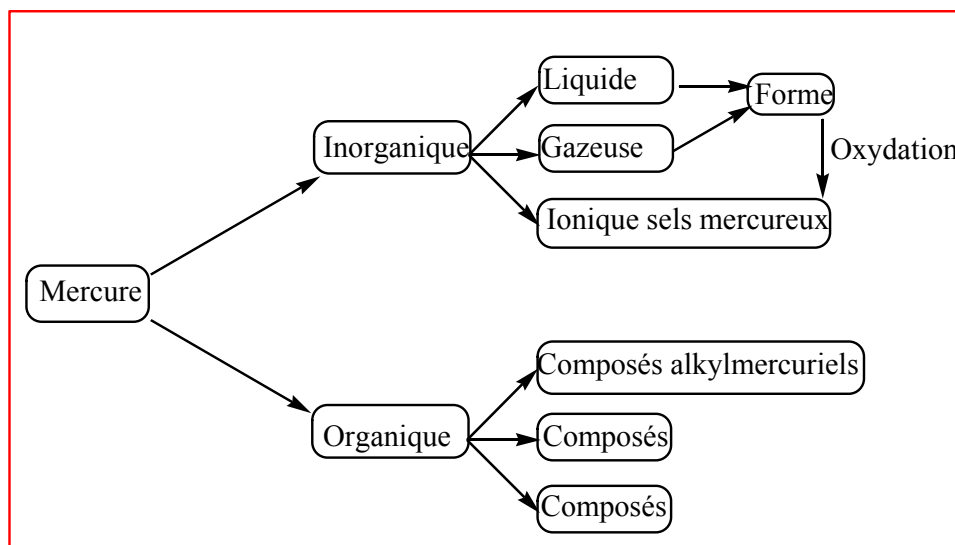


Figure 1 : les différentes formes de mercure

a. Forme organique : (cas de Méthylmercure (MeHgCl))

Lorsque le mercure est rejeté dans les cours d'eau, les lacs et d'autres environnements aquatiques, des bactéries peuvent le transformer en sa forme organique très toxique: le méthylmercure. Sous cette forme, il peut-être absorbé par la faune aquatique (poissons, mammifères marins), qui en augmente la concentration (bio-accumulation) mesurée dans la chaîne alimentaire jusqu'aux poissons et ensuite aux êtres humains [41,42]. Les niveaux environnementaux de méthylmercure dépendent donc de l'équilibre entre la méthylation et la déméthylation par les bactéries [41].

Tous les composés de mercure sont capables de franchir la barrière placentaire mais la forme organique traverse plus librement que la forme inorganique. La haute solubilité lipidique du mercure organique fait en sorte qu'il se diffuse plus aisément à travers les membranes [43]. On associe les effets toxiques du méthylmercure en premier sur son organe cible le cerveau mais ses effets toxiques ont aussi des répercussions sur d'autres organes tels les reins, les poumons, le cœur, les intestins et les yeux chez les adultes [42].

b. Forme inorganique : (cas de Chlorure de mercure (HgCl_2))

Cette forme de mercure est aussi largement répandue dans l'environnement

découlant principalement d'usages industriels ou faisant partie d'amalgame dentaire [44].

Elle est la deuxième forme la plus toxique de mercure (Figure 1). Les composés inorganiques de mercure ne franchissent pas aisément la barrière hémato-encéphalique et la barrière placentaire, mais s'accumulent dans les reins provoquant quelquefois des insuffisances rénales. Le mercure inorganique induit aussi des lésions gastro-intestinales. Hautement irritant, il peut provoquer des cloques et des ulcères sur les lèvres et la langue. Les éruptions cutanées, la transpiration excessive, la fibrillation musculaire, la faiblesse et l'hypertension artérielle sont autant de symptômes de l'exposition à des niveaux élevés de composés inorganique du mercure [45].

Des expériences utilisant une lignée cellulaire de cellules transfectées (NIH 3T3), ont démontré que les ions Hg^{2+} ont formé des complexes très stables non seulement avec les groupements sulfhydriles (SH) des protéines mais aussi avec des molécules de faibles poids moléculaires comme le glutathion (GSH) et les métallothionéines (MTs). Ce qui fait qu'une exposition au Hg^{2+} , mais à de faibles concentrations (0.1-5 μM), augmente la concentration cellulaire de GSH et induit la synthèse de MTs. Cependant, des doses plus élevées de $HgCH_2$ (10-1000 μM) diminuent la quantité de GSH (qui est un important éliminateur des radicaux libres) provoquant l'oxydation du milieu. La synthèse des MTs a été induite mais cette induction a pris un certain temps et les MTs ne se sont pas liées assez rapidement pour freiner les effets nocifs et toxiques du $HgCl_2$ *in vitro* [46].

On a aussi remarqué que des formes chimiques différentes de mercure peuvent aussi avoir différents effets sur le système immunitaire. Le sulfure de méthylmercure semble avoir des effets très différents sur le système immunitaire que la forme chlorée. En effet, le sulfure de méthylmercure affecte seulement le poids du thymus et n'a pas d'effet sur l'activité des cellules NK (Natural killer cells) [43]. Par contre le méthylmercure chloré augmente la prolifération lymphocytaire tandis que la forme sulfureuse la diminue [42].

Lorsque nous voulons étudier les effets du mercure sur le système immunitaire, nous devons vraiment prendre en considération, la forme de mercure, le genre d'exposition, la durée de l'exposition, l'espèce étudiée et le sexe.

Le mercure sous ses deux formes (organique et inorganique) déclenche des réactions en cascade qui finissent par l'apoptose des cellules. Des recherches précédentes sur la voie apoptotique des cellules lymphoïdes humaines ont démontré que les deux formes de mercure (organique et inorganique) sont des inducteurs d'apoptose mais par des mécanismes très différents. Le processus d'apoptose est régulé par des changements progressifs au niveau cellulaire. Un de ces changements majeurs est la perte d'intégrité de la membrane cellulaire entraînant une perte du potentiel trans-membranaire mitochondrial, la génération des espèces réactives de l'oxygène (EROs) et un relâchement du cytochrome du cytosol [47].

II.1.1.2 Sources et utilisation du mercure

Le mercure existe naturellement dans la croûte terrestre et se diffuse dans l'atmosphère et l'eau, mais les activités humaines en ajoutent une quantité non négligeable, on distinguera donc les sources naturelles des sources anthropiques *.

(* : Anthropique : transformation d'une ressource naturelle sous l'action de l'homme).

a. Les sources naturelles

La plupart des roches et des sols contiennent du mercure en quantité variable, l'érosion et l'altération des roches et des sols (sous l'effet de la lumière, de la température et des précipitations) favorisent la libération du mercure (600 tonnes/an).

Les océans contiendraient 300 milliards de tonnes de mercure et seraient responsables de l'émission annuelle de 800 à 1000 tonnes dans l'atmosphère, les plantes rejettent de leur composition le mercure qu'elles ont absorbé, les éruptions volcaniques contribueraient à 40% des rejets naturels (1000 tonnes/an). Tous ces phénomènes sont toutefois très mal quantifiés, les évaluations variant entre 2700 et 150 000 tonnes/an.

b. Les sources anthropiques

Les champs d'utilisation du mercure étant nombreux, on peut retrouver du mercure dans de nombreux domaines :

- ✓ Exploitations minières : elles conduisent au dégazage des roches mises à découvert ; il s'agit en premier lieu des exploitations minières d'or, d'argent,

- ✓ de plomb, de cuivre, de zinc qui contiennent également des teneurs non négligeables.
- ✓ Industrie : le mercure est utilisé dans l'industrie électrique (néon, lampes au mercure, tubes fluorescents, batteries), participe à la production de chlore et de soude caustique, et entre dans la fabrication d'instruments de mesure (thermomètres, baromètre, nanomètres, ...), peintures, vernis et même produits cosmétiques.
- ✓ Santé : anciennement utilisé pour guérir la syphilis, on le retrouve aujourd'hui dans la composition de certains vaccins, de certains médicaments comme le mercurochrome, mais également en ophtalmologie ou en odontologie conservatrice dans les amalgames dentaires.

Le mercure est encore utilisé dans de nombreux domaines même si depuis quelques années des produits de substitution sont recherchés.

Plus généralement ; il existe deux types de sources anthropiques : les sources ponctuelles liées à la fabrication industrielle (la combustion du charbon, pétrole, gaz ou bois entraîne la libération sous diffuses (rupture des thermomètres au mercure, rejet des hôpitaux des cabinets dentaires, des centres de crémation ...).

On estime à environ 20 000 tonnes /an la part de mercure émise par les sources anthropiques, dont 3% seraient d'origine dentaire [48].

II.1.1.3 Toxicité du mercure

Le mercure est responsable de plusieurs catastrophes écologiques. Il est à l'origine de la "maladie de Minamata" (entre 1950 et 1970 à Niigata, au Pakistan et au Guatemala) due à l'ingestion de poissons pollués par le méthylmercure. Il est également l'élément toxique qui fit 6530 victimes dont 460 morts en 1971-1972 en Irak. Les villageois s'étaient en effet nourris de blé destiné à l'ensemencement et qui avait été traité aux organo-mercuriels.

Le mercure inorganique Hg^{2+} de l'eau ou des aliments est peu absorbé le long du tube digestif et n'entraîne pas de risque toxique aux doses habituellement ingérées. En

revanche, le méthylmercure (MeHg^+) et le diméthylmercure (Me_2Hg) ont un pouvoir toxique : absorbés presque totalement dans l'intestin et largement véhiculés dans l'organisme, ils atteignent le foie, le rein et surtout le cerveau qui constitue le principal organe cible (Tableau 3). Les signes précoces et réversibles de neurotoxicité apparaissent à la suite de l'ingestion à long terme de 200 à 400 $\mu\text{g jour}^{-1}$ de méthylmercure chez l'adulte [49] (dose équivalente : 2,8-5,7 $\mu\text{g jour}^{-1} \text{ l}^{-1}$). Le fœtus est 10 fois plus sensible au mercure que l'adulte [50,51]. Par conséquent, certains toxicologues proposent d'abaisser la dose ingérée tolérable à 0,1 $\mu\text{g jour}^{-1} \text{ l}^{-1}$. Le taux de mercure dans le sang est généralement compris entre 5 et 10 $\mu\text{g l}^{-1}$. La valeur maximale admissible est de 100 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Tableau 3 : Résumé comparatif des effets de mercure lourds sur l'organisme [52]

Mercure	Inorganique	Organique
Voie d'absorption	Voie orale	Voie orale
Taux d'absorption	10%	95%
Organe cibles	Reins, Fœtus	S.N.C*, Reins, Fœtus

* : Système Nerveux Central

De plus, les vapeurs de mercure larguées par les amalgames (plombages dentaires) peuvent être une source majeure de présence de mercure inorganique chez l'humain [53]. Les reins possèdent les plus fortes concentrations en mercure après une exposition au mercure inorganique ainsi qu'aux vapeurs de mercure tandis que le cerveau, en particulier, le cortex postérieur a une plus grande affinité pour le mercure organique [24].

En générale les symptômes classiques de contamination par Hg sont de caractère carcinogène et/ou d'endommagement des fonctions rénales, visuelles, métaboliques, reproductives, immunologiques et neurologiques [54-60], mais dépendent avant tout des formes chimiques (inorganique ou organique), des doses et des durées d'exposition.

II.1.2. Le Cuivre

II.1.2.1. Les différentes formes de cuivre

Le cuivre est un élément chimique de symbole Cu de numéro atomique 29. Sa masse molaire est de $63.546 \text{ g.mol}^{-1}$, il fond vers 1080°C et il bout vers 2565°C et sa densité est de 8.9 à 20°C .

Métal de couleur rougeâtre, il possède une haute conductivité thermique et électrique à température ambiante, le cuivre est un des rares métaux qui existe à l'état natif, l'occurrence du cuivre natif est cependant assez faible [61].

Le cuivre peut se présenter sous forme de métal, sous deux états d'oxydation : le cuivre(I) et le cuivre(II). Il existe également une forme instable du cuivre(III). En solution aqueuse, le cuivre se trouve surtout sous la forme de l'ion cuivre(II), selon le pH, la température, la présence de bicarbonate et de sulfure et la possibilité de former des ligands avec des espèces organiques comme les acides humiques, fulviques et aminés, certains polypeptides et des détergents [62].

L'ion cuivre(I) à l'état libre peut exister en solution aqueuse seulement en concentrations extrêmement faibles et les seuls autres composés du cuivre(I) qui sont stables dans l'eau sont ceux qui sont très insolubles comme le chlorure ou le cyanure [63]. Certains sels de cuivre(II), notamment le chlorure, le nitrate et le sulfate, sont solubles à un pH faible, dans des conditions oxydantes. Le carbonate, l'hydroxyde, l'oxyde et le sulfure sont moins solubles, en particulier à un pH égal ou supérieur à 7. Dans les eaux alcalines à forte teneur en gaz carbonique, le cuivre peut précipiter sous forme de carbonate de cuivre [64].

II.1.2.2. Sources et utilisation de cuivre

Le cuivre est moyennement abondant dans la croûte terrestre pour être un métal lourd [65] ; il est présent dans la nature sous forme sulfurés comme la covellite (CuS), le chalcocite (Cu_2S), la chalcopirite (CuFeS_2) et la bornite (Cu_3FeS_3) ou oxydé sous forme malchite [$\text{CuCO}_3 \cdot (\text{OH})_2$], le chrysocolle [$\text{CuSiO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$] et la chalcantile [$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$]. C'est un métal qui est beaucoup utilisé pour la fabrication des ustensiles de cuisine, des

chaudières des échangeurs de chaleurs. On utilise également dans la fabrication de toitures, les canalisations des eaux et de gaz en raison de sa résistance à la corrosion, il est aussi utilisé dans la fabrication des câbles électriques.

Ces dernières années, la production de cuivre a augmenté d'une manière vertigineuse grâce à ces caractéristiques mécaniques, chimiques et électriques. De ce fait, des quantités de cuivre ont augmenté dans l'environnement en polluant les eaux, le sol et l'air. Les composés solubles du cuivre forment la plus grande menace pour la santé humaine.

II.1.2.3. Toxicité de cuivre

a. Impact du cuivre sur la santé humaine

Le cuivre, à très faible dose est un oligo-élément indispensable à la vie [66,67]. Il est notamment nécessaire à la formation de l'hémoglobine et remplace même le fer pour le transport de l'oxygène chez une espèce d'arthropode, le limule, dont le sang est bleu [67].

Chez l'homme et les mammifères, régulés par le foie, le cuivre intervient dans la fonction immunitaire et contre le stress oxydant, son manque cause le syndrome de Menke [68]. Des études menées par des scientifiques montrent que des enfants exposés à long terme à des fortes concentrations du cuivre deviennent moins intelligents. Elles provoquent aussi la maladie de Wilson [69,70] Cette maladie se manifeste quand l'organisme humain reçoit des quantités importantes de cuivre et que le foie devient incapable de stocker son excès qui s'accumule en suite dans le cerveau et dans la cornée de l'œil.

b. Impact du cuivre sur l'environnement

Le cuivre présent dans les milieux aquatiques provient en grande partie des sulfates de cuivre utilisée en agriculture, des rejets des eaux usées. Des études scientifiques menées récemment ont montré que la faune et la flore des milieux aquatiques sont menacées en présence de cuivre [71] pour une concentration supérieure à 25 µg/l.

Le cuivre contamine les eaux environnantes à des doses et concentrations infimes ($10\mu\text{g.l}^{-1}$) [72] pour de nombreux organismes : algues, mousses, micro-organisme marins, champignons, microscopiques [66,67].

III. Références

- [1] H. Ben Mansour, D. Corroler, D. Barillier et al:“ Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effect of the azo dyes: acids yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2”, *Food Chem Toxicol.*, **2007**, 45,1670–7.
- [2] F. Rafii, J.D. Hall, C.E. Cerniglia:“ Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract”, *Food Chem Toxicol.*, **1997**, 35, 897–901.
- [3] D. Liu, J. Shi, A.C. Ibarra, et al:“ The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C and betacarotene mixtures on the DPPH free radical”, *LWT.*, **2008**, 4, 1344–9.
- [4] R. Singh, A. Jain, S. Panwar, et al:“ Antimicrobial activity of some natural dyes”, *Dyes and Pigments.*, **2005**, 66, 99–102.
- [5] C.B. Lynn, E. Rice, T. Fischer, et al:“ Lycopene has limited effect on cell proliferation in only two of seven human cell lines (both cancerous and non-cancerous) in an in vitro system with doses cross the physiological range”, *Toxicol In Vitro.*, **2008**, 22, 1297–3000.
- [6] A. Seyewetz, P. Sisley:“ Chimie des matières colorantes artificielle“, Paris Masson & Editeurs Libraires de l’Académie de Médecine, France, **1896**.
- [7] Brevet APG-RCC : PCT / FR 99 / 00748 du 31 mars **1999**.
- [8] Centre d’expertise en analyse environnementale du Québec, MA. 315-DCO 1.0, Ministère de l’environnement du Québec, **2003**.
- [9] D. Robert, S. Parra, C. Pulgarin, A. Krzton, J.V. Weber:“ Chemisorption of phenols and acids on TiO₂ surface”, *Appl. Surf. Sci.*, **2000**, 167(1), 51–58.
- [10] C. Guillard, H. Lachheb, A. Houas, M. Ksibi, E. Elaloui, J.M. Herrmann:” Influence of Chemical Structure of Dyes, of pH and of Inorganic Salts on Their Photocatalytic Degradation by TiO₂ Comparison of the Efficiency of Powder and Supported TiO₂”, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2003**, 158, 27–36.
- [11] L. Amalric, C. Guillard, E. Blanc-Brude, P. Pichat:” Correlation between the photocatalytic degradability over TiO₂ in water of meta and para substituted

methoxybenzenes and their electron density, hydrophobicity and polarizability properties”, *Water Res.* **1996**, 30, 1137–1142.

[12] J.P. Chen, S.O. Pehkonen, C.C. Lau:” Phorate and terbufos adsorption onto four tropical soils”, *Coll. Surf. A.*, **2004**, 240, 55–61.

[13] J.P. Chen, L. Wang:” Characterization of metal adsorption kinetic properties in batch and fixed-bed reactors”, *Chemo sphere.*, **2004**, 54(3), 397–404.

[14] W.J. Weber, B.M. Vanvliet:“ Activated carbon adsorption of organic from the aqueous phase”, Ed. I.H. Suffet, M.J. Mc Guire1.B. **1981**.

[15] U.K. Tragneg, M.T. Suiclan:” Evaluation of surface and film diffusion · coefficients for carbon adsorption“, *Water Res.*, **1989**, 23, 267–273.

[16] J. Belegald:” Les colorants industriels, Encyclopédie médico-chirurgicale pathologie du travail, intoxications maladies par agents physiques 16082 à paris”, Editions techniques ; **5**, **1987**.

[17] R.W. Hay:” Bio-inorganic chemistry”, John Wiley and Sons, New York, **1984**.

[18] B. Sarkar:” Biological aspect of metals and metal-related Diseases”, *Raven Press*, ed., New York, Chapter3, **1983**.

[19] A.S. Prasard, A. Abbasi, J. Ortega:” Zinc metabolism: Current aspect in health and Disease”, *Liss Press*, ed., New York, 211–236, **1977**.

[20] H. Sigel, M. Dekker:” Biological Action of Metal Ions”, ed, New York, **6**, **1976**.

[21] H.W. Nurnberg:” Polarography and voltammetry in studies of toxic metals in man and his environment”, *Sci. Of the Total Environm.*, **1979**, 12(1), 35–60.

[22] G. Sposito:“ Metal Ions in Biological Systems”,ed. Marcel Dekker, New York, **20**, **1**, **1984**.

[23] H.e. Schuppe, A.e. Ronnau, S. Von Schmiedeberg, T. Ruzicka, E. Gleichmann, P. Griem:” Immunomodulation by Heavy Metal Compounds”. *Clinics in Dermatology.*, **1998**, 16, 149–157.

[24] R.A. Goyer:“ Toxic effects of metals. In *Casarett and Doull's Toxicology* “, (Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, 1. and Casarett, L.J., eds.), New York, pp. 691–736. **2001**.

[25] T.G. Alberts, J.P.V. Houtman, B. Makkink, *Trace Elements in Medecine.*, **1988**, 5, 144.

- [26] G. Arena et, R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, R.M. Izatt, J.D. Lamb, E. Rizzarelli:” Coordination properties of cyclopeptides. Formation, stability, and structure of proton and copper(II) complexes of cyclo-(L-histidyl-L-histidyl) in aqueous solution”, *Inorg. Chem.*, **1987**, 26(6), 795–800.
- [27] J.R.J. Sorenson, P. Ellis:” Progress in Medicinal Chemistry”, G.P. Ellis, and G.B. West, Ed., Elsevier, New York, 26, 437, **1989**.
- [28] A.A. Abdellah, thèse de doctorat, Université Chouaib Doukkali, Setta, Maroc, **2001**.
- [29]
- [30] F. Mathy, A. Sevin:” Introduction à la chimie moléculaire des éléments de transition”, Marketing ed, Copyright ISBN 2, 7,7298–9127, **1991**.
- [31] J.M. Williams, A.M. Kini, H.H. Wang, K.D. Carlson, U.G. Lawrence, K. Montgomery, G.J. Pyrka, D.M. Watkins, J.M. Kommers:” From semiconductor-semiconductor transition (42 K) to the highest-Tc organic superconductor”, *Inorg. Chem.*, **1990**, 29(18), 3272–3274.
- [32] J.S. Miller, A.J. Epstein, W.M. Reiff:” Molecular ferromagnetsJoel” *Acc. Chem. Res.*, **1988**, 21(3), 114–120.
- [33] M.N. Huguers:” Comprehensive Coordination Chemistry ”, *Pergamon, Oxford*,6, 545-754, H.E. Howard-Lock, C.J.L. Lock, ibidem,755–778, **1987**.
- [34] V.K. Rastogi et coll:” Spactrosopy of Biological Molecules”, eds. R. E. Hester and R. B. Girling, London: Royal Society of Chemistry, **1991**.
- [35] F.A. Palida, M.J. Ettinger:” Identification of proteins involved in intracellular copper metabolism. Low levels of a approximately 48-kDa copper-binding protein in the brindled mouse model of Menkes disease”, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4586–92.
- [36] D.A. Lawrence;“ Immunotoxicity of heavy metals”, *Immunotoxicology and immunopharmacology*, **1985**, 341–353.
- [37] M. Taulan, thèse de doctorat, Université de Montpellier I, U.F.R.DE Medecine, France, **2004**.
- [38] G. Sposito:” Metal Ions in Biological Systems”,ed. Marcel Dekker, New York, 20, 1, **1984**.

- [39] M. Horvat:” Current status and future needs for biological and environmental reference materials certified for methylmercury compounds”. *Chemosphere.*, **1999**, 39, 1167–1179.
- [40] E.D. Stein, Y. Cohen, A.M. Winer:“ Environmental distribution and transformation of mercury compounds”. *Cri. Rev. Environ. Sci. Technol.*, **1996**, 26, 1–43.
- [41] S.R. Jannalagadda, P.V.V. Prasada Rao:“ Toxicity, bioavailability and metal speciation”, *Comp. Biochem. Physiol.*, **1993**, 106, 585–595.
- [42] S.A. Thompson, KL. Roellich, A. Grossmann, S.G. Gilbert, T.J. Kavanagh:“ Alterations in immune parameters associated with low level methylmercury exposure in mice”. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, **1998**, 20, 299–314.
- [43] L.G. Wild, H.G. Ortega, M. Lopez, J.E. Salvaggio:“ Immune system alteration in the rat after indirect exposure to methyl mercury chloride or methyl mercury sulfide”. *Environ Res.*, **1997**, 74, 34–42.
- [44] B.J. Shenker, C. Rooney, L. Vitale, L.M. Shapiro:“ Immunotoxic effects of mercuric compounds on human lymphocytes and monocytes. 1. Suppression of Tcell activation”, *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, **1992**, 14, 539–553.
- [45] Santé Canada:” Le mercure et la santé humaine”, Votre santé et vous. P.I-5. **2004**.
- [46] F. Schurz, M. V. Sabater, G. Fink:“ Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence : the role of metal-binding proteins”, *Mutagenesis.*, **2000**, 15, 525–530.
- [47] B.J. Shenker, T.L. Guo, I.M. Shapiro:“ Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells: Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent”, *Environmental Research.*, **2000**, 84, 89–99.
- [48] M. Megly, thèse de doctorat, Université de NANTES, France, **2007**.
- [49] OMS (WHO: World Health Organization):” Environmental health criteria 1: Mercury”, Genève. **1976**.
- [50] G.E. Mc Keown-Eyssen, J. Ruedy, A. Neims:” Methylmercury poisoning in northern Québec. II Neurologic findings in children”, *Am. J. Epidemiol.*, **1983**, 118, 470–479.

- [51] T. Kjellström, P. Kennedy, S. Wallis, C. Mantell. National Swedish Environment Research Board: "Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish". Stage 1. Preliminary tests at age 4 ", Solna. **1986**.
- [52] A. Pichard. INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) "Mercures et dérivés du mercure ", 1–43. **2000**.
- [53] I.T. Zelikoff, P.T. Thomas : "Immunotoxicology of environmental and occupational metals", London, Angleterre, **1998**.
- [54] D. Mergler, H.A. Anderson, L.H.M. Chan, K.R. Mahaffey, M. Murray, M. Sakamoto, A.H. Stern: "Methylmercury Exposure and Health Effects In Humans: A Worldwide Concern", *Ambio.*, **2007**, *36*, 3–11.
- [55] L. Barregard, Y. Thomassen, A. Schutz, S.L. Marklund: "Levels of selenium and antioxidative enzymes following occupational exposure to inorganic mercury", *Sci. Total Environ.*, **1990**, *99*, 37–47.
- [56] L. Barregard, S. Enestram, O. Ljunghusen, J. Wieslander, P. Hultman: "A study of autoantibodies and circulating immune complexes in mercury-exposed chloralkali workers", *Inter. Arch. Occup. Environ. Health.*, **1997**, *70*, 101–106.
- [57] P. Boffetta, E. Merler, H. Vainio: "Carcinogenicity of mercury and mercury compounds", *Scand J Work Environ Health.*, **1993**, *19*, 1–7.
- [58] G. Sallsten., L. Barregard: "Urinary excretion of mercury, copper and zinc in subjects exposed to mercury vapour", *Biometals.*, **1997**, *10*, 357–361.
- [59] N.A. Elghany, W. Stopford, W.B. Bunn, L.E. Fleming: "Occupational exposure to inorganic mercury vapour and reproductive outcomes", *Occupational Medicine-Oxford.*, **1997**, *47*, 333–336.
- [60] T. Mathiessen, D.G. Ellingsen, H. Kjuus: "Neuropsychological effects associated with exposure to mercury vapor among former chloralkali workers", *Scan. J. Work Environ. Health.*, **1999**, *25*, 342–350.
- [61] C.S. Hurlbut Jr, C. Klein: "Manual de mineralogia de Dana", Editorial. Reverte Balcelona 564 pp. **1982**.

- [62] M.J. Stiff:“ The chemical states of copper in polluted fresh water and a scheme of analysis for differentiating them”, *Water Res.*, **1971**, *5*, 585.
- [63] F.A. Cotton, G. Wilkinson:“ Advanced inorganic chemistry”, 3^eédition. Wiley Interscience, Toronto, **1972**.
- [64] National Academy of Sciences. Drinking water and health. Vol. 1. Washington, DC **1977**.
- [65] H.K. Wedepohl:“ The composition of the continental crust”, *Geochemical et cosmochimica Acta.*, **1995**, *59(7)*, 1217–1232.
- [66] J.E. Fergusson:“ The heavy elements: chemistry, Environmental impact and health effects”, Pergamon Press, Oxford, 614, **1990**.
- [67] B.J. Alloway, D.C. Ayres:“ Chemical principales of Environmental pollution Blackie” , Academic and profesional an imprint of chapman and Hall, London, 394, **1997**.
- [68] G.S. Plumlee, T.L. Ziegler:“ The medical geochemistry of dust, soils and other earth materials”, In:B.S Lollar (Ed), Environmental Geochimistry. Treatise on Geochemistry Elsevier-Pergamon, Oxford, pp. 264–310. **2003**.
- [69] H. Karl Summera, J. lichtmaneggera. N. Bandowb, Don W-choib, A. Alan Dispiritob, B. Michalke:“ The biogenic methanobactin is an effective chelator for copper in a rat model for Wilson disease”, *Journal of trace Element in Medicine and Biology.*, **2011**, *25*, 36–41.
- [70] M. Lim. Chris, A.Michael, F.B. Cater Julian, M. Sharon la fontane:“ Copper-dependent interaction of glutare doxin with the N termini of the copper-ATPases (ATP7A and ATP7B) defective in Menkes and Wilson diseases”, *Biochemical and Biophysical Research Communication.*, **2006**, *348(22)*, 428–436.
- [71] Nga. Cheung wong. H. Wong, Kwok Keung shiu, Jian-Wen Qui:“ Dependency of copper toxicity to polychaete”, *Toxicology.*, **2006**, *ZZ*, 117–125.
- [72] J.O. Leckie, J.A. Davis:“ Aqueous environmental chemistry of copper. In copper in Environment. Part 1”, J.O. Nriagau. Ed., J. wilez and sons p. 90–121, **1979**.

Chapitre III

Résultats et Discussion

I. Introduction

Les études sur les interactions entre ligands organiques et les ions métalliques (complexes) est une branche importante de la chimie bio-inorganique fournissant des informations aidant à la compréhension de la nature de ces interactions.

De plus, les tendances différentes des divers métaux à réagir avec un ligand ont engendré plusieurs théories relatives au mode d'interactions. Il est donc fondamental d'élucider les mécanismes d'interactions qui induisent les différents types de coordination.

On se propose d'étudier les interactions qui peuvent avoir lieu dans la cavité buccale entre quatre colorants alimentaires et deux métaux lourds (Cuivre et Mercure) afin de fournir des informations pour éviter l'intoxication par les amalgames dentaires.

Dans notre travail et dans un premier lieu, on a étudié l'interaction des ligands seuls avec l'enzyme de Tyrosine Phosphatase (PTP1B) impliqué dans le diabète type II [1], dans un deuxième lieu, une étude des interactions des complexes de nos ligands avec l'enzyme de α -amylase sera exécutée [2], afin d'élucider les mécanismes d'interaction.

Pour cela la DFT conceptuelle et les méthodes non-quantiques tel que la mécanique moléculaire, le docking moléculaire [3-6] ont été retenues pour mener à bien ce travail de recherche.

II. Structures et propriétés électroniques des ligands et leurs complexes avec Hg et Cu

II.1. Détails des calculs

Au niveau de ce chapitre l'étude porte sur les colorants azoïques (L_1 : Jaune orangé S (E110), L_2 : Tartrazine (E102), L_3 : Amarante (E123) et L_4 : Red Ponceau ou le rouge cochenille (E124) en interaction avec les ions métalliques de cuivre (II) et de mercure (II). Pour cela dans une première étape les structures des ligands seuls ont été optimisés à l'aide des méthodes semi-empiriques (AM1) [7], suivis par des calculs de DFT (théorie fonctionnelle de densité) [8] en utilisant la fonctionnelle B3LYP [9-11] et la base 6-31G* [12,13] à l'aide du programme Gaussian 03 [14].

Les indices de réactivité indices de Fukui et nucléophilie locale ont été calculés en utilisant les populations électroniques obtenues par l'analyse des populations de Mulliken (MPA) et l'analyse de populations naturelles (NPA) [15-18].

Des calculs de mécanique moléculaire ont été exécutés en utilisant le programme EMO (Energy MOlecular) (version 2010) [19,20].

Les composants du champ de force du programme EMO décrivant l'interaction dans les complexes mono-nucléaires de ligand-métal ont été employés dans beaucoup d'études précédentes, ils restent en bon accord avec les données expérimentales [21-23].

Le programme EMO présente trois menus principaux :

- **menu 1** : Entrée de la molécule à l'aide du clavier ; chaque atome est codifié selon son hybridation. Le nombre maximum des atomes : 420, y compris les hydrogènes et les seules paires électroniques.

- **menu 2** : Manipulation géométrique de la molécule
- **menu 3** : Minimisation d'énergie par la mécanique moléculaire.

II.2. Ligands

Nos ligands sont des colorants alimentaires azoïques caractérisés par la présence d'un groupement azoïque (-N=N-) reliant deux noyaux benzéniques. Cette catégorie de colorants est actuellement la plus répandue sur le plan de l'application, puisqu'ils représentent plus de 50% de la production mondiale de matières colorantes [24,25].

Les géométries optimisées au niveau DFT/B3LYP/6-31G(d) sont schématisées dans la figure 1.

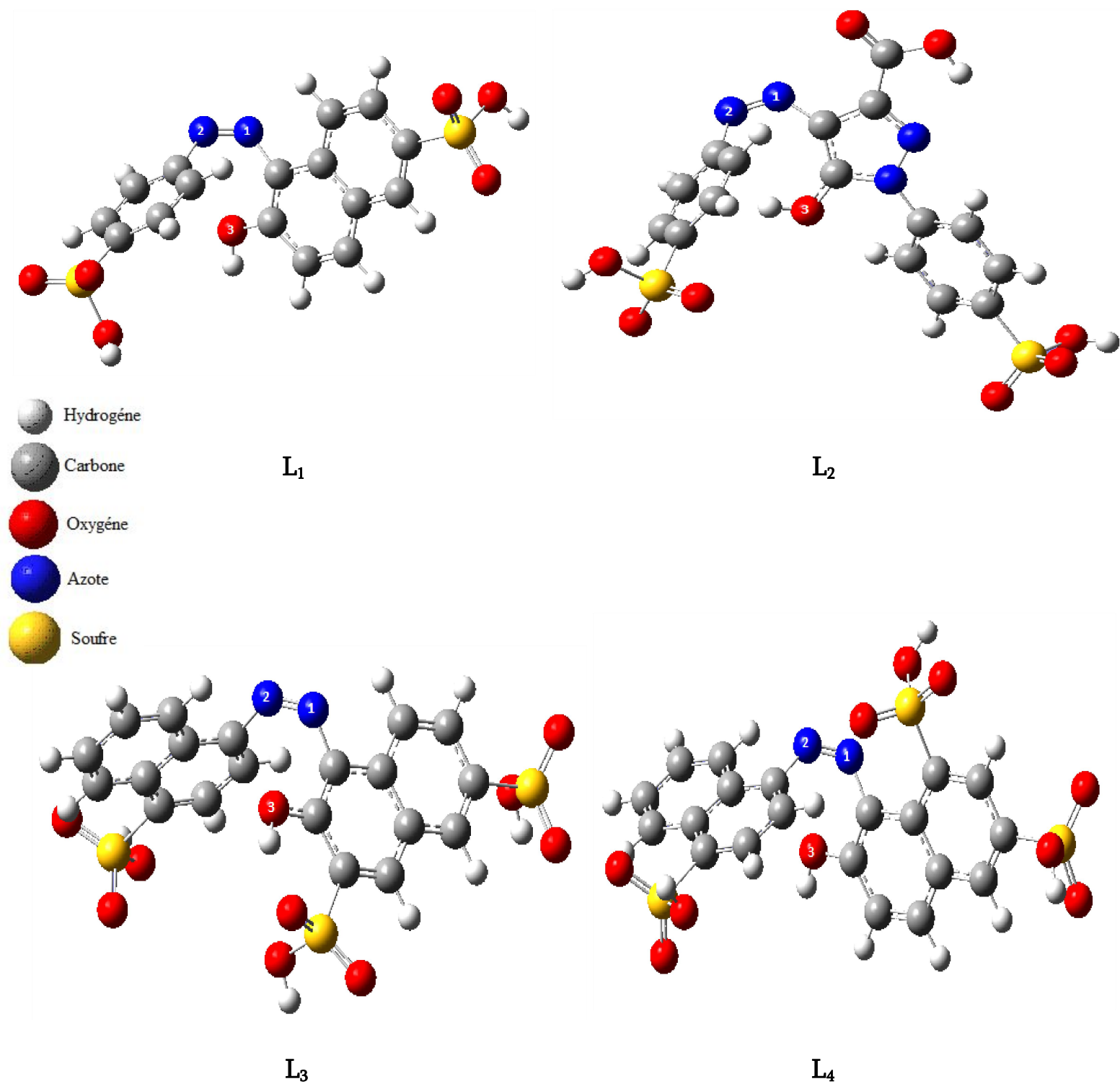


Figure 1 : Structures des ligands L_1 , L_2 , L_3 , L_4 optimisées par la DFT (B3LYP/6-31G(d)).

II.2.1. Propriétés structurales

Les géométries optimales obtenues sont des minima puisque les calculs de fréquences au niveau de DFT/B3LYP/6-31G(d) ne révèle aucune fréquence négative, certaines distances interatomiques, angles de valences et les angles dièdres sont donnés dans les tableaux 1, 2 et 3 :

Tableau 1 : les distances interatomique en (Å)

	N ₄ -N ₅	C ₂ -O ₁	N ₅ -O ₁
L ₁	1.249	1.359	2.953
L ₂	1.252	1.336	3.378
L ₃	1.249	1.342	2.915
L ₄	1.247	1.354	2.821

Tableau 2 : les Angles de valence en (°)

	C ₆ -N ₅ -N ₄	N ₅ -N ₄ -C ₃	N ₄ -C ₃ -C ₂	C ₃ -C ₂ -O ₁
L ₁	123.586	123.777	122.654	118.519
L ₂	123.327	123.715	131.083	132.935
L ₃	123.908	124.000	121.553	118.479
L ₄	124.223	125.310	121.458	117.860

Tableau 3 : les Angles dièdres en (°)

	C ₆ -N ₅ -N ₆ -	N ₄ -N ₅ -C ₃ -	N ₄ -N ₅ -C ₆ -
L ₁	11.329	57.314	53.296
L ₂	11.927	45.394	57.902
L ₃	11.427	56.694	52.450
L ₄	11.749	55.917	51.220

Les paramètres géométriques des ligands rapportés sur les tableaux (1, 2, 3) ci-dessus sont choisis d'une manière judicieuse, afin de, faire apparaître les sites où les métaux lourds (Hg, Cu) sont susceptibles d'interagir pour former les complexes. L'analyse de ces paramètres géométriques montre que :

Les valeurs des distances interatomiques, sont très proches, sauf pour le ligand L₂

où les distances C_2-O_1 , N_5-O_1 sont légèrement différentes de celles des autres ligands, elles sont d'ordre de 1,336 Å et 3.378 Å respectivement.

Les valeurs des angles de valence des ligands sont identiques, mais nous remarquons que les angles $N_4-C_3-C_2$, $C_3-C_2-O_1$ de L_2 sont nettement supérieurs.

L'analyse du tableau 3 des valeurs d'angles dièdres montrent aussi que L_2 est différent des autres, au niveau des angles dièdres : $N_4-N_5-C_3-C_2$ est le plus petit avec une variation moyenne de 9° par rapport aux autres ligands, $N_4-N_5-C_6-N_7$ est le plus grand avec une variation moyenne de 5° .

II.2.2. Propriétés électroniques

Les orbitales les plus importantes dans les molécules sont les orbitales moléculaires frontières appelées HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) et LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital).

Ces orbitales nous informent sur le mode d'interaction entre les entités moléculaires.

Le calcul du gap énergétique d'orbitale frontière [$\text{Gap} = |\text{HOMO-LUMO}|$] nous aide à caractériser la réactivité chimique et la stabilité cinétique de la molécule.

Plus le Gap diminue, plus la réactivité chimique augmente, la faible stabilité cinétique engendre une molécule douce (la mollesse) [26].

Les valeurs d'énergies des orbitales frontières, le moment dipolaire, l'énergie d'ionisation et $E(\text{DFT})$ sont reportées sur le tableau 4 suivant :

Tableau 4 : Energies de la HOMO et de la LUMO, Gap HOMO-LUMO, Moment dipolaire M, Energie d'ionisation I, Energie (DFT), pour les composés **L₁**, **L₂**, **L₃**, **L₄**.

LIGANDS	HOMO	LUMO	Gap	M (D)	I	Energies
L₁	-0.2278	-0.0998	-0.1279	7.1829	0.2278	-2049.1751
L₂	-0.2462	-0.1071	-0.1391	2.3136	0.2462	-2309.0982
L₃	-0.2288	-0.1103	-0.1184	2.8051	0.2288	-2826.6057
L₄	-0.2215	-0.1051	-0.1163	4.5033	0.2215	-2826.5873

1u.a = 627.52 Kcal/mol = 27.21 eV.

Les valeurs du gap d'énergie HOMO-LUMO augmentent selon l'ordre suivant :

$$\mathbf{L_2 < L_1 < L_3 < L_4}$$

Le ligand **L₂** possède le plus petit gap par conséquent il sera le plus réactif (tableau 4). La HOMO est l'orbitale qui agit principalement en tant que donneur d'électrons et la LUMO est l'orbitale qui agit en grande partie en tant qu'accepteur d'électrons.

Le moment dipolaire est classé dans l'ordre suivant :

$$\mathbf{M_{L_1} > M_{L_4} > M_{L_3} > M_{L_2}}$$

On constate que **L₂** est le plus polaire.

Les illustrations spatiales des orbitales frontières HOMO, LUMO et les cartes d'énergie potentielle moléculaire (MEP) des quatre molécules sont données sur la figure 2.

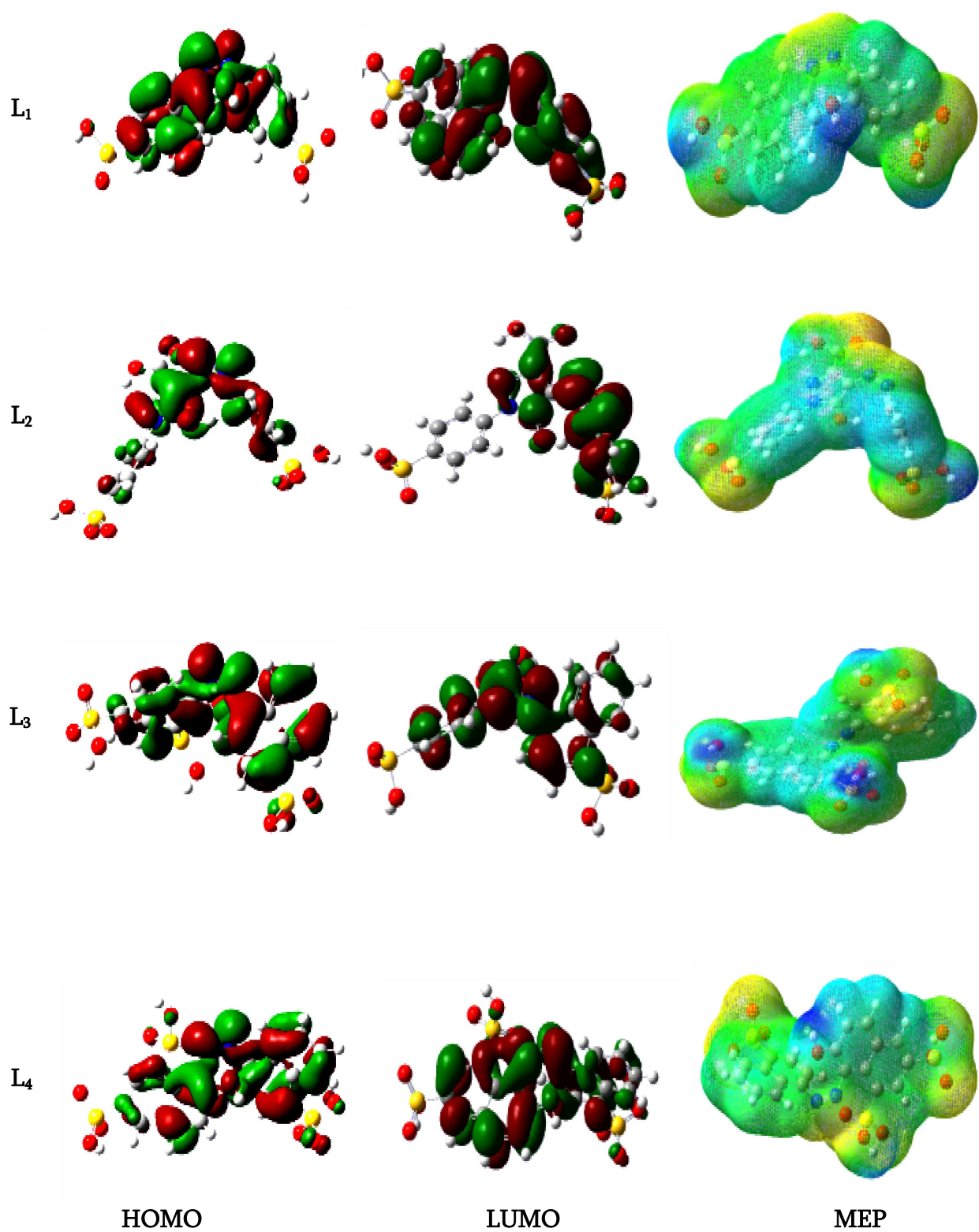


Figure 2 : HOMO , LUMO et la surface de l'énergie potentielle MEP pour les Ligands L₁, L₂, L₃ et L₄.

La carte MEP prouve que les atomes d'oxygène et d'azote représentent la région d'énergie potentielle la plus négative, reconnue par la couleur jaunâtre qui est attribuée à la surface d'énergie potentielle négative. Mais, en les comparant entre eux l'atome d'azote a un potentiel négatif inférieur à celui de l'atome d'oxygène.

La distribution des charges de Mulliken est donnée dans le tableau 5 qui suit :

Tableau 5 : Charges de Mulliken (q_N , q_{N+1}) des trois atomes N_4 , N_5 et de l' O_1 dans les systèmes neutres et anioniques, respectivement pour les ligands L_1 , L_2 , L_3 et L_4 .

LIGANDS	ATOMES					
	N_4		N_5		O_1	
	q_N	q_{N+1}	q_N	q_{N+1}	q_N	q_{N+1}
L_1	-0.2449	-0.1587	-0.2456	-0.1783	-0.6337	-0.5983
L_2	-0.2370	-0.1291	-0.2370	-0.1537	-0.6332	-0.6014
L_3	-0.2558	-0.2033	-0.2450	-0.1857	-0.6484	-0.6289
L_4	-0.2349	-0.1730	-0.2531	-0.1831	-0.6247	-0.6148

L'atome d'hydrogène lié à un cycle à six ou à cinq atomes possède une charge positive élevée (maximale).

Les charges de Mulliken des atomes (tableau 5) sont plus significatives sur les atomes d'azote N_4 , N_5 et l' O_1 , ils sont considérés comme des sites les plus nucléophiles.

Dans la plupart des cas N_4 possède des valeurs des charges de Mulliken négatives plus petites que celles de N_5 .

Cependant, la distribution des charges positive sera localisée sur les atomes d'hydrogènes.

On donne les indices de nucléophilie globales N_g , indices de Fukui f_k^- , indices de nucléophilie locales N_k pour les sites : N_4 , N_5 et O_1 des ligands L_1 , L_2 , L_3 , L_4 dans le tableau

6 suivant :

Tableau 6 : Indices de nucléophilie globales $N_g(ev)$ [27-29], Indices de Fukui f^-_k [30], les indices de nucléophilie locales N_k [29] pour les sites : N_4 , N_5 et O_1 des ligands L_1 , L_2 , L_3 et L_4 .

LIGANDS	ATOMES						
	N_4		N_5		O_1		
	$N_g(ev)$	f^-_k	N_k	f^-_k	N_k	f^-_k	N_k
L_1	2.29	0.0862	0.1974	0.0673	0.1541	0.0354	0.0811
L_2	2.42	0.1021	0.2470	0.0833	0.2015	0.0318	0.0769
L_3	2.89	0.0525	0.1517	0.0593	0.1713	0.0195	0.0563
L_4	3.09	0.0618	0.1912	0.0700	0.2163	0.0099	0.0305

Energie de HOMO, -0.33518 a.u, du système de référence (TCE) a été calculée à la même méthode (B3LYP/6-31G*)

L'analyse des indices de nucléophilie locale et les indices de fukui f^-_k rapportés dans le tableau 6 montre que l'atome d'azote N_4 dans le cas de L_2 est caractérisé par la valeur la plus élevée ainsi que les indices de Fukui.

Pour le ligand L_1 , l'atome d'oxygène détient les valeurs les plus élevés concernant les indices de nucléophilie locale et les indices de fukui f^-_k .

II.3. Complexes

L. Szabo, K. Herman, N.E. Mircescu et al [31] ont montré que les interactions entre les colorants azoïques et les ions métalliques, occupent une place primordiale en chimie analytique, et contribuent à une compréhension plus profonde des modes de coordination de l'hydroxyle et des groupements d'azote, avec les ions de métaux de transition ayant le rapport 2:1, deux ligands, ion métalliques et 2 molécules d'eau.

Par conséquent, les atomes N_4 et O_1 seront les centres les plus réactifs, qui ont

la plus grande possibilité de se lier avec les ions métalliques.

Les atomes donneurs N_4 , O_{hydroxyl} et H_2O se lient avec les ions métalliques (cuivre et le mercure) pour donner des complexes stables.

Seules les coordinations 4 et 6 autour de l'atome central (ion métallique) ont été considérées.

L'atome central Cu (II) est chélaté avec une coordination de six (géométrie octaédrique) (voir figure 3) dont quatre atomes des ligands étudiés: deux hydroxyles(OH) et deux atomes d'azote (N) au niveau du plan carré (coplanaires), Les positions apicales (axiales) sont occupées par deux molécules d'eau [31].

Mais pour l'atome central Hg(II), il est chélaté avec une coordination de quatre (géométrie tétraédrique ou plan carré) (voir figure 4) quatre atomes des colorants azoïques : deux hydroxyles et deux atomes d'azote (N) au niveau du plan carré [32].

II.3.1. Complexes de cuivre

II.3.1.1. Propriétés structurales

Toutes les géométries des complexes étudiés (de cuivre) sont optimisées avec la méthode de la Mécanique Moléculaire à l'aide du logiciel de calcul EMO.

Les différentes structures spatiales des complexes optimisés de cuivre sont représentées sur la figure 3.

Hydrogène Carbone Oxygène Azote Soufre Cuivre

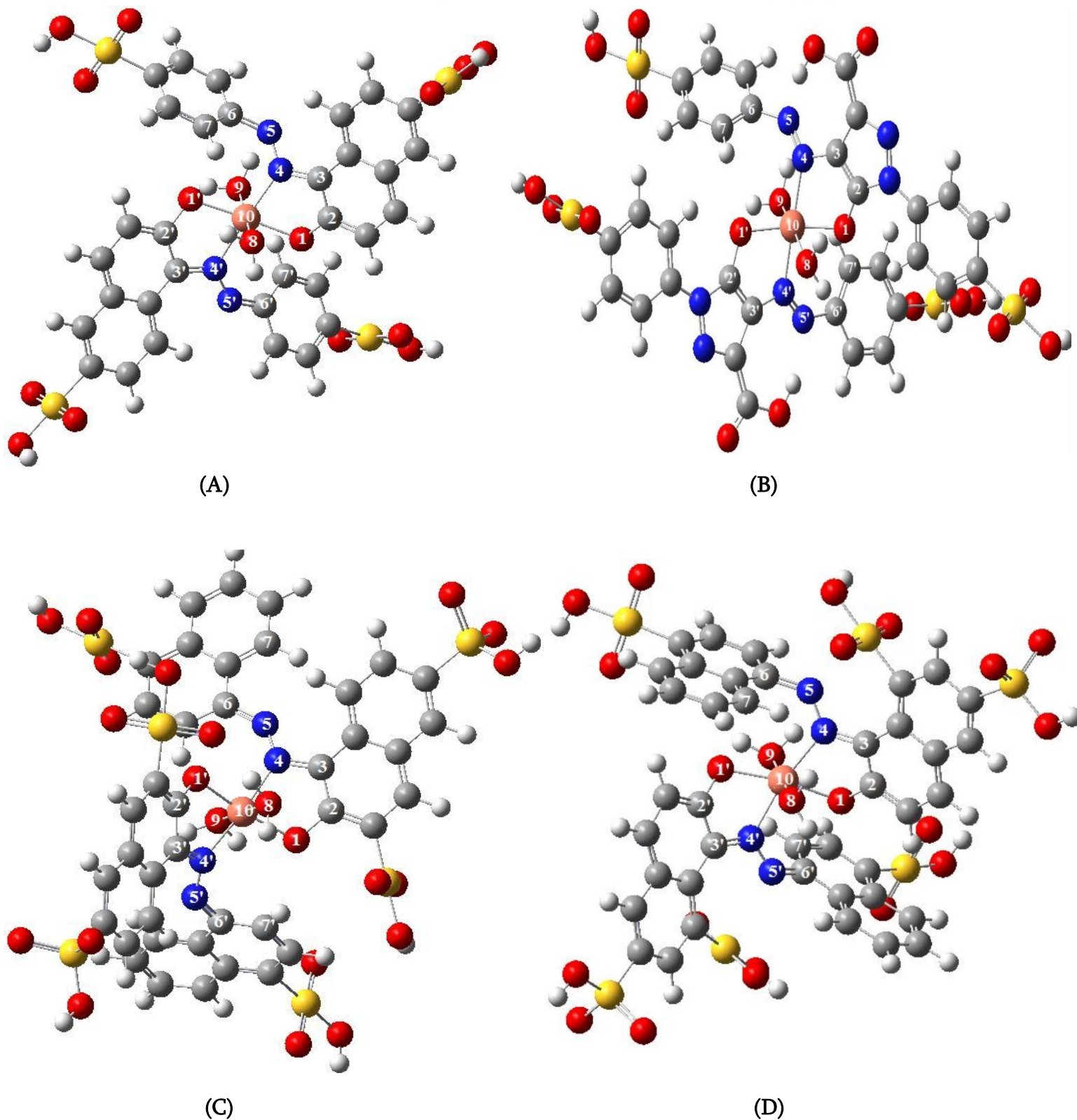


Figure 3 : La conformation la plus stable de divers géométries de complexes [(A): Jaune Orangé S-Cu²⁺, (B):Tartrazine-Cu²⁺, (C): Amarante-Cu²⁺, (D): Ponceau 4R-Cu²⁺].

Après une optimisation complète, les résultats des calculs sont rapportés sur les tableaux (7,8 ,9) suivant :

Tableau 7 : Les distances interatomiques en (Å)

	Cu-O ₈	Cu-O ₉	Cu-O ₁	Cu-N ₄	Cu-O _{1'}	Cu-N _{4'}	O ₁ -N ₄	O _{1'} -N _{4'}
(A)	1.966	1.957	1.958	1.952	2.020	2.022	2.512	2.555
(B)	1.961	1.956	1.969	1.967	2.019	2.012	2.520	2.557
(C)	1.967	1.965	1.956	1.953	2.028	2.020	2.519	2.536
(D)	1.970	1.956	1.957	1.952	2.025	2.040	2.372	2.451

Sur le tableau 7 nous pourrions facilement constater qu'il y a quatre atomes qui occupent un plan équatorial dont deux atomes d'oxygènes (O₁, O_{1'}) hydroxyliques, ainsi que, deux atomes d'azotes (N₄, N_{4'}) avec une distance de 1.97 Å, qui occupent les sommets de ce plan carré. Les oxygènes (O₈, O₉) qui proviennent des molécules d'eau, sont équidistants de l'ion du cuivre (1.96 Å), ils sont en position apicale (axiale).

D'après V.J. Burton., et al [34], R.J. Deeth et al [35], M. Zimmer et al [36], la liaison axiale possède une longueur plus longue que celle en position équatoriale pour le même type d'atome. Cependant, le plan carré dans notre cas est légèrement déformé, ceci est dû probablement à la répartition de différents (pas de même types) atomes sur les sommets de l'octaèdre et la gêne stérique entre les molécules.

Tableau 8 : Les valeurs d'angles de valence en (°)

	O ₁ -Cu-N ₄	O _{1'} -Cu-N _{4'}	O ₁ -Cu-N _{4'}	O _{1'} -Cu-N ₄
(A)	78.239	80.062	98.758	100.891
(B)	78.518	79.791	104.164	99.105
(C)	78.600	79.130	106.154	96.401
(D)	72.757	76.058	115.389	97.065

Le tableau 8 rapporte les valeurs d'angles de valence, il confirme les remarques faites avec les distances intermoléculaires à propos de la répartition des atomes sur le site octaédrique et la légère déformation du plan carré ce qui lui confère une structure peu encombrée. Néanmoins, les valeurs des angles de valence opposés (O_1-Cu-N_4), ($O_{1'}-Cu-N_{4'}$) et ($O_1-Cu-N_{4'}$), ($O_{1'}-Cu-N_4$) indiquent que le plan carré formé dans le cas du complexe (A) est presque parfait par rapport au autres complexes (B, C, D).

Tableau 9 : Angles dièdres en (°)

	$O_1-N_4-O_{1'}-N_{4'}$	$O_{1'}-Cu-O_9-N_4$	O_1-Cu-O_8-
(A)	-1.124	178.951	179.193
(B)	-15.720	-178.858	-177.923
(C)	-9.560	175.383	176.073
(D)	13.370	-169.277	-168.820

Le tableau 9 prévoit la présence d'un plan carré régulier, les angles de torsion ($O_1-N_4-O_{1'}-N_{4'}$), ($O_{1'}-Cu-O_9-N_4$) et ($O_1-Cu-O_8-N_4$) le prouve pour le complexe (A) car leurs valeur et très proche de 180° ou de 360° . Par contre, pour les autres complexes (B, C, D) les valeurs des angles dièdres prédisent la formation d'un plan carré irrégulier (peu déformé).

II.3.2. Complexes de mercure

II.3.2.1. Propriétés structurales

Toutes les géométries des complexes étudiés (mercure) sont optimisées avec la méthode de la Mécanique Moléculaire à l'aide du logiciel de calcul **EMO**.

Les différentes structures spatiales des complexes optimisés de mercure sont représentées sur la figure 4.

Hydrogène Carbone Oxygène Azote Soufre Mercure

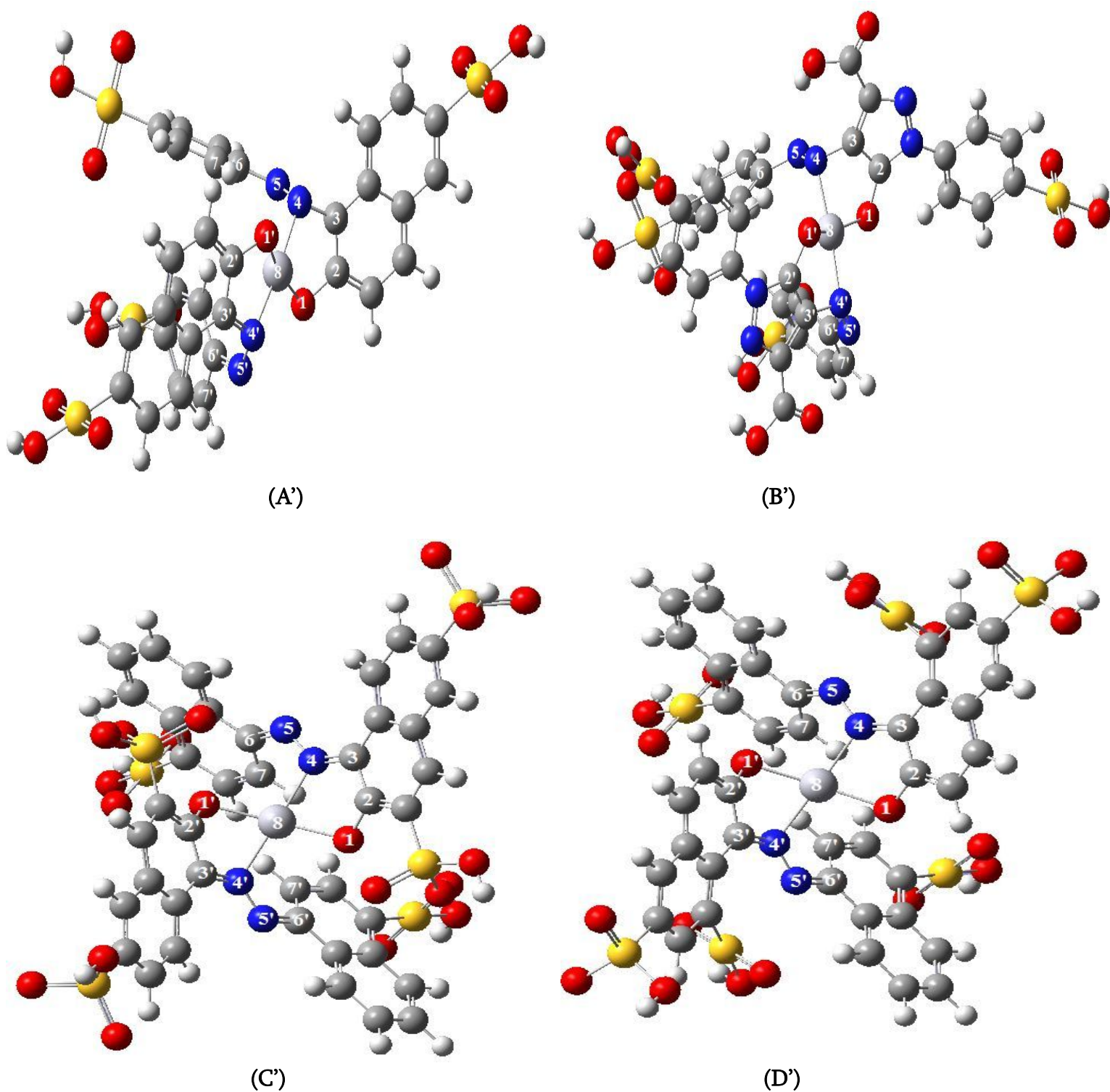


Figure 4 : La conformation la plus stable de divers géométries de complexes [(A') : Jaune Orangé S-Hg²⁺, (B') : Tartrazine-Hg²⁺, (C') : Amarante-Hg²⁺, (D') : Ponceau 4R-Hg²⁺].

Tableau 10 : Les distances interatomiques en (Å)

	Hg-O ₁	Hg-O _{1'}	Hg-N ₄	Hg-N _{4'}	O ₁ -N ₄	O _{1'} -N _{4'}
(A')	1.991	1.989	2.039	2.042	2.667	2.622
(B')	1.995	2.000	2.034	2.040	2.645	2.601
(C')	2.047	1.992	2.046	1.940	2.536	2.022
(D')	1.983	1.986	2.047	2.042	2.556	2.451

Il y a formation d'un plan carré très peu déformé pour tous les complexes, les distances interatomiques (Hg-O₁, Hg-O_{1'}), (Hg-O_{1'}, Hg-N_{4'}) du tableau 10 a le confirme car elles sont presque identiques.

Tableau 11 : Les Angles de valence en (°)

	O ₁ -Hg-N ₄	O _{1'} -Hg-N _{4'}	O _{1'} -Hg-N ₄	O ₁ -Hg-N _{4'}
(A')	81.082	82.911	92.854	103.582
(B')	80.234	81.958	93.539	104.540
(C')	81.694	81.798	90.173	110.289
(D')	75.006	78.635	91.341	105.080

Les angles de valence (O₁-Hg-N₄) (O_{1'}-Hg-N_{4'}) et (O_{1'}-Hg-N₄) (O₁-Hg-N_{4'}) sont en opposition et égaux. la tendance des angles (O_{1'}-Hg-N₄) (O₁-Hg-N_{4'}) à s'ouvrir et dû à la gêne stérique par les cycles du complexe, ce qui confère au complexe sa stabilité (formation du plan carré régulier ou irrégulier), néanmoins on remarque que l'écart entre les angles en opposition (O_{1'}-Hg-N₄) (O₁-Hg-N_{4'}) qui devrait être le même est donné dans l'ordre suivant : C' > D' > B' > A'.

Tableau 12 : Les Angles dièdres en (°)

	O ₁ -N ₄ -O _{1'} -N _{4'}	Hg-N ₄ -N ₅ -C ₆	Hg-N _{4'} -N _{5'} -C _{6'}
(A')	-12.250	-53.524	65.217
(B')	-19.350	66.126	-44.798
(C')	-13.708	-12.679	63.500
(D')	-14.984	-35.045	-55.637

Les angles de torsion ($O_1-N_4-O_1-N_4$) des complexes sont proches de 360° se qui justifie la formation du plan carré, qui confère aux complexes leurs stabilité.

Plus l'angle dièdre s'éloigne de 360° , le plan sera déformé et par conséquent les complexes seront moins stable, dans ce cas l'ordre de stabilité des complexes est donné comme suit : $A' > C' > D' > B'$

II.3.2.2. Analyse des composantes énergétiques des deux complexes (Cuivre et Mercure)

L'optimisation de la géométrie et la minimisation d'énergie stérique pour tous les complexes formés ont été déterminées par le programme EMO en utilisant la mécanique moléculaire.

Tableau 13 : Énergies stériques (KJ/mol) des complexes de Cu(II) (Octaédrique n=6)

Complexes	Energies					Totale
	Elongation	Valence	Torsion	V.d.W	Electrostatiq	
(A)	11.29	89.37	-105.37	155.09	-81.75	68.638
(B)	10.63	284.39	-49.77	166.72	-132.59	279.386
(C)	14.84	106.81	-147.49	220.58	-84.94	109.798
(D)	23.18	144.74	-70.23	216.88	-72.78	241.790

Tableau 14 : Énergies stériques (KJ/mol) des complexes de Hg(II) (Plan carré n=4)

Complexes	Energies					Totale
	Elongation	Valence	Torsion	V.d.W	Electrostatiq	
(A')	07.07	51.04	-179.00	224.19	-62.95	40.350
(B')	9.79	203.14	-112.44	134.91	-79.65	155.745
(C')	15.54	140.74	-232.33	202.37	-82.14	44.175
(D')	10.15	130.18	-200.50	200.86	-70.24	70.450

Les résultats obtenus à l'aide de la mécanique moléculaire montrent que les complexes formés avec l'ion Hg(II) et l'ion Cu(II) sont stables.

La formation des complexes pour tous les ligands L₁, L₂, L₃ et L₄ s'effectue aisément avec l'ion de mercure par rapport à celle de cuivre (énergie stérique plus basse pour les complexes de Hg).

La complexation de Hg (II) ou Cu (II) avec le ligand L₁ donne lieu à un complexe avec une énergie plus basse que tous les autres L₂, L₃, L₄. Cependant, il est clair que la complexation est meilleure dans le cas de Hg(II) qu'avec le Cu(II).

On remarque que l'énergie stérique (tableau13) pour les complexes cuivriques augmente dans l'ordre suivant : $E_{(A)} < E_{(C)} < E_{(D)} < E_{(B)}$.

On note aussi que l'énergie stérique (tableau 14) pour les complexes mercurique augmente dans l'ordre suivant : $E_{(A')} < E_{(C')} < E_{(D')} < E_{(B')}$.

II.4. Conclusion

Plusieurs travaux antérieurs ont prouvé que le mercure libéré par les amalgames dentaires cause une toxicité élevée [37-44]. Malheureusement, la littérature ne fournit pas des informations complètes concernant la quantité du métal libéré par ce amalgames. Ceci nous a mené à développer une étude théorique qui explique la manière avec laquelle ces complexes sont formés, puis, analyser les interactions existantes entre ces ions métalliques et les colorants azoïques, afin d'avoir une idée sur l'intoxication par ces ions.

Pour le cas des ligands ou la taille de nos systèmes est petite en l'absence d'atome lourd. Parmi les méthodes de la mécanique quantique la

théorie de la fonctionnelle de densité au niveau B3LYP avec la base 6-31G(d) a été utilisée pour l'optimisation géométrique des ligands pour obtenir les paramètres géométriques, les paramètres électroniques (les indices de Fukui f_k^- , les indices de nucléophilie locale N_k , les énergies HOMO, LUMO, le gap énergétique, la distribution des charges de Mulliken, le moment dipolaire et l'énergie d'ionisation ainsi que l'énergie DFT), pour prédire les sites d'attaques nucléophiles et électrophiles.

D'après l'analyse de la distribution des charges de Mulliken, on constate que les sites N_1, N_2 et O_1 sont les plus favorables pour l'attaque électrophile de tous les colorants azoïque, ces résultats sont confirmés par les calculs des indices de Fukui f_k^- .

Les calculs des indices de la nucléophilie locale N_k prouvent que les composés étudiés ont beaucoup de centres actifs nucléophiles, néanmoins, elle confirme une fois de plus les sites d'attaque favorable retrouvés par calcul de la distribution des charges de Mulliken et f_k^- .

Les calculs effectués sur les complexes (ligands- ions métalliques) ont été exécutés avec la méthode de la mécanique moléculaire en utilisant le programme EMO pour les raisons suivantes :

- les calculs prennent moins de temps que ceux de la mécanique quantique.
- les complexes sont de taille considérable (grosses molécules en présence de métaux lourds c'est-à-dire nombre d'électrons).
- les composantes du champ de force, décrivant les interactions dans les

complexes mono-nucléaires ligand-métal ont été utilisées dans des études théorique antérieurs, qui sont en bon accord avec des données expérimentales.

Les résultats obtenus sont comme suit :

Les paramètres géométriques et électroniques montrent que les meilleurs systèmes ligand-métal sont ceux du Hg, en les comparant à ceux du cuivre ceci est dû :

Les énergies stériques les plus basses sont obtenues pour les complexes de Hg, à cause de leurs géométries tétraédrique (plan carré) avec des conformations peu déformées ce qui leurs confère une grande stabilité, par contre dans le cas des complexes de cuivre qui ont une géométrie octaédrique avec des conformations peu déformés aussi, ont des énergies plus élevées.

En outre, le ligand L_1 est le plus deangereux car il donne lieu à un complexe de cuivre et de mercure avec une énergie minimale.

III. Interaction de l'enzyme de la tyrosine phosphatase avec les colorants alimentaires

III.1. Détails des calculs

III.1.1. Préparation et optimisation de la Tyrosine Phosphatases

Le téléchargement de l'enzyme Tyrosine Phosphatase (PTP1B) a été exécuté à partir de la base de données Bookhaven Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) [45] (code d'accès : (1BZJ) [46]. Sachant que la Tyrosine Phosphatases est co-cristallisée avec le 6-(difluoro-phosphono-méthyl)-naphthalene- 2-carboxylic acid [PIC_304 (20 atomes)].

La structure 3D de la PTP1B obtenue par diffraction en rayon X avec une

résolution (1.90 Å). Elle cristallise sous la forme d'un monomère constitué de 2979 atomes.

Nous avons simplifié le modèle de l'enzyme par élimination des molécules d'eau (figure 5). De plus, nous avons enlevé tous les inhibiteurs qui ont été utilisés lors de la co-cristallisation.

L'optimisation de l'enzyme Tyrosine Phosphatases (PTP1B), a été exécutée à l'aide de logiciel Molegro Virtuel Docker [47,48].

Le monomère comporte les résidus formant le site actif qui sont représentés par une couleur verte montrés dans la figure 6.

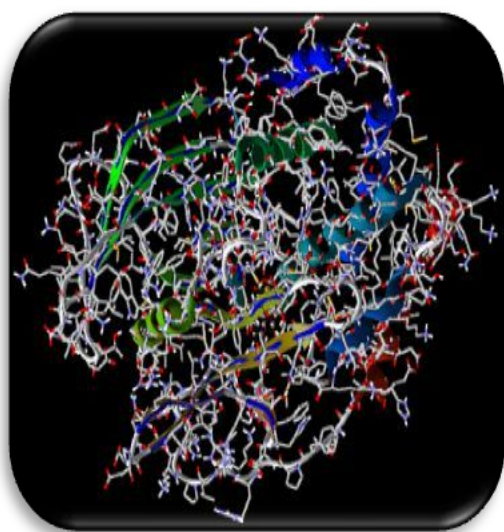


Figure 5 : Le modèle simplifié de Tyrosine Phosphatases

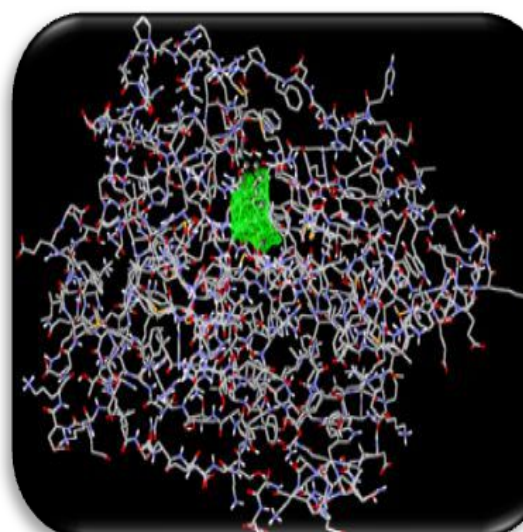


Figure 6 : Les résidus du site actif

III.1.2. Préparation et optimisation des ligands

Les inhibiteurs sont des colorants alimentaires, leurs structures sont représentées dans la figure 7 (logiciel ChemOffice 07) [49]:

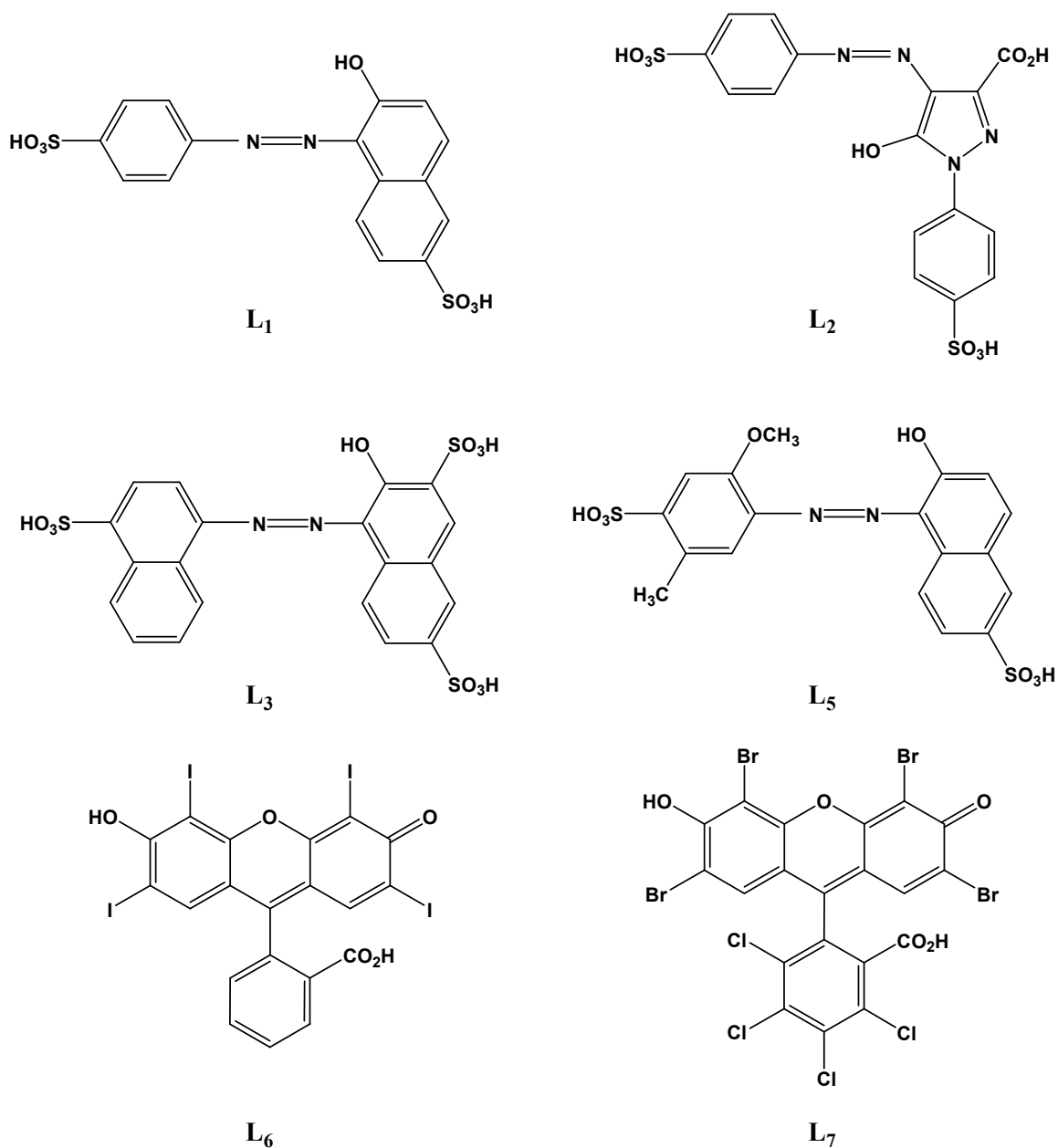


Figure 7 : Structure chimique des colorants alimentaires L₁ : Jaune Orangé S(E110), L₂ : Tartrazine (E102), L₃ : Amarante (E123), L₅ : Rouge Allura AC(E129), L₆ : Erythrosine B(E127), L₇ : Phloxine B

L'optimisation et le calcul des fréquences de vibration des ligands ont été exécutés à l'aide des programmes suivants : HyperChem07 [50] et Gaussian 03 [14].

Les niveaux de calculs utilisés sont :

- Semi-empirique (AM1) [7]
- DFT /B3LYP (6-31G*) [8,9-13]

Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Energies des géométries optimisées par la DFT/B3LYP (6-31G*) en Kcal/mol

Ligands	L ₁	L ₂	L ₃	L ₅	L ₆	L ₇
Energies (Kcal/mol)	-165.3525	-180.7885	-257.2204	-200.9946	-4.6436	-64.0070

III.2. Docking moléculaire

L'étape suivante est le positionnement des ligands dans le site actif de l'enzyme étudié (PTP1B) c'est-à-dire formation des complexes (voir protocole de calcul dans la figure 8). Pour cela nous avons utilisé le programme Mol Dock du logiciel Molegro Virtual Docker (MVD).

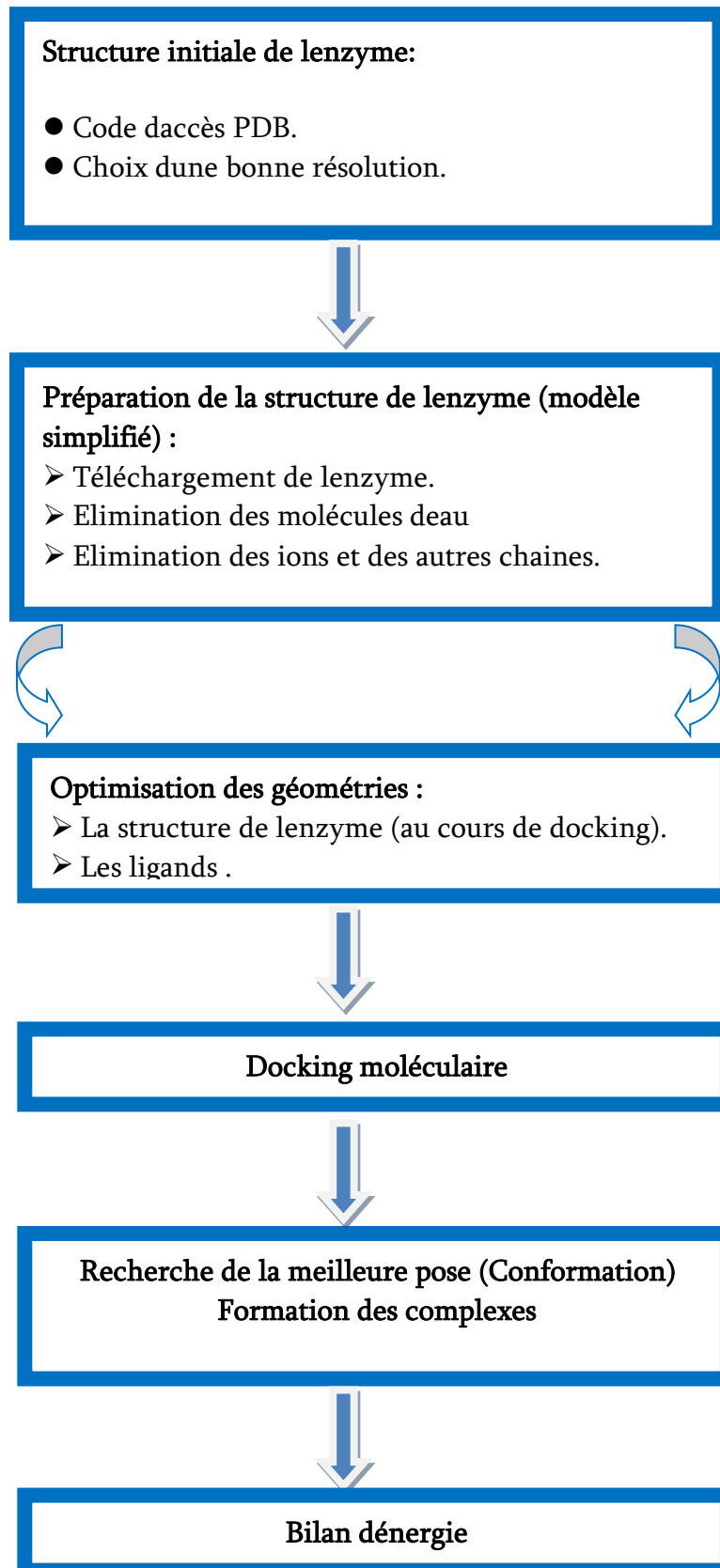


Figure 8 : Protocole de calcul

III.2.1. Etape de docking moléculaire

La première étape est de télécharger les structures chimiques des cibles visées à traiter (Enzyme dans notre cas), pour cela il est nécessaire d'aller directement à la Bank PDB (<http://www.pdb.org>) et déterminer où sont déposées les structures de ces cibles.

En suite, la PDB contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la Bank, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée.

Après le téléchargement de la cible (PDB), nous utilisons un logiciel de visualisation pour voir avec quels ligands l'enzyme est co-cristallise (eau, ligands, ion,...).

Pour identifier le site actif on utilise la méthode de détection de cavité "knob & hole" expliquée comme suite : On considère le centre de la sphère de volume V qui est placé sur la surface moléculaire (Connolly) (Voir la figure 9), On fait "rouler" la sphère sur la surface moléculaire et On calcule le volume de la sphère qui pénètre dans la protéine qu'on note : V_{com}

V_{com} est classé en trois catégories suivant sa taille :

$$\left\{ \begin{array}{ll} 0 < V_{com} \leq \frac{V}{3} & \longrightarrow \text{Knob (coin)} \\ \frac{V}{3} < V_{com} \leq \frac{2V}{3} & \longrightarrow \text{Plan} \\ \frac{2V}{3} < V_{com} \leq V & \longrightarrow \text{Hole (trou)} \end{array} \right.$$

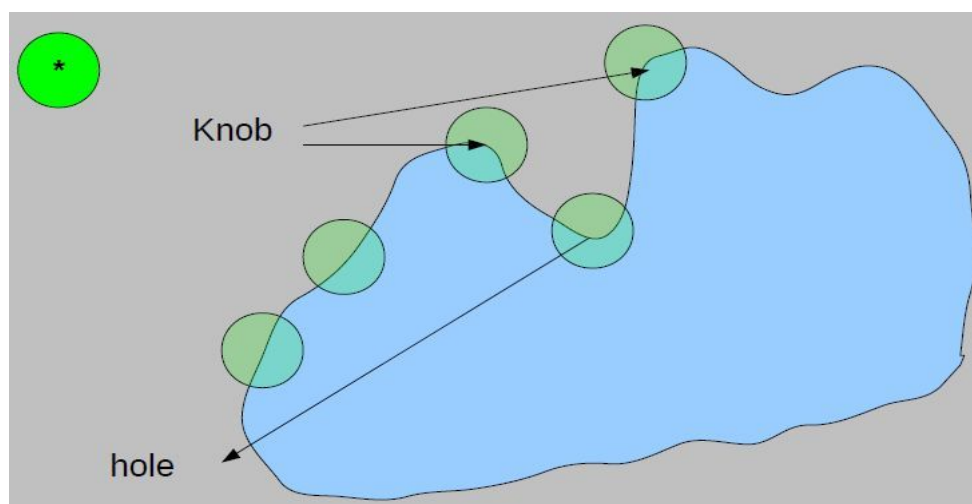


Figure 9 : Méthode de détection de cavité knob & hole [51]

La deuxième étape, concernent les structures du (ou des) ligand(s) utilisé(s) lors du docking moléculaire. Il y a deux grandes sources de structures chimiques des ligands. La première représente ces structures par les programmes d'informatiques de modélisation moléculaire, où les différentes structures sont générées par optimisation de géométrie. Ces structures sont gouvernées par les lois de la chimie quantique. Dans le deuxième cas elles sont obtenues à partir des bases de données comme Pub Chem Project ou autres bases de données des structures. Ces dernières ont différentes extensions comme SMILES (Simplified Molecular Input line Entry System), PDB (Protein Data Bank), SDF, ...ect.

III.2.2. Choix de logiciel de MolDock (MVD)

Dans le domaine de docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisé pour étudier les différentes interactions existantes entre deux entités moléculaire (Enzyme-ligands). Nous pouvons citer comme exemple : Glide, Surlflex, Flex X et Gold. Ces logiciels fonctionnent chacun avec des algorithmes différents. Parmi ces logiciels, MolDock est un logiciel récemment développé qui a démontré un

meilleur taux de succès [47], il utilise un algorithme génétique. La fonction de score de Moldock est une fonction empirique. Ce type de fonction nous permet de choisir les composés ayant la plus grande probabilité d'interagir avec la cible, ne nécessite pas une grande puissance de calcul, ce qui permet de cribler la cible plus rapidement. Ainsi que se démarque par sa capacité à mieux évaluer les ponts H ainsi que les interactions électrostatiques.

Puisque les interactions Hydrogène contribuent de façon importante dans la liaison des ligands (Colorants azoïques) au site actif de la PTP1B et l' α -amylase, le logiciel Moldock (MVD) est un choix approprié pour entreprendre le docking moléculaire des colorants azoïques sur la PTP1B et la α -amylase.

III.3. Résultats du Docking moléculaire

III.3.1. Interaction : PTP1B-Ligands

A l'aide de logiciel Molegro, les calculs relatifs au volume et à la surface des cavités mise en évidence ont abouti aux résultats présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Volume et surface des 2 cavités détectées.

Cavités	Volume (\AA^3)	Surface (\AA^2)
Cavité 1	41.472	165.12
Cavité 2	48.128	136.96

Les deux cavités d'études sont détectées par MolDock. Cavité 1 possède le ligand qui co-cristallisé PIC_304 et la Cavité 2 a un volume plus important (Figure 10).

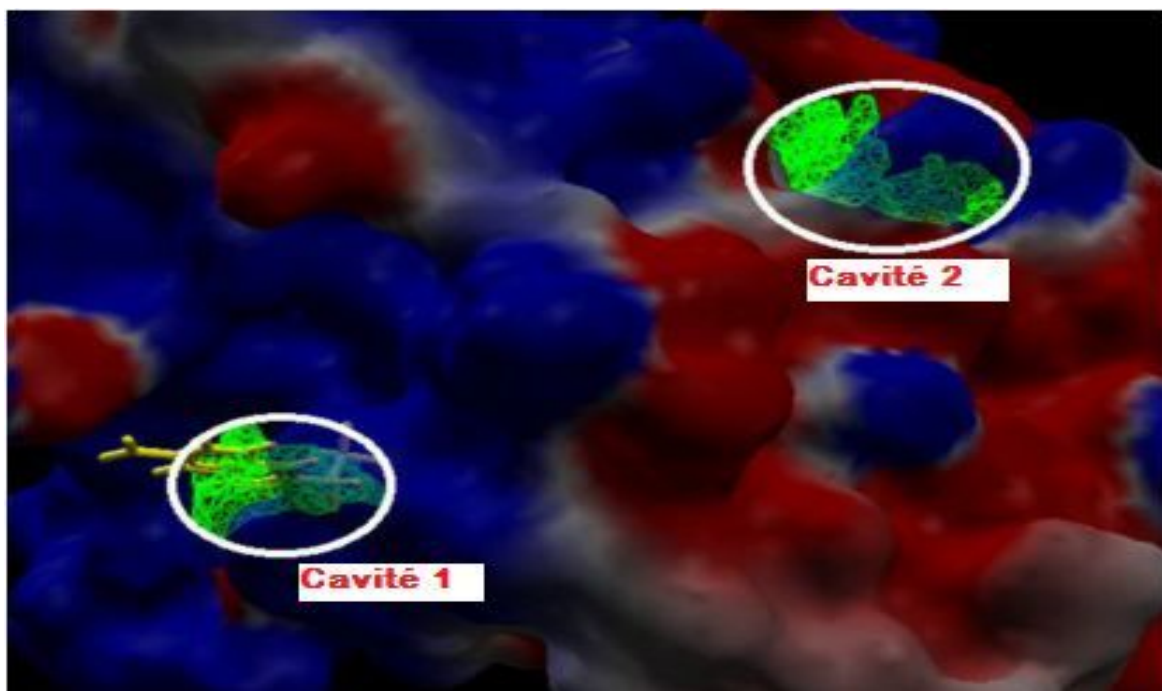
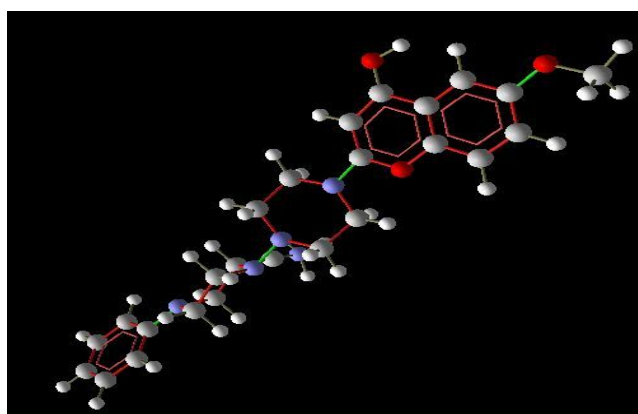


Figure 10 : Interface graphique des cavités 1 et 2 caractérisées par une ellipse identifiée par MolDock

Les deux cavités contiennent les acides aminés suivants :

Cavité 1: Arg221, Ser216, Asp181, Phe182, Ala217, Val49, Asp48, Tyr46, Lys120, Gln262, Asp48, Ile219, Gly220, Cys215, Arg47, Glu262 and Lys116

Cavité 2: Lys248, Ala77, Glu252, Glu75, Leu234, Met75, Thr230, Val249, Glu76, Met74, Asp245, Phe256, Lys73, Val244, Gln78, Lys255, Leu251, Ser243.



----- : Liaisons rigides au cours de docking moléculaire

-----: Liaisons flexibles au cours de docking moléculaire

Figure 11 : flexibilité de ligand

Dans notre étude l'interaction entre le PTP1B et les ligands (c'est-à-dire formation du complexe), s'effectue dans le cas d'un ligand flexibilité (souvent) (figure 11) et une protéine cible rigide (rarement), ceci explique que lorsqu'on a un ligand a trop de degré de liberté (plusieurs angle de dièdres) signifie qu'il ya plusieurs possibilité de fixation du ligand sur le site actif.

III.3.2. Energie d'interaction

Les différentes énergies d'interactions entre la Tyrosine Phosphatases (PTP1B) et les ligands sont calculées au cours du docking moléculaire, elles sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Résultats de docking moléculaire des Ligands L₁, L₂, L₃, L₅, L₆, L₇ avec le site actif de la PTP1B dans les deux cavités.

	Cavité 1			Cavité 2		
	MolDockScore ^a	Interaction ^b	liaisons-H	MolDockScore	Interaction	liaisons-H
L ₁	-113.958	-114.152	-3.713	-95.455	-108.382	-6.328
L ₂	-147.037	-157.729	-23.253	-115.254	-118.117	-8.451
L ₃	-137.544	-152.179	-21.170	-101.029	-119.28	-3.594
L ₅	-103.515	-101.218	0	-104.632	-114.957	-2.383
L ₆	-145.584	-152.31	-15.564	-141.283	-134.772	-8.481
L ₇	-138.408	-144.733	-22.435	-106.417	-111.957	-11.120

^a MolDock Score calculé par la somme d'interaction externe et interne de ligand (interaction protéine-ligand) en utilisant le Viewer moléculaire virtuelle 1.2.0.

^b Energie d'interaction totale entre la pose et les molécules cibles (s)

D'après les résultats obtenus (tableau 18), nous remarquons que les complexes formés par les ligands L₂ et L₆ dans les deux cavités (1et 2) possèdent des énergies plus basse par rapport aux autres complexes et par conséquent nous pouvons dire qu'ils seront probablement les plus stables.

Les différentes residus de site actif qui interviennent à la formation des complexes entre la PTP1B et les ligands dans la cavité 1 sont citées dans le tableau18 et la figure12 suivants :

Tableau 18 : Liste des residus impliqués dans l'interaction E-S de type liaisons hydrogènes et hydrophobes dans la cavité 1.

Ligands	Liaisons Hydrogène ($\leq 3.6\text{\AA}$)	Interactions Hydrophobes
L ₁	Phe182, Gly220,Lys120(2), Cys215, Arg221(2)	Gln262,Ala217,Tyr46,Val49,Ser216, Asp181.
L ₂	Asp48, Gln262(3), Cys215, Gly220, Arg221(2),Phe182	Val49, Tyr46, Ala217, Ile219, Ser216, Asp181
L ₃	Arg221,Gly220,Lys116, Asp181(2),Lys120(2), Phe182	Cys215,Gln262,Ala217,Ile219, Tyr46.
L ₅	Asp48,Ile219,Gly220, Cys215, Arg221(2).	Arg47,Ala217,Glu262, Asp181,Phe182, Lys120 ,Tyr46.
L ₆	Arg221	Ser216,Asp181,Phe182,Ala217, Val49, Asp48, Tyr46, Lys120.
L ₇	Gln262, Asp48	Ile219, Val49, Ala217, Phe182.

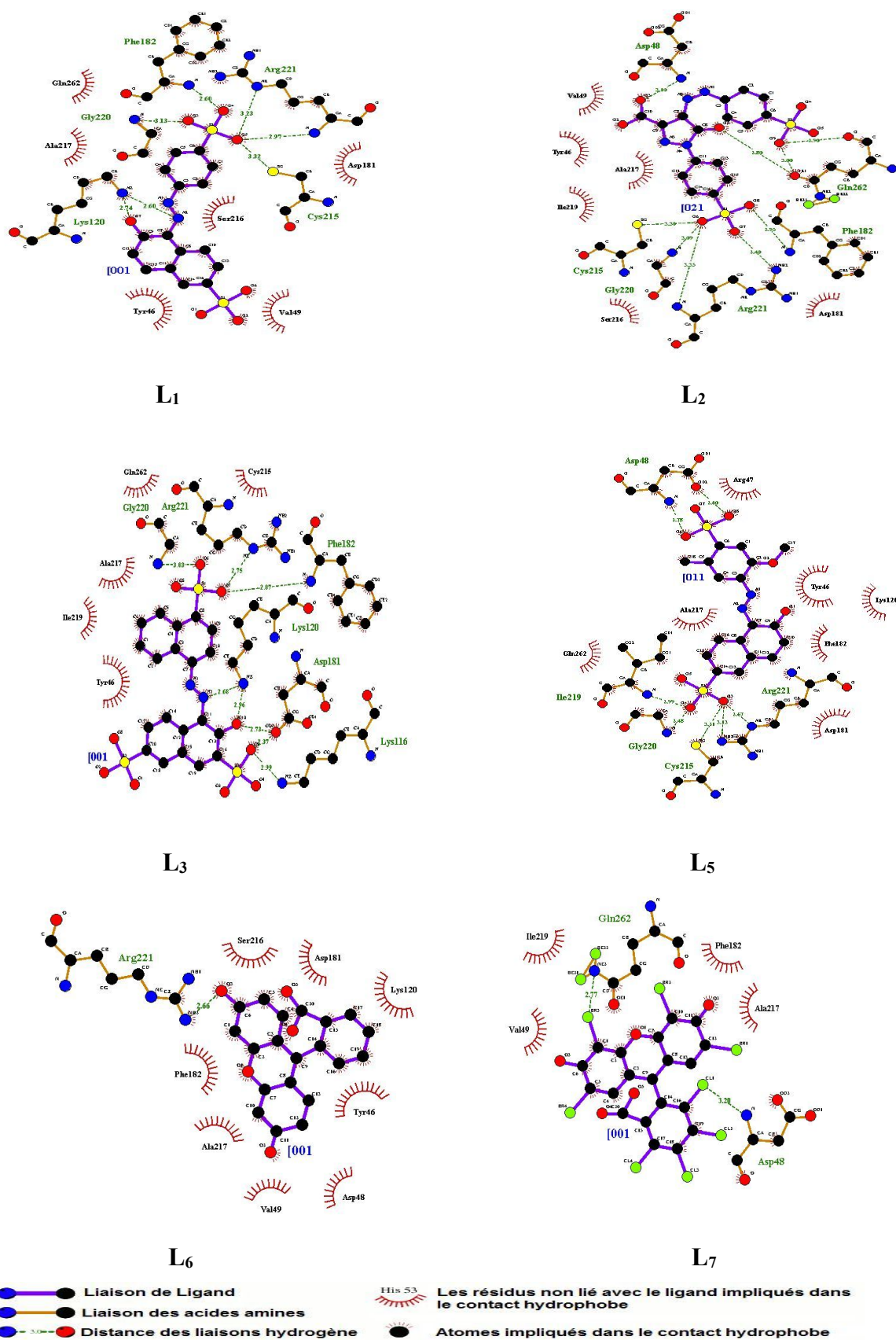


Figure 12 : Interactions entre les ligands (L₁, L₂, L₃, L₅, L₆, L₇) et les résidus de la cavité 1, basées sur le calcul de l'énergie Mol Dock (liaison d'hydrogène et hydrophobe), en utilisant le programme Ligplot+ [52].

Le calcul de l'énergie MolDock Score nous montre que les complexes formés par les ligands L₂ et L₆ ayant une énergie minimale, ceci explique que ces ligands sont introduit dans la cavité 1 et forment des interactions hydrogène et hydrophobes avec les résidus du site actif, et par la suite une meilleure fixation des ligands avec ces résidus (tableau 18, figure 12).

Le groupe carboxylique porté par le ligand L₆ forme une liaison hydrogène avec l'acide aminé Arg221 et pour L₂ il forme des liaisons hydrogènes avec les acides aminés suivant : Asp48, Gln262(3), Cys215, Gly220, Arg221(2) et Phe182.

D'autre par le L₆ forme des interactions hydrophobes avec les acides aminés suivant : Ser216, Asp181, Phe182, Ala217, Val49, Asp48, Tyr46 et Lys120 et le L₂ forme aussi des liaisons hydrophobes avec les acides aminés suivant : Val49, Tyr46, Ala217, Ile219, Ser216 et Asp181 (tableau 18 et figure 12).

Après un calcul de l'énergie MolDock Score des complexes (PTP1B-Ligands) dans la cavité 2, les résidus impliqués dans l'interaction E-S sont reportés dans le tableau19 et la figure13 suivants :

Tableau 19 : Liste des drésidus impliqués dans l'interaction E-S de type liaisons hydrogènes et hydrophobes dans la cavité 2.

Ligands	Liaisons Hydrogène ($\leq 3.6\text{\AA}$)	Interactions Hydrophobes
L ₁	Glu252, Asp245, Ser243, Arg238	Glu75, Glu76, Met74, Ala77, Leu234, Val249, Lys248, Val244
L ₂	Lys255, Ala77, Glu75	Lys248, Glu252, Glu76, Leu251, Phe256, Lys73, Met74
L ₃	Glu76, Glu75	Val249, Leu234, Met74, Gln78, Lys248, Glu252
L ₅	Glu76, Asp245	Phe256, Lys73, Met74, Glu75, Ala77, Thr230, Leu234, Lys248, Val244, Val249, Glu252
L ₆	Lys248	Ala77, Glu252, Glu75, Leu234, Met75, Thr230, Val249, Glu76
L ₇	Glu75, Ala77, Lys248	Glu252, Met74, Val249, Glu76

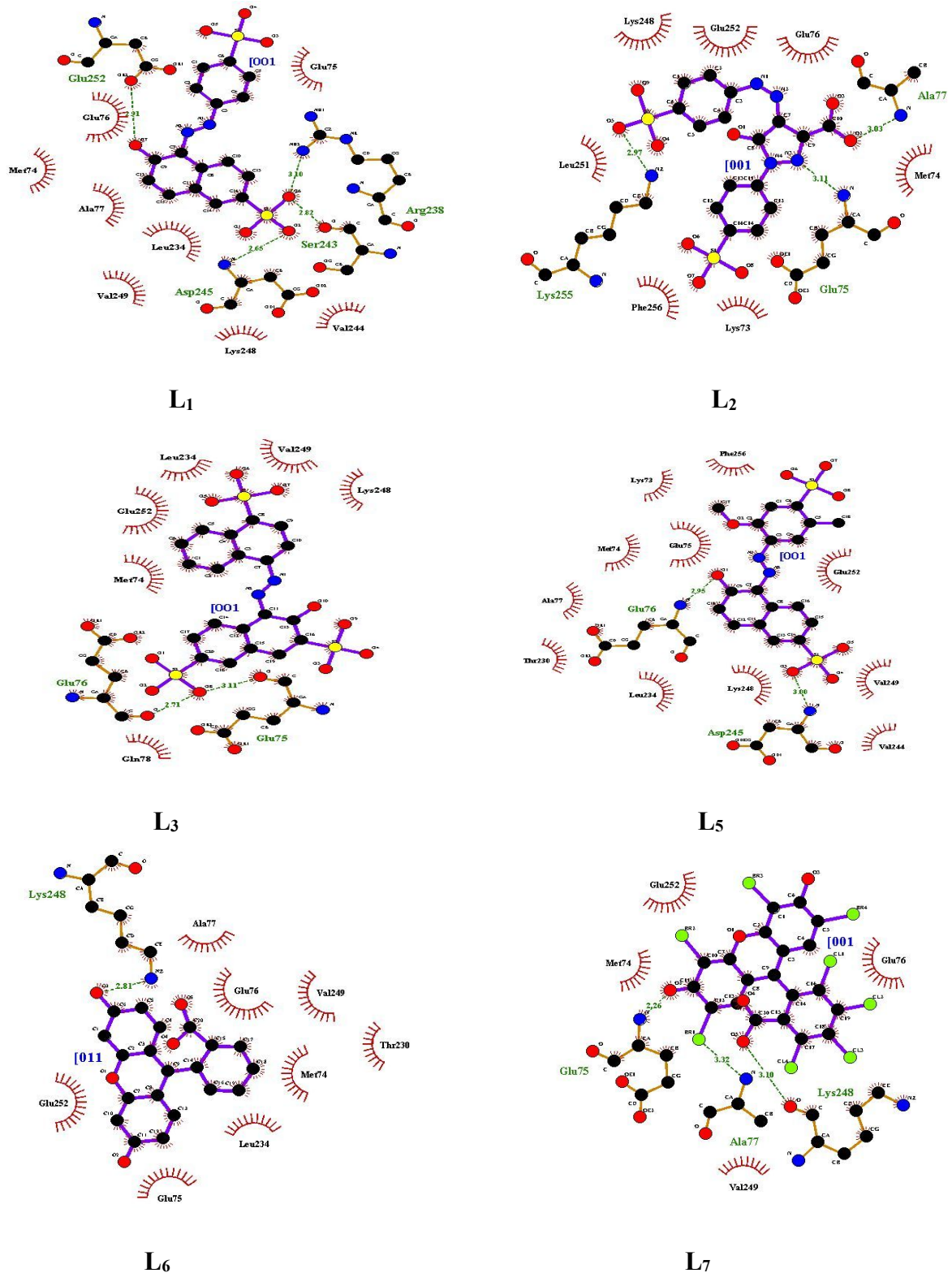


Figure 13 : Interactions entre les ligands (L₁, L₂, L₃, L₅, L₆, L₇) et les résidus de la cavité 2, basées sur le calcul de l'énergie Mol Dock (liaison d'hydrogène et hydrophobe), en utilisant le programme Ligplot+.

Le groupe carboxylique porté par le ligand L₆ forme une liaison hydrogène avec l'acide aminé Lys248, alors que L₂ il forme des liaisons hydrogène avec les acides aminés suivant : Lys255, Ala77 et Glu75. D'autre par le L₆ a des interactions hydrophobes avec les acides aminés suivant : Ala77, Glu252, Glu75, Leu234, Met75, Thr230, Val249 et Glu76 alors que L₂ présente des interactions hydrophobes avec les acides aminés suivant : Lys248, Glu252, Glu76, Leu251, Phe256, Lys73 et Met74 (tableau 19 et figure 13).

On donne les distances des liaisons entre les résidus du site actif et les ligands L₆, L₂, dans le tableau 20 suivant :

Tableau 20 : Distances entre les résidus du site actif et les deux ligands L₂ et L₆

Cavités	Cavité 1							Cavité 2			
	L ₆	L ₂						L ₆	L ₂		
Résidus	Arg221	Asp48	Glu262(3)	Cys215	Gly220	Arg221(2)	Phe182	Lys248	Lys255	Ala77	Glu75
Distances (Å)	2.66	2.10	3.00-2.90 2.80	3.30	3.09	3.35-2.40	2.95	2.81	2.97	3.03	3.11

D'après Anne Imberty et al, les interactions ayant des distances comprises entre 2.5Å et 3.1Å sont considérés comme fortes. Celles ayant des distances comprises entre 3.1Å et 3.55Å sont supposées moyennes. Quand leurs distances sont supérieures à 3.55Å, elles sont considérées faibles [53].

Dans le tableau 20 nous pouvons facilement constater que les distances entre les acides aminés et les ligands varient entre 3.35 et 2.10 Å, ceci montre qu'il ya une forte interaction entre ces acides aminés et les ligands L₂, L₆.

III.4. Conclusion

Cette étude est effectuée à l'aide de technique de docking moléculaire pour voir l'effet des ligands étudiés (colorants alimentaire) sur le PTP1B. Premièrement, on a optimisé les géométries de tous les ligands en utilisant la méthode DFT /B3LYP/6-31G(d), en suite, le calcul de l'énergie de MolDock score a été effectué pour former les complexes et identifier les interactions existantes, en fin nous constatons que les ligands L₂ et L₆ possédant les énergies les plus basses et par la suite ils sont les meilleurs inhibiteurs de PTP1B.

IV. Interaction de l'enzyme de la α -amylase avec les colorants alimentaires

IV.1. Détails des calculs

IV.1.1. Préparation et optimisation de l'enzyme de α -amylase

La structure de notre enzyme a été téléchargée a partir de la base de données Bookhaven Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) [45] (code d'accès : **1XV8**). Sachant que l' α -amylase [54] est cristallisée avec l'acide Pyroglutamique [PCA : 8 atomes].

La structure tridimensionnelle (3D) montre que l'enzyme est cristallisée sous la forme d'un dimère (deux chaînes A et B) (figure 14), chaque monomère est constitué de 7638 atomes, avec une résolution de 3.00 Å.

Parmi les avantages de la modélisation moléculaire, est de simplifier le modèle de l'enzyme, et dans ce cas nous pouvons retenir un seul monomère pour faire notre étude (figure 15). Ce monomère comporte les acides aminés formant le site actif. Aussi bien que, On a fait un nettoyage de la structure 3D de notre enzyme par élimination des molécules d'eau ainsi que tous les inhibiteurs qui

ont été utilisés au cours de la co-cristallisation.

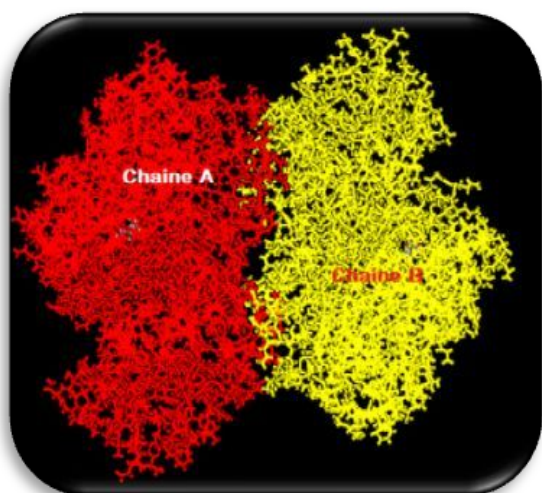


Figure 14 : La forme dimère (Chaines : A, B) de la α -amylase

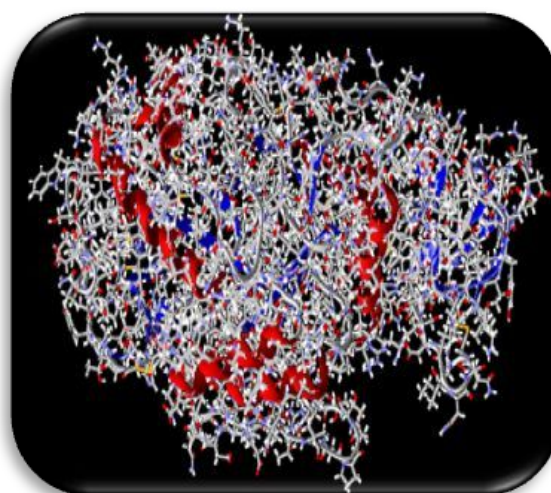
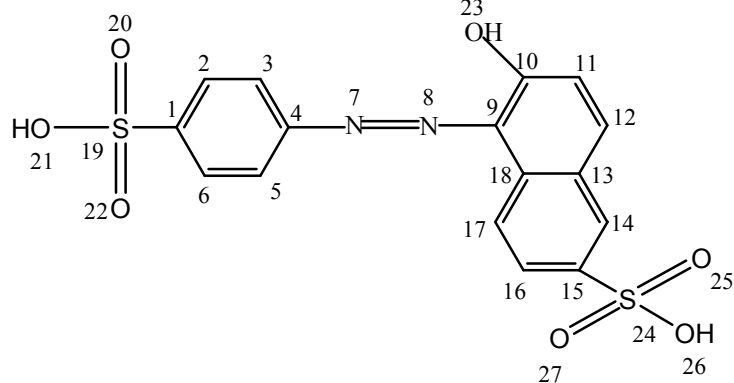


Figure 15 : Le modèle simplifié de la α -amylase

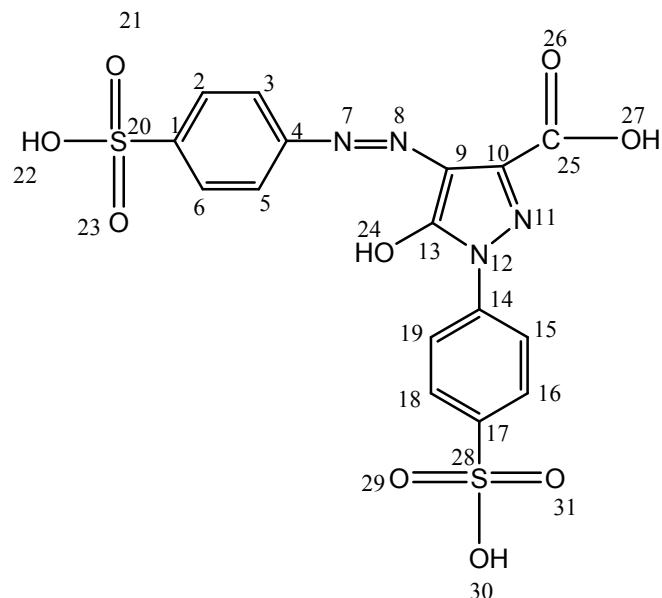
Plusieurs travaux sont effectués pour l'optimisation des enzymes à l'aide de la méthode de dynamique moléculaire. Pour l'optimisation de notre enzyme, α -amylase, on a basé sur l'optimisation de logiciel Molegro Virtual Docker (MVD) au cours de docking moléculaire.

IV.1.2. Préparation et optimisation des ligands

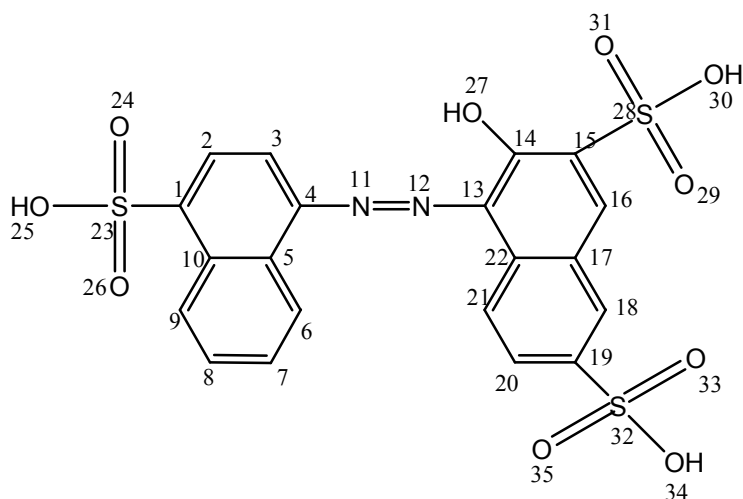
Les ligands sont des colorants alimentaires (L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_8), leurs structures sont représentées ci-dessous à l'aide du logiciel ChemOffice 07 [49]:



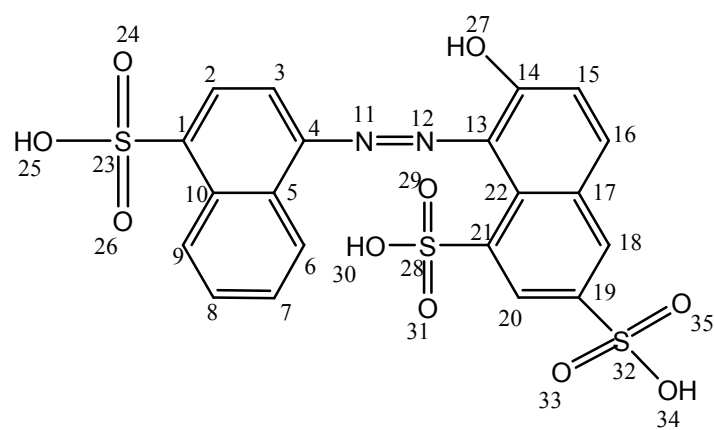
L₁



L₂

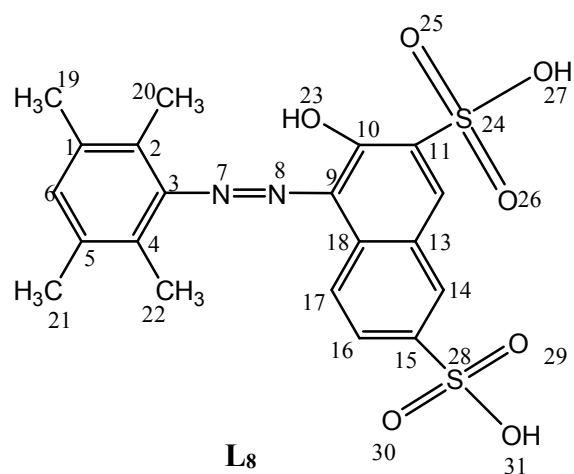


L₃



L₄

Figure 16 : Structures des ligands: L₁: Jaune Orangé S: (E110), L₂: Tartrazine, (E 102), L₃: Amarante (E123), L₄: Rouge Cochineal red A, (E 124), L₈ : Ponceau



L₈

L'optimisation et le calcul des fréquences de vibration de tous les ligands ont été effectués par le programme Gaussian 03, en utilisant la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité avec la fonctionnelle hybride B3LYP, ainsi que le jeu de fonctions de base 6-31G(d). Le calcul des fréquences est nécessaire pour la caractérisation de chaque point stationnaire en tant que minimum ou état de transition.

Nous avons utilisé le logiciel HyperChem 07 pour calculer le volume et la surface des ligands.

Les énergies des structures optimisées, le volume et surface des ligands L₁, L₂, L₃, L₄ et L₈ sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Energies, volume et surface des ligands

Ligands	Energies (kcal/mol)	Volume Å ³	Surface Å ²
L ₁	-156.351	1018.09	619.10
L ₂	-159.076	1160.52	705.05
L ₃	-257.471	966.20	580.94
L ₄	-251.823	1166.72	656.32
L ₈	-188.381	1179.94	679.56

L'énergie DFT des cinq structures des ligands est classée dans l'ordre suivant :

$$E_{L_1} > E_{L_2} > E_{L_8} > E_{L_4} > E_{L_3}$$

IV.2. Docking moléculaire

Les étapes de calcul et le choix de logiciel utilisés ont été mentionnés dans les paragraphes III.2.1 et III.2.2.

IV.3. Résultats de docking moléculaire

IV.3.1. Interaction : α -amylase-Ligands

Après élimination des molécules d'eau, ainsi que tous les inhibiteurs qui ont été utilisés au cours de la co-cristallisation et à l'aide de MVD nous avons fait la détection des cavités de la α -amylase.

Le volume et la surface des cavités détectées sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 22 : Propriétés des cavités détectées.

Cavités	Volume (\AA^3)	Surface (\AA^2)
Cavité 1	141.312	411.84
Cavité 2	42.496	170.24
Cavité 3	34.304	142.08
Cavité 4	32.256	154.92
Cavité 5	24.064	92.16

L'absence des données expérimentales concernant les acides aminés de site actif nous a obligé de choisir les deux cavités 1 et 2 parce que l'une possède le ligand qui co-cristallisé et l'autre a un volume important (Figure 17).

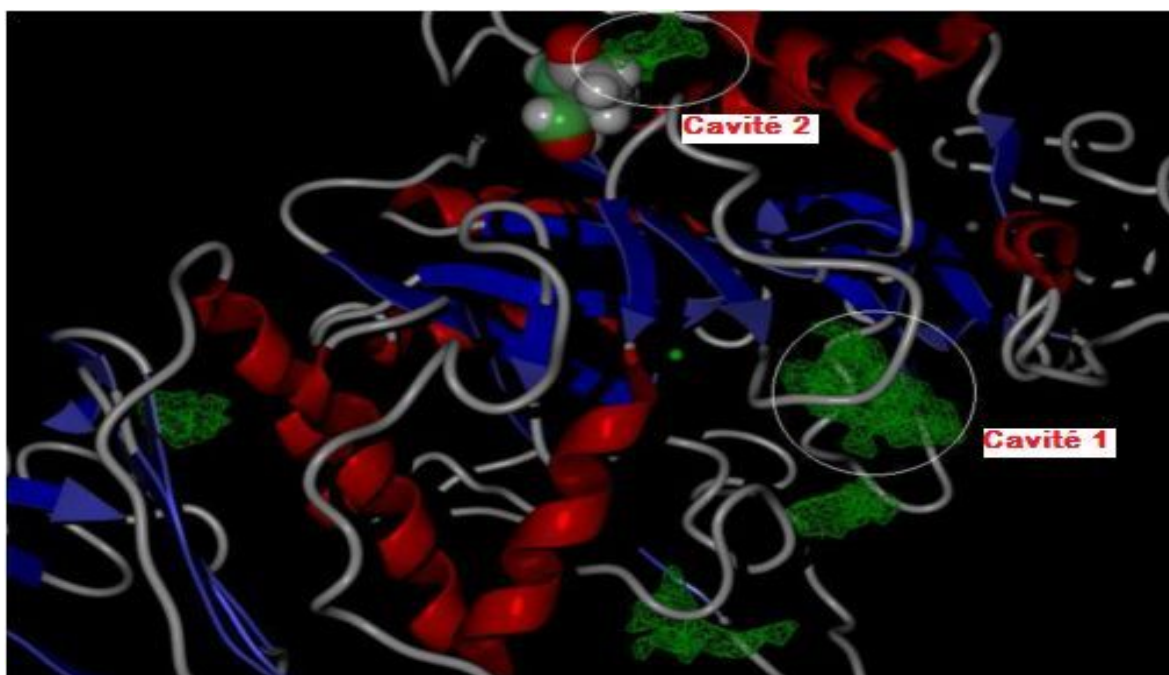


Figure 17 : Illustration graphique des cavités 1 et 2 caractérisées par une ellipse identifiée par MolDock.

IV.3.2. Energie d'interaction:

IV.3.2.1. Interaction des ligands seuls avec l' α -amylase dans les deux cavité

La fixation des ligands dans le site actif de α -amylase (formation des complexes) a été exécutée à l'aide du programme MolDock implémenté dans le logiciel Molegro Virtual Docker (MVD).

Le tableau 23 regroupe les énergies d'interactions entre la α -amylase et les ligands dans les deux cavités :

Tableau 23 : Résultats de docking moléculaire des Ligands L₁, L₂, L₃, L₄ et L₈ avec le site actif de la α-amylase dans les deux cavités.

	Cavité 1			Cavité 2		
	MolDockScore ^a	Interaction ^b	liaisons-H	MolDock Score	Interaction	liaisons-H
L ₁	-103.239	-116.030	-5.585	-126.009	-137.292	-7.410
L ₂	-140.226	-146.618	-15.272	-142.101	-151.698	-10.231
L ₃	-117.944	-134.071	-3.235	-148.422	-161.116	-10.878
L ₄	-125.352	-129.437	-3.030	-137.174	-153.394	-7.089
L ₈	-115.227	-127.464	-5.234	-120.863	-132.882	-4.373

^a MolDock Score calculé par la somme d'interaction externe et interne de ligand (interaction protéine-ligand) en utilisant le Viewer moléculaire virtuelle 1.2.0.

^b Energie d'interaction totale entre la pose et les molécules cibles (s)

Les résultats obtenus montrent que tous les ligands ont des interactions avec le α-amylases au niveau des deux cavités.

En se basant essentiellement sur la comparaison entre les énergies obtenues à l'aide de Mol Dock Score, il ressort la classification suivante :

Cavité 1:

$$E_{L_1} > E_{L_8} > E_{L_3} > E_{L_4} > E_{L_2}$$

Cavité 2:

$$E_{L_8} > E_{L_1} > E_{L_4} > E_{L_2} > E_{L_3}$$

Nous remarquons que le complexe formé par le ligand L₂ dans la cavité 1 possède l'énergie la plus basse par rapport aux autres complexes, par contre on note que dans la cavité 2 le complexe de ligand L₃ a une énergie plus basse par

rapport aux autres.

Les différentes interactions entre les acides aminés formant les deux cavités 1 et 2 avec le tartrazine (L_2) sont schématisées dans la figure suivante :

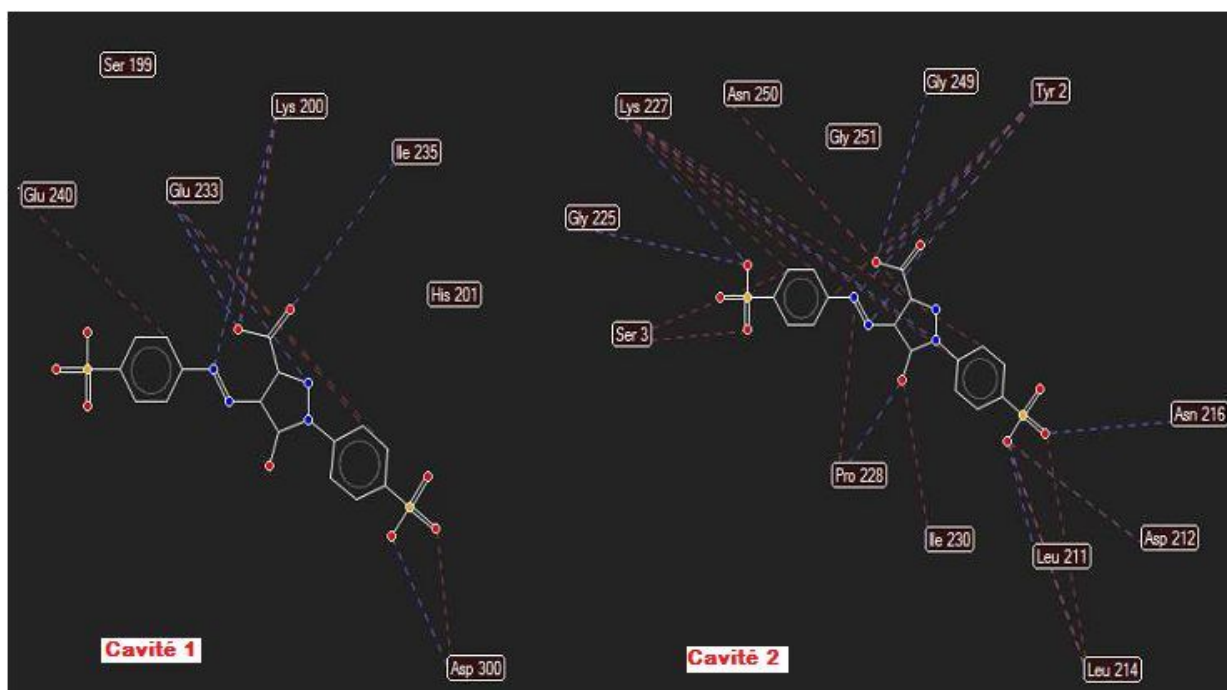


Figure 18 : Interactions entre le tartrazine seul et les résidus dans les deux cavités (-----: Interactions des liaisons Hydrogène, -----: Interactions stériques).

On constate que les interactions misent en jeu entre les résidus du site actif et le L_2 (tartrazine) permettent la formation d'un complexe stable. Les distances mesurées entre L_2 et ces acides aminés sont cités dans le tableau ci-dessous :

Tableau 24 : Distances entre les résidus du site actif et la tartrazine

Atomes	OH ₂₂			O ₂₁	OH ₃₀		N ₇ =N ₈	OH ₂₇		OH ₂₄	N ₁₁
Residus	Asp212	Leu211	Leu214	Asn216	Gly225	Ser226	Tyr2	Tyr2	Gly249	Lys227	Pro228
Distances (Å)	2.57	3.04	2.88	3.39	2.96	3.06	2.65 2.77	2.77	3.03	3.44	2.41

Les distances entre les résidus du site actif et le L_2 varient entre 2.57Å et 3.44Å, dans ce cas on peut remarquer que la plus part des distances appartiennent à l'intervalle compris entre 2.5Å et 3.1Å, et par conséquent ce sont des interactions fortes [53] qui stabilisent le complexe formé par la tartrazine (L_2).

La formation d'un complexe stable dépend de la fixation du ligand dans le site active. La figure 19 présenté ci-dessous montre que le ligand L_2 (tartrazine) prend la forme de la cavité 1 formé par les résidus du site actif, ce qui signifie qu'il y a des interactions qui stabilisent le complexe et par la suite, une meilleure fixation de ce ligand au niveau du site actif.

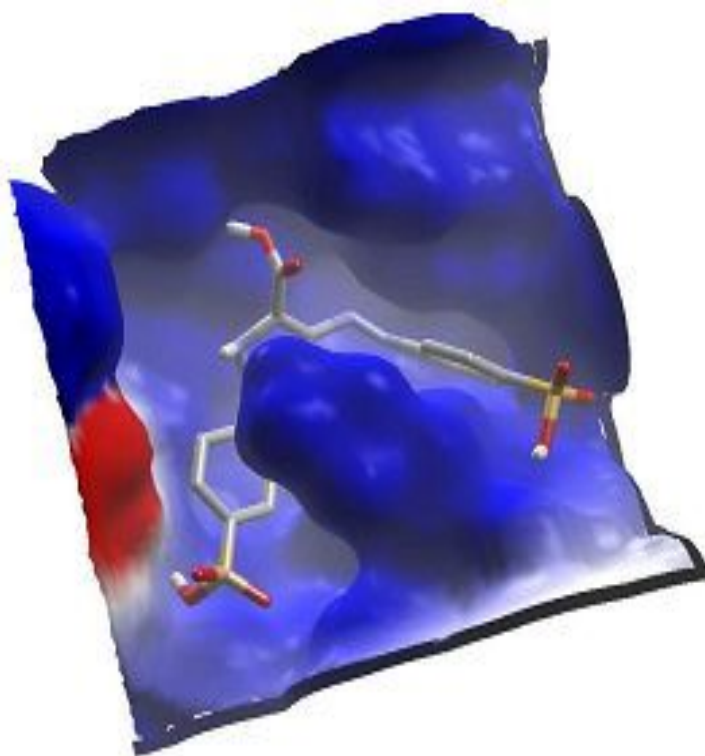


Figure 19 : Fixation de la tartrazine au niveau du site actif

En conclusion, dans la cavité 1, le complexe formé par la tartrazine (L₂) possède la plus faible énergie par rapport aux autres ligands, il lui sera attribué une affinité élevée avec les résidus de site actif et par conséquent, il est probablement le meilleur ligand pour inhiber le fonctionnement de l'enzyme α -amylases.

IV.3.2.2. Interaction des ligands seuls et complexés avec la α -amylase dans la cavité 2

L'étude des interactions entre les ligands seuls (L₁, L₂, L₃, L₄ et L₈) et l'enzyme de α -amylase par le docking moléculaire prouvent que le ligand L₂ (tartrazine) forme un complexe a une énergie plus basse que les autres dans la cavité 1 et le complexe de L₃ (Amarante) possède une énergie plus basse que les autres dans la cavité 2.

Notons ici qu'on a complété cette étude par une comparaison entre les complexes formés par les ligands seuls (α -amylase-Ligands) et des complexes formés par les ligands qui ont été déjà complexé avec l'ion de cuivre (α -amylase-LigandsCu) [55].

Dans la figure suivante nous donnons une représentation graphique qui nous aide à faire une comparaison entre les énergies des complexes formés [(E-L) et (E-LCu)] au cours de docking moléculaire.

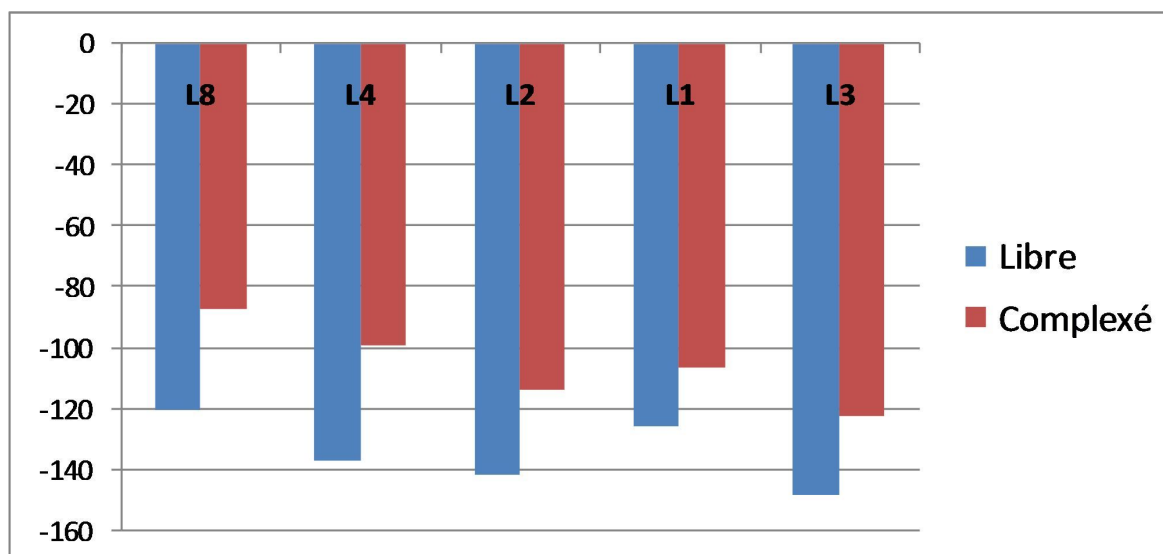


Figure 20 : Représentation Graphique des énergies de Mol Dock Score dans les deux cas de ligands, libres et complexés avec la α -amylase dans la cavité 2.

D'après les résultats obtenus lors du Docking moléculaire, il est noté que les énergies de tous les complexes formés par des ligands complexés avec l'ion cuivre et les acides aminés de cavité 2 varient entre -87.564 et -122.503 KJ/mol.

Les ligands L_2 (tartrazine) et L_3 (l'Amarante) complexés avec le cuivre se fixent dans la cavité 2 par des différents types d'interactions pour former un complexe stable, les valeurs des énergies prouvent que les ligands L_2 et L_3 forment des complexes possédant les plus basses énergies par rapport aux autres (dans les deux cas ligands seuls ou complexés), par conséquent, ils seront probablement les meilleurs ligands pour inhiber le fonctionnement de l'enzyme de l' α -amylases.

Les interactions entre le L_3 (l'Amarante) seul et complexé (avec le cuivre) avec les acides aminés qui interviennent dans la formation du site actif de la cavité 2 sont représentées dans la figure 21.

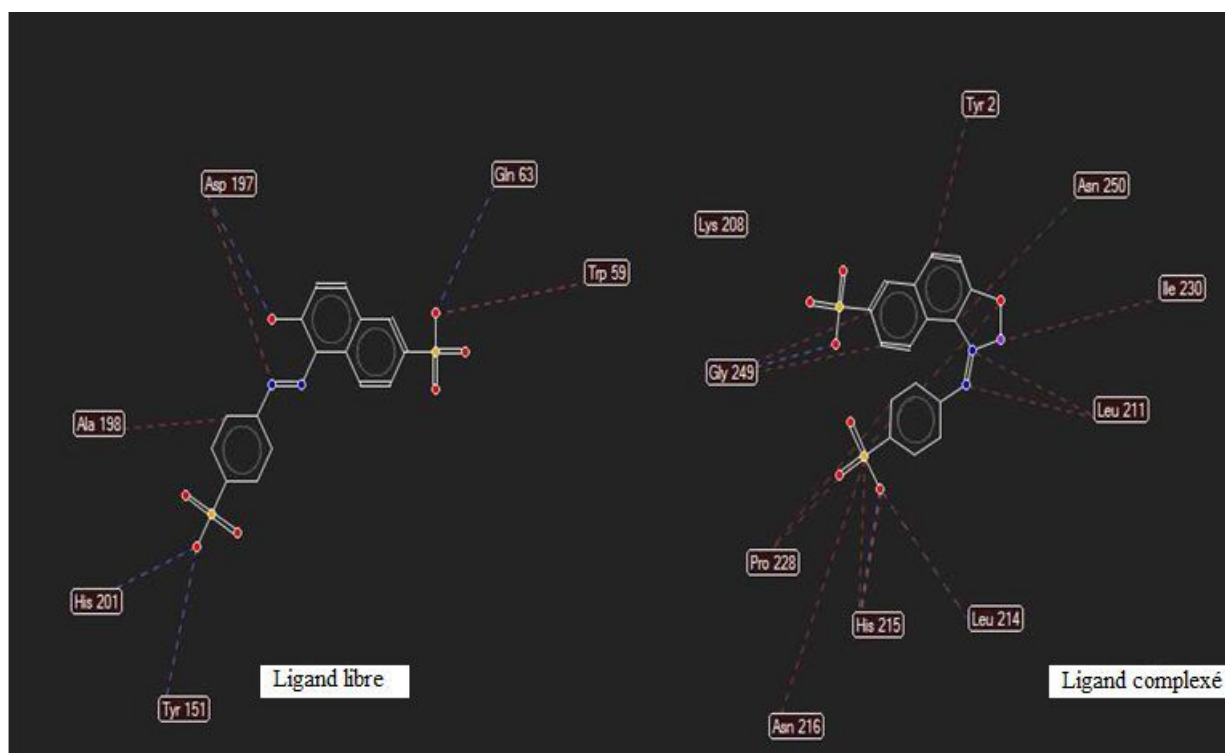


Figure 21 : Interactions entre le Jaune Orangé S seul et complexé avec les résidus de la cavité 2 (----- : Interactions des liaisons Hydrogène, - - - - - : Interactions stériques)

IV.4. Conclusion

Dans cette étude deux étapes sont effectuées. En premier lieu, nous avons étudié l'effet des ligands seuls (Colorant alimentaires) sur le fonctionnement de α -amylase en se basant sur le calcul de docking moléculaire. En deuxième lieu, on a complexé les mêmes ligands avec le cuivre (Cu^{+2}) et voir leurs effet sur la même enzyme.

Le calcul de docking moléculaire (Energie de MolDock, les Distances) nous informe que dans la cavité 1, le complexe formé par le ligand L_2 possède la plus basse énergie par rapport aux autres, Ainsi que, le complexe formé par le ligand L_3 dans la cavité 2 a une énergie plus basse par rapport aux autres, et par la suite, ils

ont un grand effet sur le fonctionnement de l' α -amylase. Dans la deuxième partie, les valeurs calculées des énergies dans la cavité 2 prouvent que le ligand L₃ forment un complexe qui possède la plus basse énergie par rapport aux autre (dans les deux cas ligands seuls ou complexés), par conséquent, le L₃ est le meilleur ligand pour inhiber le fonctionnement de l'enzyme α -amylases.

V. Références

- [1] M.A. Blaskovich, H.O. Kim:” Recent discovery and development of protein tyrosine phosphatase inhibitors”, *Exp Opin Ther Pat.*, **2002**, 12(6), 871–905.
- [2] J.J. Zakowski, D.E. Bruns:” Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes”. *Crit Rev Clin Lab Sci.*,**1985**, 21, 283–322.
- [3] H.A. Carlson., J.A. McCammon:” Accommodating protein flexibility in computational drug design”, *Molec Pharm*, **2000**, 57(2), 213–218.
- [4] H.A. Carlson:” Protein flexibility and drug design: How to hit a moving target”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6(4), 447–452.
- [5] H.A. Carlson:” Protein flexibility is an important component of structure based drug discovery”, *Curr. Pharm. Des.*, **2002**, 8, 1571–1578.
- [6] S.J. Teague:” Implications of protein flexibility for drug discovery”, *Nature rev. drug Discov.* **2003**, 2(7), 527–541.
- [7] J.J.P. Stewart:” Optimization of parameters for semi-empirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements”, *J Mol Model*, **2007**, 13, 1173–213.
- [8] J.K. Labanowski, J.W. Andzelm:” Density functional methods in chemistry”, New York: editors. Springer Verlag, **1991**.
- [9] W.J. Hehre, L. Radom, P.V.R. Schleyer, J.A. Pople:” Ab initio molecular orbital theory”, New York: Wiley, **1986**.
- [10] P.C. Hariharan, J.A. Pople:” The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies”, *Theor Chim Acta.*, **1973**, 28, 213–22.
- [11] A.D. Becke:” Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior”, *Phys Rev A.*,**1988**, 38, 3098–3100.
- [12] A.D. Becke:” A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories”, *J Chem Phys.*,**1993**, 98, 1372–7.
- [13] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr:” Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density”, *PhysRevB.*, **1988**, 37, 785–9.

- [14] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel et al. Gaussian 03, Revision D.01. Wallingford, CT: Gaussian, Inc, **2004**.
- [15] J. Li, H. Li, M. Jakobsson, S. Sjödin, P. Li, M. Lascoux:“ Joint analysis of demography and selection in population genetics: where do we stand and where could we go? “, *Mol Ecol.*, **2012**, 21(1), 28–44.
- [16] K. Yamamoto, T. Irimura, T. Osawa:“ Biochemistry of lectins and their applications in immunochemistry and cellular biology “, *J Bio chem.*,**2011**, 150(5), 477–482.
- [17] X. Zhao, Y. Wang, Q. Chen, M. Zhang, N. Zhao; *Comput Mater Sci.*, **2012**, 54, 119.
- [18] A. Lakshmi, V. Balachandran, A. Janaki:“ Comparative vibrational spectroscopic studies, HOMO-LUMO and NBO analysis of 5,7 dibromo-8-hydroxyquinoline and 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline based on Density Functional Theory “, *J Mol Struct.*,**2011**, 1005, 51–66.
- [19] B. Blaive, G. Legsei, R. Lai, *J Mol Struct.*, **1995**, 345, 245–250.
- [20] A. Zinelabendine A. Bouaraoui Fathallah, M.F.M. Henni, B. Blaive, R. Gallo:” Molecular mechanics modelling of siderophores”, *J Mol Struct.*, **1993**, 286, 267–274.
- [21] J.P. Doucet, J. Weber:“ Computer-Aided Molecular Design: Theory and Applications”, ISBN: 0122212851, Pub. Date: January Publisher: Elsevier Science & Technology Books, **1996**.
- [22] A. Terbouche, S. Djebbar, O. Benali-Baitich, M. Khan, G. Bouet :“ Stability and molecular modelling of cobalt(II) and nickel(II) with polydentate schiff base” , *Revue Roumaine de Chimie.*,**2008**, 53(2), 101–106.
- [23] N. Khebichat S. Ghalem:“ Theoretical study of dipeptide complexes of copper(II)” , *Journal of Molecular Structure.*, **2006**, 777, 107–111.
- [24] Z. Li, H.A. Scheraga:“ Monte Carlo-minimization approach to the multiple-minima problem in protein folding”. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **1987**, 84(19), 6611–6615.
- [25] D. Robert, S. Parra, C. Pulgarin, A. Krzton, J.V. Weber:“ Chemisorption of phenols and acids on TiO₂ surface”, *Appl. Surf. Sci.*, **2000**, 167(1), 51–58.

- [26] C. Guillard, H. Lachheb, A. Houas, M. Ksibi, E. Elaloui, J.M. Herrmann: "Influence of Chemical Structure of Dyes, of pH and of Inorganic Salts on Their Photocatalytic Degradation by TiO₂ Comparison of the Efficiency of Powder and Supported TiO₂", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2003**, 158, 27–36.
- [27] I. Fleming: "Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions", (John Wiley & Sons, New York, 1976.
- [28] L.R. Domingo, E. Chamorro, P. Pèrez: "Understanding the reactivity of captodative ethylenes in polar cycloaddition reactions. A theoretical study", *J Org Chem.*, **2008**, 73, 4615–4624.
- [29] P. Jaramillo, L.R. Domingo, E. Chamorro, P. Pèrez: "A further exploration of a nucleophilicity index based on the gas-phase ionization potentials", *J Mol Struct (Theochem)*, **2008**, 865, 68–72.
- [30] P. Pèrez, L.R. Domingo, M. Duque-Noreña, E. Chamorro: "A Condensed-to-Atom Nucleophilicity Index. An Application to the Director Effects on the Electrophilic Aromatic Substitutions", *J Mol Struct (Theochem)*., **2009**, 895, 86–91.
- [31] R.K. Roy, S. Pal, K. Hirao: "On non-negativity of Fukui function indices", *J Chem Phys.*, **1999**, 110, 8236–8245.
- [32] L. Szabo, K. Herman, N.E. Mircescu et al: "SERS and DFT investigation of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and its metal complexes with Al(III), Mn(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II) and Pb(II)", *Spectrochimica Acta Part A.*, **2012**, 93, 266–273.
- [33] A. Morsali, M.Y. Masoomi: "Structures and properties of mercury(II) coordination polymers", *Coord, Chem, Rev.*, **2009**, 253(13), 1882-1905.
- [34] V.J. Burton., et R.J. Deeth., "Molecular Modeling For Copper(II) Centers". *J. Chem.Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 573-574.
- [35] R.J. Deeth et Gerlach: "Stereochemical activity of d shells in trigonal-bipyramidal complexes of the first transition series", *Inorg.Chem.*, **1985**, 24, 4490–4493.
- [36] M. Zimmer et P. Comba : » Molecular mechanics and the Jahn-Teller effect » *Inorganig.Chem.*, **1994**, 33, 5368-5369.
- [37] A.P. Souza, R.F. Gerlach, S.R.P. Line: "Inhibition of human gelatinases by

metals released from dental amalgam”, *Biomaterials.*, **2001**, 22(14), 2025–2030.

[38] M. Pizzichini, M. Fonzi, L. Sugherini, L. Fonzi, A. Gasparoni, M. Comporti A. Pompella:“ Release of mercury from dental amalgam and its influence on salivary antioxidant activity “, =*Science of The Total Environment.*,**2002**, 284(1–3), 19–25.

[39] T. Okabe, B. Elvebak, L. Carrasco, J.L, Ferracane, R.G. Keanini, H. Nakajima:“ Mercury release from dental amalgams into continuously replenished liquids “, *Dental Materials.*, **2003**, 19(1), 38–45.

[40] J. Mutter, J. Naumann, C. Sadaghiani, H. Walach, G. Drasch:“ Amalgam studies: Disregarding basic principles of mercury toxicity“,*International Journal of Hygiene and Environmental Health.*, **2004**, 207(4), 391–397.

[41] S.K. Al-Salehi, P.V. Hatton, C.A. Miller, C. Mcleod, A. Joiner:“ The effect of carbamide peroxide treatment on metal ion release from dental amalgam“, *Dental Materials.*, **2006**, 22(10), 948–953.

[42] Y. Xibiao, Q. Haojun, X. Peicheng, Z. Lin, P. Matthew, H.F. Longnecker:“ Nephrotoxicity, neurotoxicity, and mercury exposure among children with and without dental amalgam fillings“, *International Journal of Hygieneand Environmental Health.*,**2009**, 212(4), 378–386.

[43] G.M. Richardson, R. Wilson, D. Allard, C. Purtill, S. Douma, J. Gravière:“ Mercury exposure and risks from dental amalgam in the US population, post-2000“, *Science of the Total Environment.*, **2011**, 409(20), 4257–4268.

[44] M.N. Bates:“ Dental Amalgam Fillings: A Source of Mercury Exposure “, *Encyclopedia of Environmental Health.*, **2011**, 2, 11–20.

[45] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I. Shindyalov and P.E. Bourne:” The Protein Data Bank”, *Nucleic.Acids.Res* ; **2000**. 28(1), 235–242.

[46] M.R. Groves, Z.J. Yao, P.P. Roller, J.T.R. Burke. and D. Barford:” Structural basis for inhibition of the protein tyrosine phosphatase 1B by phosphotyrosine peptide mimetics”, *Biochemistry*; **1998**, 37(51), 17773–17783.

[47] R. Thomsen, M.H. Christensen:“ MolDock: A New Technique for

- High-Accuracy Molecular Docking”, *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 3315–3321.
- [48] F. F. da. Elaine, F. B. Edilaine, A. O. Aline, C. R. Teodorico:” Molecular Modeling of Mycobacterium Tuberculosis DNA Gyrase and its Molecular Docking Study with Gatifloxacin Inhibitors”, *J. Biom. Struct Dyn.*, **2010**, 27, 619–625.
- [49] R.E Buntrock . ChemOffice Ultra 7.0. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, 42(6), 1505–6.
- [50] Hyperchem7.0, Hypercube Inc.
- [51] B. Florent, Cours on line:” le docking moléculaire”, Université de Paris7, ITODYS (CNRS UMR 7086). **2014**.
- [52] R.A. Laskowski, M.B. Swindells:” LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery”, *J. Chem. Inf. Model.* 2011, 51(10), 2778–2786.
- [53] A. Imberty, K. D. Hardman, J.P. Carver, S. Pérez:” Molecular of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavaline A”, *Glycobiology*, **1991**, 1, 631–642.
- [54] S.Z. Fisher, L. Govindasamy, C. Tu, M. Agbandje-McKenna, D.N. Silverman, H.J. Rajaniemi, R. McKenna:” Structure of human salivary alpha-amylase crystallized in a C-centered monoclinic space group”, *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **2006**, 62(Pt2), 88–93.
- [55] T.S. Banerjee, B.R. Roy, B. Majee:” Interaction of copper ion with some food dyes”, *J. Sci. Fd. Agric.*, **1977**, 28, 405–414.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Notre intérêt a été porté sur les interactions entre les colorants et les ions métalliques libérés par les amalgames dentaires, ainsi que, leurs effets sur le fonctionnement des enzymes (cas des inhibitions).

Dans ce travail, nous avons utilisé des approches théoriques permettant la prédiction des interactions entre ligand-enzyme ou ligand-ion métallique.

Ces approches théoriques sont complémentaires, des expériences *in vitro* et *in vivo*. Elles donnent un éclairage sur les interactions au niveau moléculaire et sont, de ce fait, le socle à partir duquel une conception ou une optimisation rationnelle de molécules actives, tenant compte des critères structuraux.

Les approches théoriques et expérimentales sont cruciales pour une évolution optimale des connaissances en Chimie, Biologie, Pharmacie et en Médecine.

Pour mener notre étude théorique, nous avons dans un premier temps utilisé :

La mécanique quantique : A l'aide du programme Gaussian 03. En utilisant les méthodes de la mécanique quantique : L'optimisation et le calcul des fréquences de vibration des ligands (**L₁-L₈**) a été effectué par la théorie de la fonctionnelle de densité (Density Functional Theory), la fonctionnelle hybride B3LYP avec la base 6-31G*.

L'optimisation complète et le calcul des fréquences de vibration nous ont permis d'obtenir des structures stables qui nous donnent les paramètres structuraux et électroniques.

Les paramètres électroniques (les indices de Fukui f_k^- , les indices de nucléophilie locale N_k , les énergies HOMO, LUMO, le gap énergétique, la distribution des charges de Mulliken, le moment dipolaire et l'énergie d'ionisation ainsi que l'énergie DFT), pour prédire les sites d'attaques nucléophiles et électrophiles.

Les sites N_1 et O_3 sont les plus favorables pour l'attaque électrophile de tous les colorants azoïques.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la mécanique moléculaire où le programme EMO a été utilisé pour calculer les énergies stériques des complexes.

Les paramètres géométriques et électroniques montrent que les meilleurs complexes formés ligand-métal sont ceux du mercure (Hg).

Selon les résultats obtenus, notre étude prouve que tous les complexes formés sont favorables et plus stables par rapport au cuivre, ceux-ci prouvent que l'intoxication de mercure est plus rapide que celle du cuivre, sachant que le mercure est toxique même avec des faibles doses.

En outre, le ligand L_1 est le meilleur parmi les autres car il donne lieu à un complexe avec une énergie minimale.

Pour cela il est conseillé pour les sujets portant des amalgames dentaires d'éviter de consommer la nourriture et les médicaments contenant les colorants azoïques car il existe une tendance élevée à former des complexes entre les colorants azoïques et les ions métalliques qui sont libérés par les amalgames dentaires. Nous nous sommes également intéressés au docking moléculaire où le programme Molegro basé sur le calcul de l'énergie

de Mol Dock Score des complexes E-S. L'analyse par docking moléculaire dans notre étude permet la recherche des ligands à un potentiel élevé.

La première partie est dédiée à l'étude des interactions entre les ligands (L_1 , L_2 , L_3 , L_5 , L_6 , L_7) et l'enzyme Tyrosine Phosphatase (PTP1B). Les résultats obtenus montre que les ligands L_2 (tartrazine) et L_6 (Erythrosine B) parmi les six étudiés, se fixent dans les cavités 1 et 2, ayant les potentiels les plus élevés, et ils ont une meilleure inhibition d'activité de la PTP1B (Tyrosine Phosphatase) confirmé par le calcul d'énergie de Mol Dock.

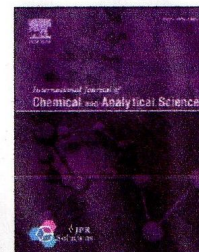
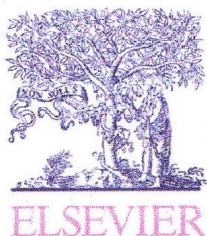
L_2 et L_6 montrent l'existence de forte interactions avec les résidus du site actif identifié, ces résidus sont importants pour l'activité catalytique de la PTP1B.

Dans la seconde partie, l'étude est basée sur le calcul des énergies de Mol Dock Score et les distances des liaisons pour expliquer la fixation des ligands (L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_8) seuls, et aussi les complexes de Cu^{+2} dans la cavité de α -amylase.

Dans le cas des ligands seuls, les calculs montrent que dans la cavité 1, le complexe formé par le L_2 (tartrazine) possède la plus faible énergie par rapport aux autres complexes, il lui sera attribué une affinité élevée avec les résidus du site actif et par conséquent, il est probablement le meilleur ligand pour inhiber le fonctionnement de l'enzyme α -amylase.

Dans le deuxième cas (Ligands complexés avec le Cu^{+2}) les ligands L_2 (tartrazine) et L_3 (l'Amarante) complexés avec le cuivre se fixent dans la cavité 2 par des différents types d'interactions pour former un complexe stable, les valeurs des énergies prouvent que les ligands L_2 et L_3 forment des complexes possédant les plus basses énergies par rapport aux autres, par conséquent seront probablement les meilleurs ligands pour inhiber le fonctionnement de l'enzyme de l' α -amylase.

Annexes



Original Article

MM/QM study: Interactions of copper(II) and mercury(II) with food dyes in aqueous solutions



Ismail Daoud*, Mourad Mesmoudi, Said Ghalem

Laboratory of Natural Products and Bio actives – LASNABIO, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Aboubekr Belkaid University, BP 119, 13000 Tlemcen, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2012

Accepted 16 April 2013

Available online 2 June 2013

Keywords:

Azo dyes

Conceptual DFT

Heavy metals

Interactions

Molecular mechanics

ABSTRACT

Aim: In this work we studied four azo dyes which are proposed for synthetic colorants in foods applications and named L₁: Sunset Yellow, E110, L₂: Tartrazin, E102, L₃: Amaranth, E123, L₄: Red Ponceau 4R, E124. In addition, electron density analysis has been carried out to highlight the possible strengths of interaction of these four azo dyes with metal ions.

Materials and methods: Density Functional Theory (DFT) was utilized, using the B3LYP functional and the 6-31G(d) basis set. This level of calculation was used to find the optimized molecular structure and to predict the molecular orbitals energies, dipole moment, Fukui function values f^-, k , locals nucleophilicity indexes N_k and the chemical reactivity parameters that arise from Conceptual DFT. Also, the steric energies values from the four complexes were calculated with the EMO program using MM2 method.

Results: Complexes forms with mercury are easier to form and more stable than copper. These show that the mercury intoxication is faster than the copper, knowing that mercury is toxic even with low dose. For that, the men who carry amalgams, we advise may be avoid to eat food and drugs which contain azo dyes because there exists a high trend between these azo dyes and the metal ions which released by the amalgams.

Copyright © 2013, JPR Solutions; Published by Reed Elsevier India Pvt. Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Food colors play a vital role in today's bountiful and nutritious food supply.¹ By the early 1995, natural and synthetic color additives were used extensively to color foods, drugs and cosmetics.² Color is an important characteristic and selection criterion for food choice, recent studies have high-lighted this importance and have shown how selection may change among certain, populations, and over time.³ Colorant plays a significant role in enhancing the artistic appeals of foods that are aesthetically pleasing

more likely to be consumed and to contribute to a varied diet.²

Synthetic colorants are a very important class of food additives. They are widely used to compensate for the loss of natural colors of food and the way to improve the esthetic quality of a food product, which are destroyed during processing and storage, and to provide the desired colored appearance. The total world colorant production is estimated to be 80,00,000 tons per year.⁴ However, some of these substances pose a potential risk to human health, especially if they are excessively consumed. For this reason, safety data, such as the acceptable daily intake,

* Corresponding author. Tel./fax: +213 778834763.

E-mail address: daoud.ismail@yahoo.fr (I. Daoud).

based on toxicological studies on experimental animals and human clinical studies, have been repeatedly determined and evaluated by Food and Agricultural Organization (FAO) and World Health Organization (WHO).⁵ They are divided into five major colorant classes: the azo compounds (such as amaranth and tartrazine...), the chinophthalon derivatives of quinoline yellow, the triarylmethane group, xanthenes (such as erythro-sine) and the indigo colorants.⁶ The azo dyes are one of the most important classes widely used in food products, they account for the majority of all dyestuffs, produced because they are extensively used in the textile, paper, food colorants, leather, cosmetics and pharmaceutical industries.⁷ They make up approximately 70% of all dyestuffs used worldwide by weight,⁸ making them the largest group of synthetic colorants and the most common synthetic dyes released into the environment.^{9–11} Azo dyes absorb light in the visible spectrum due to their chemical structure, which is characterized by one or more azo groups ($-N=N-$).¹² Previous studies conducted to evaluate the toxic effect of these coloring food additives; on renal, hepatic function, lipid profile, blood glucose, body-weight gain and biomarkers of oxidative stress in tissue.¹³ It is well known that most types of dyes form complexes with metal ions in aqueous media.¹⁴ Interactions between food dyes and metal ions may change their stability, toxicity and other physico-chemical properties of both metal and the dye.¹⁵ Accordingly, it is important for human health to know these complexes.

Although the oral cavity is the initial site exposed to food colors,¹⁶ and metal ions released from amalgam by electro-chemical reactions.^{17–19} The interaction between these metal ions released from amalgam and the oral environment is a major subject matter in dental research.

The present paper investigated the feasible complexation between azo dyes (colors) and some essential metals ions released from amalgam including Cu(II) and Hg(II), by the theoretical methods (molecular mechanics/quantum mechanical).

2. Materials and methods

2.1. Quantum chemical calculations

The full geometrical optimization of the free azo dyes L_{1-4} (Fig. 1) in the gas phase were carried out at the level of semi-empirical AM1 method,²⁰ as well as density functional theory (DFT)²¹ using a gradient technique^{22,23} and 6-31G*^{24,25} basis set. The DFT calculations were carried out with the B3LYP functional, in which Becke's nonlocal exchange^{26,27} and the Lee-Yang-Parr correlation functional²⁸ semi-empirical and DFT calculations were performed using GAUSSIAN 03 for Windows program package.²⁹ All calculations were done on a Pentium IV PC computer.

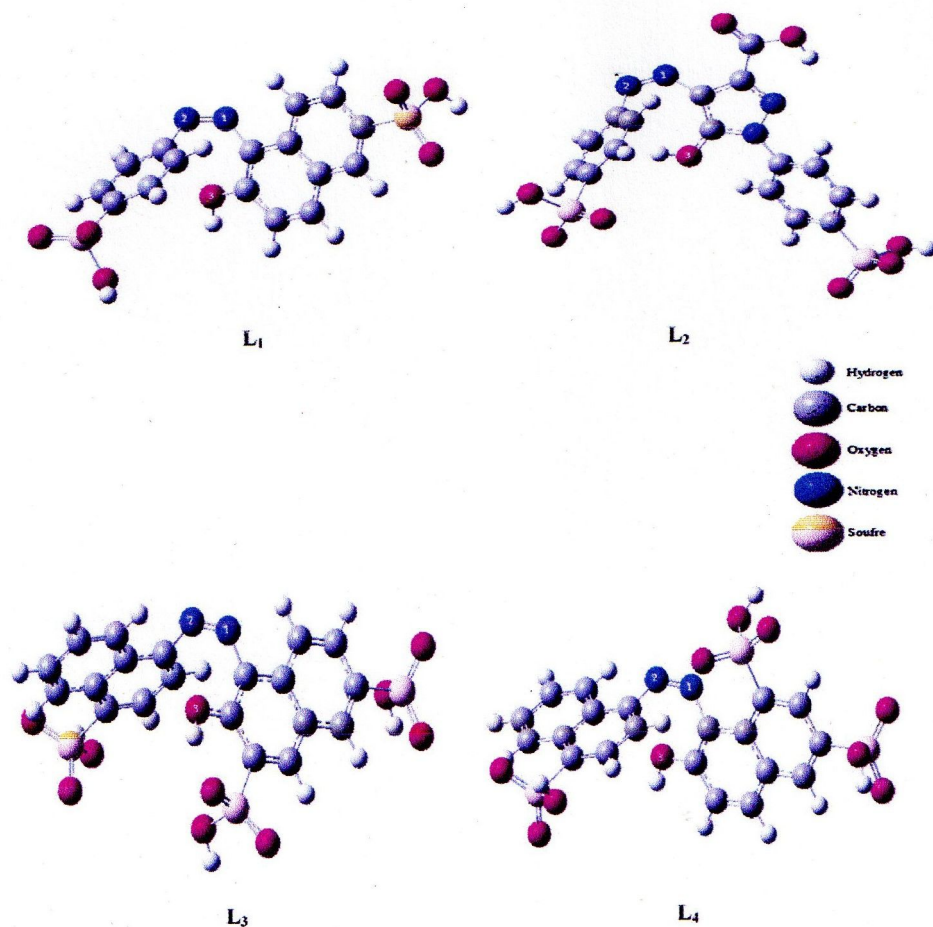


Fig. 1 – B3LYP/6-31G(d) optimized geometry of ligands L_{1-4} with atom numbering scheme.

2.2. Molecular mechanics calculations

2.2.1. MM calculations and force field parameters

Molecular mechanics calculations were used to obtain further information on the contribution of the various species to the observed behavior. The calculations of complexes were performed with the EMO program (version 2010).^{30,31} The components of the force field describing interaction within mono nuclear ligand–metal complexes have been used in many previous studies, which they are in good agreement with the experimental.^{32–34}

Program EMO is built on three main menus:

- Menu 1: entry of the molecule using the keyboard; each atom is codified according to its hybridization. The maximum number of atoms: 420, including the hydrogens and the electronic lone pairs
- Menu 2: geometric handling of molecule
- Menu 3: energy minimization by molecular mechanics.

This program uses the force field MM2, which is the force field of Allinger,³⁵ which was conceived at the beginning for the simple molecules (alkanes, carbonyl compounds, sulphides, amines, etc.). It is used to treat increasingly complex molecules.

This program uses the relaxation method (single step method) for the calculations. Potential functions for bond stretching, angle bending, torsional, non-bonded and electrostatic contributions used our studies is given in the footnote to Table 1. Also program EMO has specific parameters; we found it in main File EMO.par (stretching, bending, and torsion parameters). In the other hand we have specific potential energies for Van der Waals interactions: the cut-off distance is 3.46 Å. The Hydrogen bonding energy: EMO uses a truncated parabolic potential, equal to –16.7 KJ per bond at the optimal distance of 1.85 Å, and to zero at 1.25 or 2.45 Å. It is included in the electrostatic energy.

2.2.2. Modeling of the Cu(II) and Hg(II) chelates

All the structures studied in our work were built using the program EMO (version 2010) by introducing the Allinger code of the atoms of the molecules studied, by the keyboard of the computer then the energy is minimized by using the semi-empirical parameters (Figs 3 and 4). The most stable conformation is obtained from various starting geometries, after optimization.

In order to avoid the local minima corresponding to unstable conformers, we carried out it with the option “SCAN”

which makes it possible to sweep the surface of potential energy (PES). This enabled us to eliminate the geometries having little chance to generate the most stable conformers. Energies of the found conformers are optimized by the semi empirical method. The most stable conformations have the lower energies. For each structure we have done the energies: E_{EMO} , $E_{\text{stretching}}$, E_{bending} , E_{torsion} , $E_{\text{Van der Waals}}$.

3. Results and discussion

3.1. Part one: free ligands

3.1.1. Geometry optimization

The equilibrium geometry optimization for four azo dyes molecules has been achieved by energy minimization, using DFT at the B3LYP level, employing the basis set 6-31G(d). The electronic populations as well as the Fukui indices and local nucleophilicities are computed using different populations analysis MPA (Mulliken population analysis) and NPA (natural population analysis).^{36–39}

3.1.2. Electronic properties

The most important orbitals in a molecules are the frontier molecular orbitals, called highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO).

These orbitals determine the way the molecule interacts with other species. The frontier orbital gap helps characterize the chemical reactivity and kinetic stability of the molecule. A molecule with a small frontier orbital gap is more polarizable and is generally associated with a high chemical reactivity, low kinetic stability and is also termed as soft molecule.⁴⁰ The HOMO–LUMO energy gap values increases in the order: $L_2 < L_1 < L_3 < L_4$. This demonstrate that the lower value for frontier orbital gap in case of L_1 than other ligands makes it slightly more reactive and less stable (Table 1). The HOMO is the orbital that primarily acts as an electron donor and the LUMO is the orbital that largely acts as the electron acceptor.

The 3D plots of the frontier orbitals HOMO and LUMO and the molecular electrostatic potential map (MEP) figures for four molecules are shown in Fig. 2. The MEP map shows that oxygen and nitrogen atoms represent the most negative potential region but the nitrogen atom seems to exert comparatively small negative potential as compared to oxygen atom. The hydrogen atom attached to the six and five membered ring bear the maximum positive charge. The Mulliken charge atoms (Table 2) reveals that when compared to nitrogen atoms N_1 , N_2 and O_3 , is considered as more basic site. The charge distribution shows that the more negative charge is

Table 1 – HOMO and LUMO energies, HOMO–LUMO gaps, dipole moment M, ionization energy I, energy (HF) for compounds L_1 – L_4 .

Ligands	HOMO	LUMO	Energy gap	M (a.u)	I (a.u)	Energy (a.u)
L_1	–0.22782	–0.09983	–0.12799	7.1829	0.22782	–2049.17518
L_2	–0.24626	–0.10713	–0.13913	2.3136	0.24626	–2309.09824
L_3	–0.22883	–0.11039	–0.11844	2.8051	0.22883	–2826.60576
L_4	–0.22151	–0.10518	–0.11633	4.5033	0.22151	–2826.58729

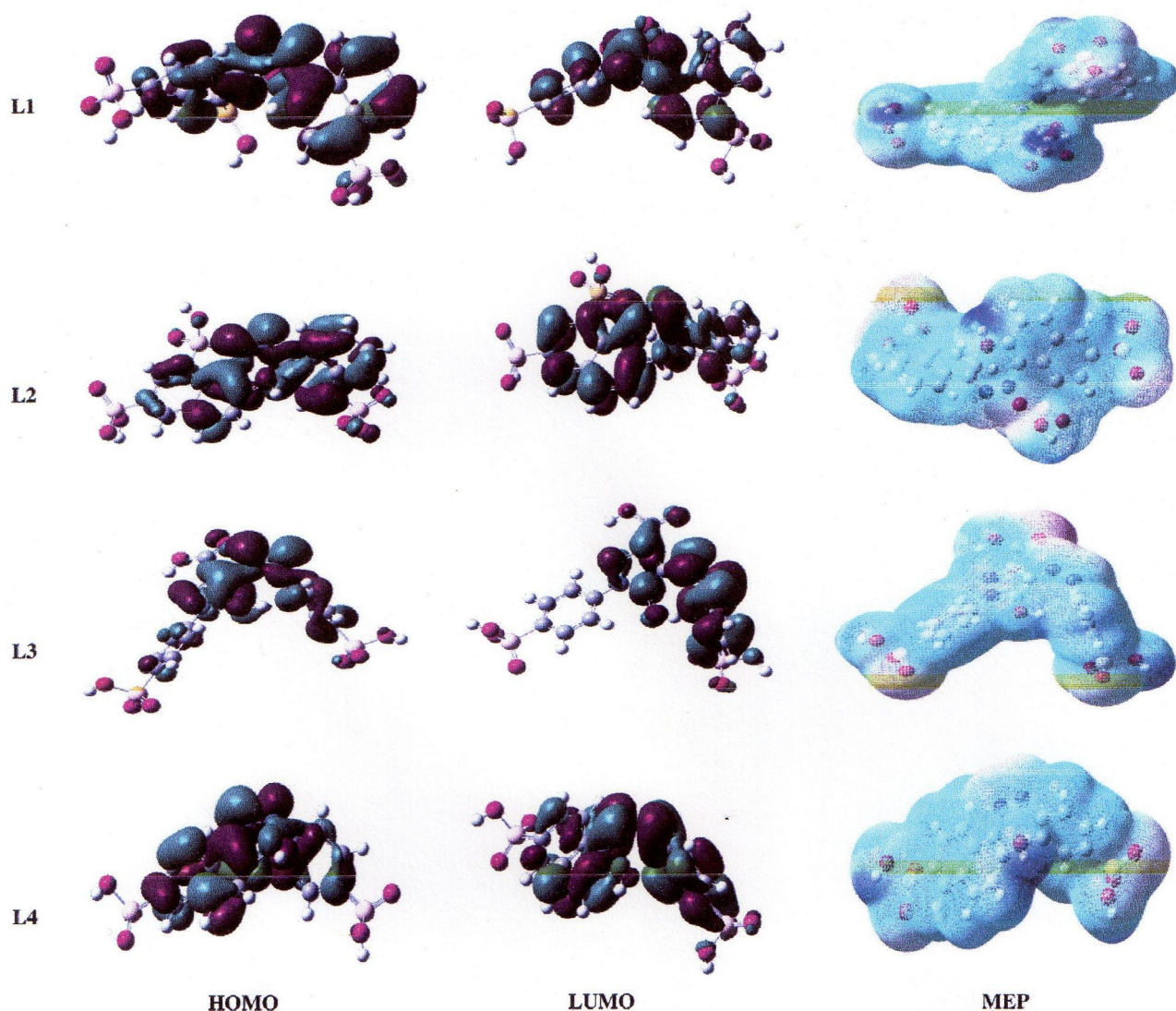


Fig. 2 – The highest occupied (HOMO), lowest unoccupied (LUMO) molecular orbitals and MEP surfaces of ligands L_{1-4} .

concentrated on oxygen atom whereas the partial positive charge resides at hydrogens. By analyzing the Mulliken charge atoms values, we noted that the N_1 nitrogen atom is lower than N_2 nitrogen in the most of cases.

Table 2 – Mulliken charge atoms (q_N, q_{N+1}): are the gross electronic populations of the three sites N_1, N_2 and O_3 in neutral and cationic systems, respectively for L_{1-4} systems.

Ligands	Atoms					
	N_1		N_2		O_3	
	q_N	q_{N+1}	q_N	q_{N+1}	q_N	q_{N+1}
L_1	-0.2449	-0.1587	-0.2456	-0.1783	-0.6337	-0.5983
L_2	-0.2370	-0.1291	-0.2370	-0.1537	-0.6332	-0.6014
L_3	-0.2558	-0.2033	-0.2450	-0.1857	-0.6484	-0.6289
L_4	-0.2349	-0.1730	-0.2531	-0.1831	-0.6247	-0.6148

The analysis of the local nucleophilicity indices and Fukui function values f_k^- given in Table 3 show that the N_1 nitrogen atom in the case of L_2 positions are characterized by the highest value of the local nucleophilicity indices and Fukui function values f_k^- . But the local nucleophilicity indices and Fukui function values f_k^- given in the same table show that the O_3 oxygen atom in the case of L_1 positions are characterized by the highest value of the local nucleophilicity indices and Fukui function values, f_k^- .

The HOMO energy, -0.33518 a.u., of the reference system (TCE) has been calculated at the same computational level.

3.2. Part two: complexes ligands

3.2.1. Coordination 4 and 6 around the central atom

Previous work reported that the interaction between azo dyes and metal ions, being an important branch of analytical chemistry and they presented contributes to a

Table 3 – The global nucleophilicity index N_g (ev),^{41–43} Fukui function values f_k^- ,⁴⁴ locals nucleophilicity indexes N_k ,⁴³ of the sites N_1 , N_2 , O_3 for L_{1-4} systems.

Ligands	N_g (ev)	N_1		N_2		O_3	
		f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k
L1	2.29	0.0862	0.1974	0.0673	0.1541	0.0354	0.0811
L2	2.42	0.1021	0.2470	0.0833	0.2015	0.0318	0.0769
L3	2.89	0.0525	0.1517	0.0593	0.1713	0.0195	0.0563
L4	3.09	0.0618	0.1912	0.0700	0.2163	0.0099	0.0305

deeper understanding of the coordination modes of hydroxyl and Nitrogens groups to transitions metal ions with ratio 2:1.⁴⁵

As a result, the atoms N_1 and O_3 are the most reactive centers, which have the greatest ability to bind to the metal surface. On the other hand, the HOMO (Fig. 2) is important in the area containing 2 nitrogens. We conclude that this area is the region of reactive centers that transfer electrons from nitrogen to the copper surface.

The ligands bind the copper and mercury ions through multidentate coordination mode with N_1 and $O_{hydroxyl}$; water

donor atoms. Only coordination 4 and 6 around the central atom has been considered. The central atom Cu(II) coordinates with four atoms: two OH groups and two N nitrogens atoms from azo dyes at the square-planar (coplanar) and apical positions (axial) occupies by two water molecules (Fig. 3). But for the central atom Hg(II) coordinates with four atoms : two $O_{hydroxyl}$ and two N nitrogens from azo dyes (Fig. 4).

3.2.2. Modeling of the Cu(II) and Hg(II) chelates

An optimized geometry and minimized steric energy (stretching energy + angle bending energy + rotation energy + Van der Waals energy + electrostatic energy) for all complexes formed in solution were determined by molecular modeling which carried out by the EMO program using the molecular mechanics (MM2). This program uses the relaxation method (single step method) for calculations.

The results obtained by molecular mechanic show that the complexes formed with mercury(II) are more stable than those of copper(II).

Table 4 shows that steric energy of the minimized structures for cupric complexes increases in the order: $E_{(A)} < E_{(C)} < E_{(D)} < E_{(B)}$. The results obtained shows that (A) is more stable compared to other complexes.

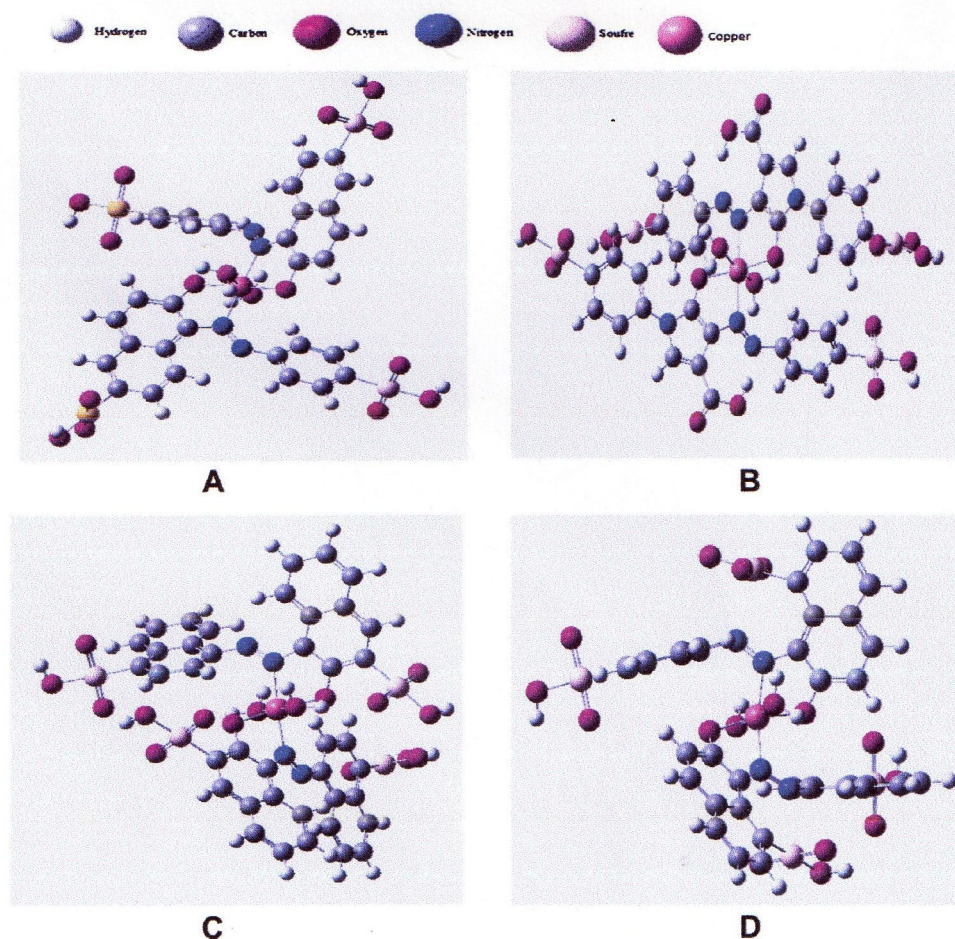


Fig. 3 – The most stable conformation from various complexes geometries [(A): Sunset Yellow – Cu^{2+} , (B): Tartrazine – Cu^{2+} , (C): Amaranth – Cu^{2+} , (D): Ponceau 4R – Cu^{2+}].

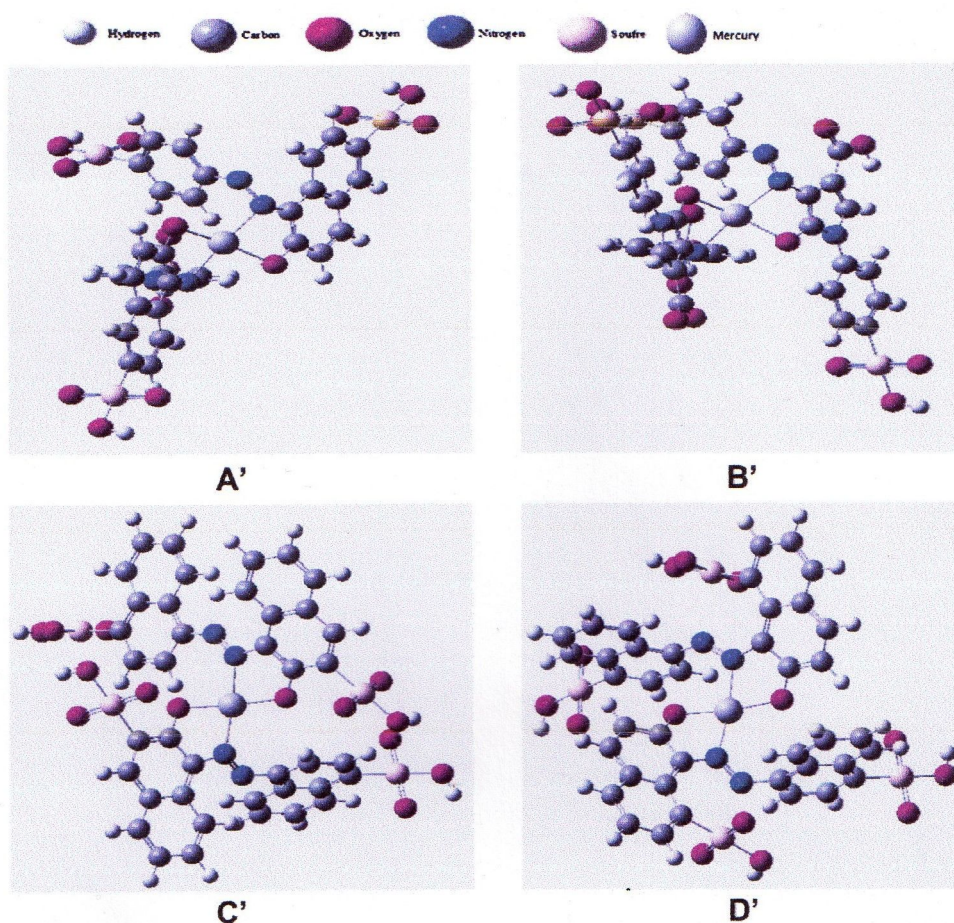


Fig. 4 – The most stable conformation from various complexes geometries [(A'): Sunset Yellow – Hg^{2+} , (B'): Tartrazine – Hg^{2+} , (C'): Amaranth – Hg^{2+} , (D'): Ponceau 4R – Hg^{2+}].

Table 4 – Steric energies (KJ/mol) of copper(II) complexes in octahedral coordination mode.

Complexes	Energy						
	Stretching	Bending	Torsion	V.d.W	Electrostatics	Solvant	Total
(A)	11.29	89.37	-105.37	155.09	-81.75	0.00	68.638
(B)	10.63	284.39	-49.77	166.72	-132.59	0.00	279.386
(C)	14.84	106.81	-147.49	220.58	-84.94	0.00	109.798
(D)	23.18	144.74	-70.23	216.88	-72.78	0.00	241.790

Table 5 – Steric energies (KJ/mol) of mercury(II) complexes in square planar coordination mode.

Complexes	Energy						
	Stretching	Bending	Torsion	V.d.W	Electrostatics	Solvant	Total
(A)	07.07	51.04	-179.53	124.19	-62.95	0.00	-60.179
(B)	9.79	203.14	-112.44	134.91	-79.65	0.00	155.745
(C)	15.54	140.74	-232.33	202.37	-82.14	0.00	44.175
(D)	10.15	130.18	-200.50	200.86	-70.24	0.00	70.45

Table 5 shows that steric energy of the minimized structures for mercury complexes increases in the order: $E_{(A')} < E_{(C')} < E_{(D')} < E_{(B')}$. The results obtained shows that (A') is more stable compared to other complexes.

4. Conclusion

Several previous works showed that the mercury released from amalgam causes a high toxicity.^{46–53} But unfortunately, the Authors fail to provide information regarding the percentage of metal released from the amalgam. This led us to develop a theoretical study for envisage how the complexes formed and analyzed the interactions exist between these metal ions and the azo dyes for take a general idea on the intoxication of these ions.

4.1. First

Quantum mechanical calculations used for calculated the Fukui functions values, f_k^- , locals nucleophilicity indexes N_k , HOMO and LUMO energies, HOMO–LUMO gaps and other reactivity descriptors for found the governing nucleophilic attack, governing electrophilic attack and governing radical attack. In our study the local indices nucleophilicity N_k of the series of azo dyes compounds were discussed in a simple but precise manner. The distribution of the electron density shows that the compounds studied had many active centers in nucleophilicity. The areas containing the nitrogen and oxygen atoms have more opportunity to form bonds with the metal ions surface, by donating electrons to the metal. However, sites N_1 , N_2 and O_3 are most favorable for electrophilic attack.

4.2. Second

The calculations of complexes were performed by MM with the EMO program for many reasons: 1: calculations are very time consuming in QM, 2: complexes are the big molecules, 3: the components of the force field describing interaction within mono-nuclear ligand–metal complexes have been used in many previous studies, which they are in good agreement with the experimental.

We noted that the coordination chemistry of Hg(II) is important in view of its toxicity to living systems. According to the results obtained, the study shows that complexes forms with mercury are easier to form and more stable than copper these show that the mercury intoxication is faster than the copper, knowing that mercury is toxic even with low dose. For that, the men who carry amalgams we advise may be avoid to eat food and drugs which contain azo dyes because there exists a high trend between these azo dyes and the metal ions which released by the amalgams.

Conflicts of interest

All authors have none to declare.

REFERENCES

1. Gaunt IF, Carpanini FMB, Grasso P, Kis IS, Gangolli SD. Long term feeding study on black PN in rats. *Food Cosmet Toxicol.* 1972;10:17–27.
2. Hallagan JB, Allen DC, Borzelleca JF. The safety and regulatory status of food, drug and cosmetics colour additives exempt from certification. *Food Chem Toxicol.* 1995;33:515–528.
3. Clydesdale FM. Color as a factor in food choice. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1993;33:83–101.
4. Revankar SM, Lele SS. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresour Technol.* 2007;98:775–780.
5. Downham A, Collins P. Colouring our foods in the last and next millennium. *Int J Food Sci Technol.* 2000;35:5–22.
6. Minioti SK, Sakellariou FC, Thomaidis SN. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Anal Chim Acta.* 2007;583:103–110.
7. Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. A review. *J Taiwan Inst Chem Engineers.* 2011;42:138–157.
8. Zollinger H. *Colour Chemistry – Synthesis, Properties of Organic Dyes and Pigments.* New York, USA: VCH Publishers; 1987.
9. Chang JSC, Chou Y, Lin J, Hu TL. Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Res.* 2001;35:2841–2850.
10. Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Decolorization and biodegradation of textile dye navy blue HER by *Trichosporon beigelii* NCIM-3326. *J Hazard Mater.* 2009;166:1421–1428.
11. Zhao X, Hardin IRHPLC. Spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes Pigm.* 2007;73:322–325.
12. Chang JS, Kuo TS, Chao YP, Ho JY, Lin PJ. Azo dye decolorization with a mutant *Escherichia coli*. *Strain Biotechnol Lett.* 2000;22:807–812.
13. Amin KA, Abdel Hameid II H, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:2994–2999.
14. Zollinger H. In: *Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications Of Organic Dyes and Pigments.* 2 ed. New York: VCH; 1991.
15. Marmion DM. In: *Handbook of U.S. Colorants: Foods, Drugs and Cosmetics and Medical Devices.* 3.ed. New York: John Wiley & Sons; 1991.
16. Lu Y, Bennick A. Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Arch Oral Biol.* 1998;43:717–728.
17. Brune D. Corrosion of amalgams. *Scand J Dent Res.* 1991;99:506–514.
18. Jensen SJ. Corrosion of zinc-containing dental amalgam. *Scand J Dent Res.* 1983;9:325–333.
19. Johansson B, Derand T. Corrosion of amalgams with special regard to zinc. *Scand J Dent Res.* 1983;91:320–324.
20. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J Mol Model.* 2007;13:1173–1213.
21. Labanowski JK, Andzelm JW. *Density Functional Methods in Chemistry.* New York: Springer Verlag; 1991.
22. Baker J. An algorithm for the location of transition states. *J Comput Chem.* 1986;7:385–395.
23. Schlegel HB, ed. *Modern Electronic Structure Theory: Geometry Optimization on Potential Energy Surfaces.* Singapore: World Scientific; 1994.

24. Hehre WJ, Radom L, Schleyer PVR, Pople JA. *Ab Initio Molecular Orbital Theory*. New York: Wiley; 1986.
25. Hariharan PC, Pople JA. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor Chim Acta*. 1973;28:213–222.
26. Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A*. 1988;38:3098–3100.
27. Becke AD. A new mixing of Hartree–Fock and local density-functional theories. *J Chem Phys*. 1993;98:1372–1377.
28. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle–Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B*. 1988;37:785–789.
29. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, et al. *Gaussian 03, Revision D.01*. Wallingford, CT: Gaussian, Inc.; 2004.
30. Blaive B, Legsei G, Lai R. *J Mol Struct*. 1995;345:245–250.
31. Zinelabendine A, Bouaraoui A, Fathallah Henni MFM, Blaive B, Gallo R. Molecular mechanics modelling of siderophores. *J Mol Struct*. 1993;286:267–274.
32. Doucet JP, Weber J. *Computer-Aided Molecular Design: Theory and Applications*. Elsevier Science & Technology Books, ISBN 0122212851; 1996.
33. Terbouche A, Djebbar S, Benali-Baitich O, Khan M, Bouet G. Stability and molecular modelling of cobalt(II) and nickel(II) with polydentate Schiff base. *Revue Roumaine de Chim*. 2008;53:101–106.
34. Khebichat N, Ghalem S. Theoretical study of dipeptide complexes of copper(II). *J Mol Struct*. 2006;777:107–111.
35. Li Z, Scheraga HA. Monte Carlo-minimization approach to the multiple-minima problem in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:6611–6615.
36. Li J, Li H, Jakobsson M, Sjödin S, Li P, Lascoux M. Joint analysis of demography and selection in population genetics: where do we stand and where could we go? *Mol Ecol*. 2012;21:28–44.
37. Yamamoto K, Irimura T, Osawa T. Biochemistry of lectins and their applications in immunochemistry and cellular biology. *J Biochem*. 2011;150:477–482.
38. Zhao X, Wang Y, Chen Q, Zhang M, Zhao N. *Comput Mater Sci*. 2012;54:119.
39. Lakshmi A, Balachandran V, Janaki A. Comparative vibrational spectroscopic studies, HOMO–LUMO and NBO analysis of 5,7 dibromo-8-hydroxyquinoline and 5,7-dichloro-8-hydroxyquinoline based on density functional theory. *J Mol Struct*. 2011;1005:51–66.
40. Fleming I. *Frontier Orbitals and Organic Chemical Reactions*. New York: John Wiley & Sons; 1976.
41. Domingo LR, Chamorro E, Pérez P. Understanding the reactivity of captodative ethylenes in polar cycloaddition reactions. A theoretical study. *J Org Chem*. 2008;73:4615–4624.
42. Jaramillo P, Domingo LR, Chamorro E, Pérez P. A further exploration of a nucleophilicity index based on the gas-phase ionization potentials. *J Mol Struct (Theochem)*. 2008;865: 68–72.
43. Pérez P, Domingo LR, Duque-Noreña M, Chamorro E. A condensed-to-atom nucleophilicity index. An application to the director effects on the electrophilic aromatic substitutions. *J Mol Struct (Theochem)*. 2009;895:86–91.
44. Roy RK, Pal S, Hirao K. On non-negativity of Fukui function indices. *J Chem Phys*. 1999;110:8236–8245.
45. Szabo L, Herman K, Mircescu NE, et al. SERS and DFT investigation of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and its metal complexes with Al(III), Mn(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II) and Pb(II). *Spectrochimica Acta A*. 2012;93:266–273.
46. Souza AP, Gerlach RF, Line SRP. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials*. 2001;22:2025–2030.
47. Pizzichini M, Fonzi M, Sugherini L, et al. Release of mercury from dentalamalgam and its influence on salivary antioxidant activity. *Sci Total Environ*. 2002;284:19–25.
48. Okabe T, Elvebak B, Carrasco L, Ferracane JL, Keanini RG, Nakajima H. Mercury release from dental amalgams into continuously replenished liquids. *Dent Mater*. 2003;19:38–45.
49. Mutter J, Naumann J, Sadaghiani C, Walach H, Drasch G. Amalgam studies: Disregarding basic principles of mercury toxicity. *Int J Hyg Environ Health*. 2004;207:391–397.
50. Al-Salehi SK, Hatton PV, Miller CA, Mcleod C, Joiner A. The effect of carbamide peroxide treatment on metal ion release from dental amalgam. *Dent Mater*. 2006;22:948–953.
51. Ye Xibiao, Qian Haojun, Xu Peicheng, Zhu Lin, Longnecker Matthew P, Fu Hua. Nephrotoxicity, neurotoxicity, and mercury exposure among children with and without dental amalgam fillings. *Int J Hyg Environ Health*. 2009;212:378–386.
52. Richardson GM, Wilson R, Allard D, Purtill C, Douma S, Gravière J. Mercury exposure and risks from dental amalgam in the US population, post – 2000. *Sci Total Environ*. 2011;409:4257–4268.
53. Bates MN. Dental amalgam fillings: a source of mercury exposure. *Encyclopedia Environ Health*; 2011:11–20.

Food Dyes are Inhibitors of Human Protein Tyrosine Phosphatases (PTP1B) Molecular Docking Studies

Ismail DAOUD
Laboratory of Naturals
Products and Bio
actives-LASNABIO.
Faculty of Sciences -
Department of
Chemistry. University
of Tlemcen- BP 119,
13000. Algeria,

Mourad MESMOUDI
Laboratory of Naturals
Products and Bio
actives-LASNABIO.
Faculty of Sciences -
Department of
Chemistry. University of
Tlemcen- BP 119,
13000. Algeria

Said GHALEM
Laboratory of Naturals
Products and Bio
actives-LASNABIO.
Faculty of Sciences -
Department of
Chemistry. University
of Tlemcen- BP 119,
13000. Algeria

ABSTRACT

Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) is an enzyme that plays a critical role in down-regulating insulin signaling through dephosphorylation of the insulin receptor. Inhibitors of PTP1B showed increased insulin sensitivity and normalize plasma glucose level and thus are use full therapeutic agents for the treatment of diabetes. The aim of the current study is to identify PTP1B inhibitors by means of virtual screening with docking. Six food dyes molecules have been screened and based on energy MolDock scores and hydrogen bonding interactions. L₅, L₁ potential inhibitors were identified in cavity1 and 2 respectively.

Keywords

Diabetes, PTP1B, Food dyes, Interactions, Molecular Docking.

1. INTRODUCTION

The activities and functions of cellular proteins are often regulated by posttranslational modifications. Tyrosine phosphorylation is an example of those modifications and the reversible nature of the phosphorylation provides the basis for the communication between the signaling proteins inside cell [1–4]. The phosphorylation state of a protein is dynamically controlled by the action of protein tyrosine kinases (PTKs) and protein tyrosine phosphatases (PTPases); PTKs catalyze the tyrosine phosphorylation and PTPases catalyze the reverse reaction [5,6].

PTKases were discovered in 1980 [7] and later found to be extremely important for the regulation of cell transformation, growth, differentiation, apoptosis, and hormone actions. On the other hand, Protein tyrosine phosphatases (PTPs) constitute a large family of signaling enzymes. Deregulation of PTP activity can play a role in a number of diseases including diabetes, cancer, and dysfunction of the immune system. Fischer et al. purified and characterized the first PTPase, PTP-1B from the human placenta in 1988 [8,9]. PTP1B dephosphorylates the insulin receptor and causes resistance to insulin. Thus, it has been implicated in the development of type II diabetes [10]. Based on the structural similarity between it and leukocyte antigen CD45, they found that this antigen had PTPase activity [11]. Subsequently, more than 30 PTPases were cloned and reported [12]. PTPases form a large family of enzymes that can be divided into cytosolic types, such as SH2-domain-containing phosphotyrosine phosphatase (SHP2) and PTP-1B, and transmembrane types, such as CD45, receptor PTPase-a (RPTP-a), and leukocyte antigen related tyrosine phosphatase

(LAR). In the other hand, Synthetic colorants are a very important class of food additives. They are widely used to compensate for the loss of natural colors of food and the way to improve the esthetic quality of a food product, which is destroyed during processing and storage, and to provide the desired colored appearance. The total world colorant production is estimated to be 80,00,000 tons per year [13]. However, some of these substances pose a potential risk to human health, especially if they are excessively consumed. For this reason, safety data, such as the acceptable daily intake, based on toxicological studies on experimental animals and human clinical studies, have been repeatedly determined and evaluated by Food and Agricultural Organization (FAO) and World Health Organization (WHO) [14]. They are divided into five major colorant classes: the azo compounds (such as amaranth and tartrazine...), the chinophthalon derivatives of Quinoline Yellow, the triarylmethane group, xanthenes (such as erythrosine) and the indigo colorants [15].

While studying the enzymology of protein tyrosine phosphatases (PTPases), they observed that some of the dyes behaved as potent inhibitors of PTPases [16,17]. PTPases are a class of enzymes that hydrolyze the phosphate moiety from a phosphotyrosine residue of a protein thus regulating the cellular phosphorylation level of proteins in collaboration with protein tyrosine kinases [1,18]. Because PTPases play important roles as regulators of a diverse of signal transduction pathways, inhibition of PTPases by food colorants might disturb a certain signaling pathways resulting in adverse effects in human health. The dye attracted our attention because it is a competitive inhibitor of PTPases and also it contains free hydroxyl groups to introduce additional structural features without a significant change of the core structure. In present paper molecular modeling studies were performed to study the structural features of the inhibitor binding to PTP1B.

2. MATERIALS AND METHODS

X-ray crystallographic study has performed to explain the enzyme-inhibitor interactions with PTP1B and some food dyes. This work showed that PTP1B has two possible modes of inhibition depending on the structures of the ligands. Based on this result, molecular modeling was carried out to study the structural features of the interaction between PTP1B and food dyes.

2.1 Ligands Structures

Six food dyes was taken as ligands (Figure 1). These compounds were reported to bind with PTP1B and

subsequently disturb a certain signaling pathways resulting in adverse effects in human health [19]. Therefore those were

also subjected to docking to examine their binding modes.

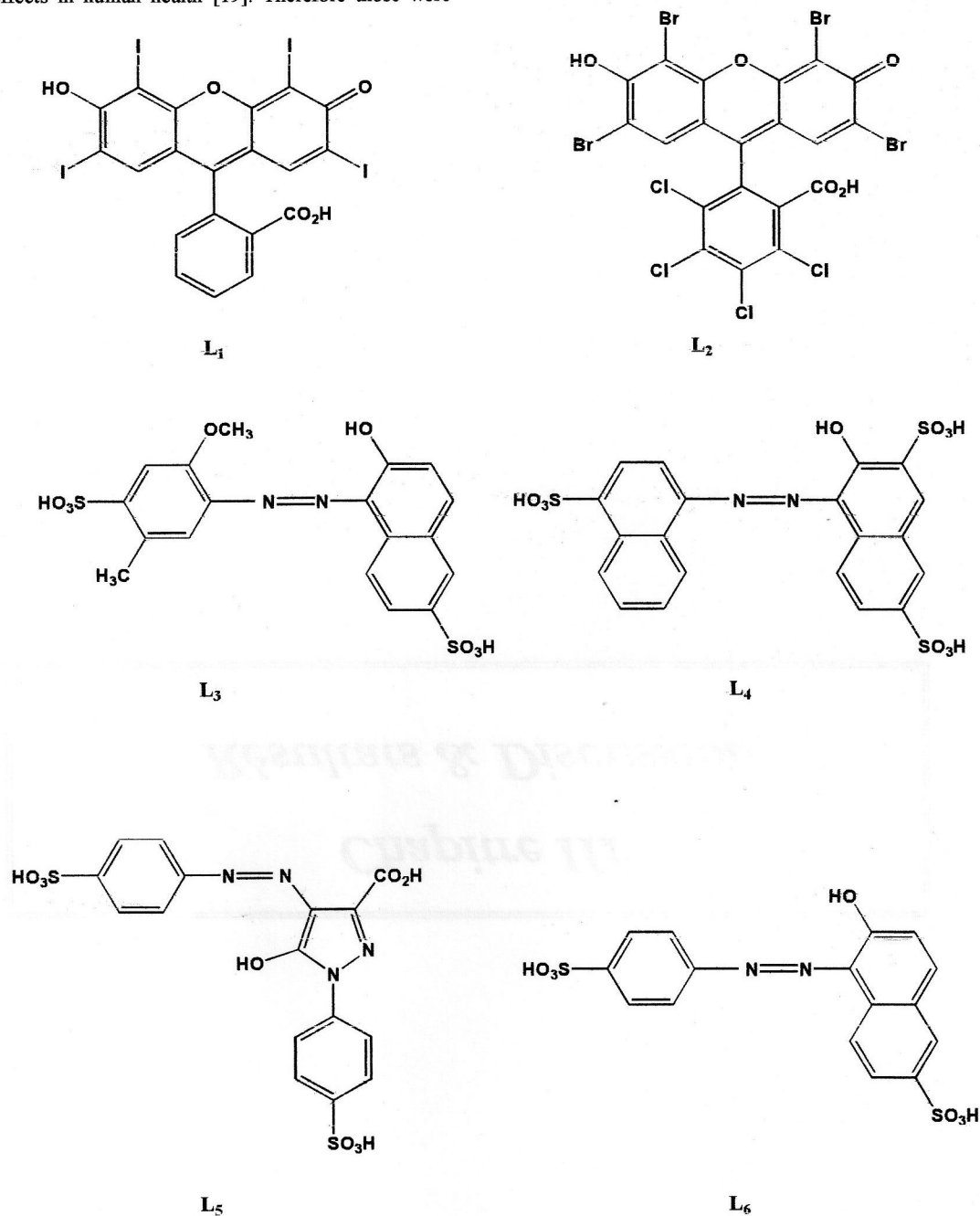


Fig1: Chemical structure of the food dyes used. L₁: Erythrosine B, L₂: Phloxine B, L₃: Allura Red AC, L₄: Amaranth, L₅: Tartrazine, L₆: Sunset Yellow FCF

The full geometrical optimization of the food dyes L1-6 (Figure 1) in the gas phase were carried out at the level of semi-empirical AM1 method [20], as well as density functional theory (DFT) [21] using a gradient technique [22,23] and 6-31G* [24,25] basis set. The DFT calculations were carried out with the B3LYP functional, in which Becke's nonlocal exchange [26,27] and the Lee-Yang-Parr correlation functional [28] semi-empirical and DFT calculations were performed using GAUSSIAN 03 for Windows program package [29]. All calculations were done on a Pentium IV PC computer.

Table 1. Shows energies of each ligands used DFT/ B3LYP (6-31G*)

ligands	Energies (u.a)
L ₁	HF=-0.0074
L ₂	HF=-0.1020
L ₃	HF=-0.3203
L ₄	HF=-0.4099
L ₅	HF=-0.2881
L ₆	HF=-0.2635

As shown in Table 2, broad spectrum of IC₅₀ values was observed in food dyes (L₁₋₆) [19].

Table 2. Inhibition of PTP1B by various synthetic dyes. Compounds L₁₋₆

Compounds	IC ₅₀ (μ M) ^a
L ₁	6.0 \pm 0.6
L ₂	4.2 \pm 0.3
L ₃	33 \pm 6
L ₄	34 \pm 7
L ₅	>190
L ₆	>220

^aIC₅₀ values were usually derived from duplicates or more of experiments using a range of inhibitor concentrations. The numbers indicate mean value \pm standard deviation

2.2 Enzyme Structure

The X-ray crystal structures of PTP1B bound with 6-(difluoro-phosphono-methyl)-naphthalene- 2-carboxylic acid (1BZJ) [30], were downloaded from RCSB Database (www.rcsb.org/pdb) [31].

2.3 The Simulation Details

The structure of the protein was corrected for missing atoms or unknown units using Molegro Virtual Docker (MVD2011) [32-34] program, graphical-automatic software (<http://molegro.com/mvd-product.php>). 1BZJ has a monomer structure. So to simplify the simulation water was removed.

To locate the appropriate binding orientations and conformations of ligands on PTP1B, docking was performed by using Molegro Virtual Docker (MVD) software package. The identification of ligand binding modes is done by iteratively evaluating a number of candidate solutions (ligand conformations) and estimating the energy of their interactions with the macromolecule. MVD performs flexible ligand docking, so the optimal geometry of the ligand will be determined during the docking. The MolDock [35] scoring function (MolDock Score) used by MVD is derived from the PLP scoring functions originally proposed by Gehlhaar et al. and later extended by Yang et al. [36]. The MolDock scoring function further improves these scoring functions with a new hydrogen bonding term and new charge schemes.

2.4 The Docking

To obtain better potential binding sites in the PTP1B (PDB ID: 1BZJ), a maximum of five cavities was detected using default parameters. The volume of cavity 2 (48.128 Å³) was found to be highest than the other cavities, also we found that the reference ligand of 1BZJ is fixed in cavity 1 (41.472 Å³). Out of the detected cavities, cavity 1 and 2 was selected for further studies (figure 2). The chosen cavity was further refined using side chain minimization by selection of an add-visible option set at a maximum of 10,000 steps per residue and at a maximum of 10,000 global steps. The grid resolution was 0.30 Å; the max iterations were 1,500; the max population size was 50 and the energy threshold was 100.

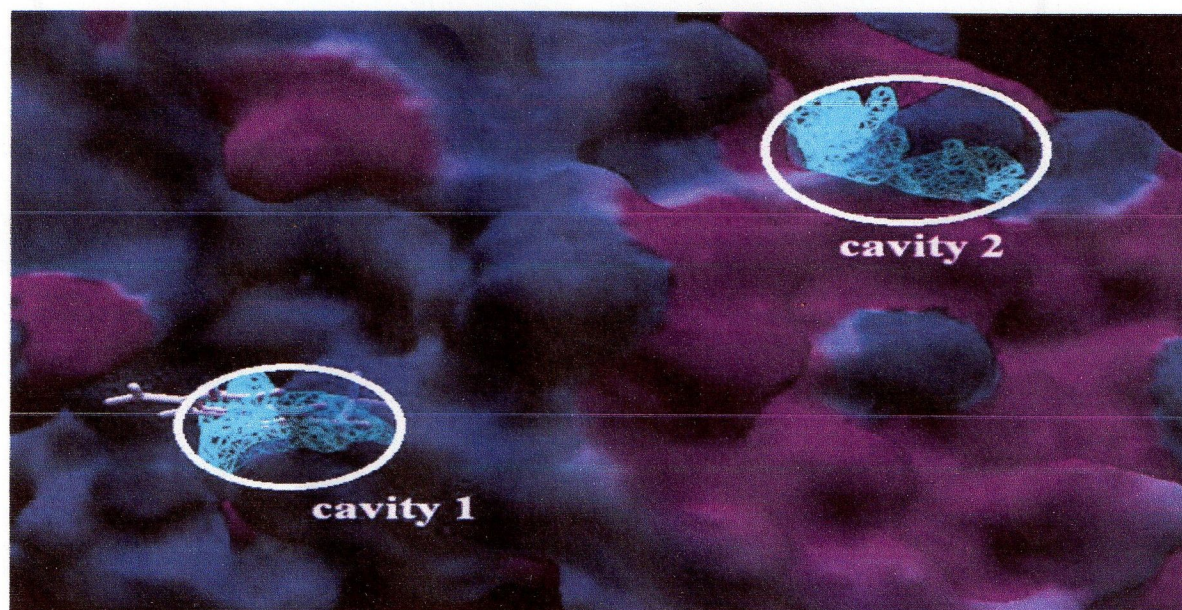


Fig2: Graphical interface with the cavities (cavity 1 and cavity 2 indicated by ellipses) identified by MolDock

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Study of Ligand-Substrate Interaction

X-ray crystallographic study has previously performed to explain the enzyme-inhibitor interactions with PTP1B and benzofuran and benzothiophene biphenyls [37]. This work showed that PTP1B has two possible modes of binding at the active site depending on the structures of the ligands. Based on this result, molecular modeling was carried out to study the structural features of the interaction between PTP1B and six food dyes. Docking of these six food dyes were performed

using MVD program. It was found that the residues in the site1(cavity1) as follows: Arg221, Ser216, Asp181, Phe182, Ala217, Val49, Asp48, Tyr46, Lys120, Gln262, Asp48, Ile219, Gly220, Cys215, Arg47, Glu262 and Lys116 are highly conserved within the active site. Also for the residues in the site2(cavity2) as follows: Lys248, Ala77, Glu252, Glu75, Leu234, Met75, Thr230, Val249, Glu76, Met74, Asp245, Phe256, Lys73, Val244, Gln78, Lys255, Leu251, Ser243, Arg238 are highly conserved within the active site. In this study, site1 and site2 are chosen as the binding site to dock with the food dyes diversity set molecules.

3.2 Virtual Screening

The six ligands molecules having minimum energy were screened out as the possible inhibitors for PTPases (Table 3). In cavity1: All selected molecules were having energy MolDock score as follows: Ligand L₁ is having minimum energy MolDock score -145.584 Kcal/Mol. Ligand L₂ is having -138.408 Kcal/Mol. Ligand L₃ is having -103.515 and Ligand L₄ is having energy MolDock score -137.544 Kcal/Mol. Ligand L₅ is having energy MolDock score -147.036. Ligand L₆ is having energy MolDock score -113.958. With the help of the Ligplot+ study we have selected Ligand L₅ as the possible inhibitor lead molecule, as it has minimum energy MolDock score and one of the highest number of interactions with the active site residue, it has 07 hydrophobic and 09 hydrogen interactions. Figure 3 represent the binding modes of the different docking poses of the ligands were investigated on Ligplot+ program [38], according to the energy MolDock score in cavity1.

Also in cavity 2 : All selected molecules were having energy MolDock score as follows: Ligand L₁ is having minimum energy MolDock score -141.283 Kcal/Mol. Ligand L₂ is having -106.417 Kcal/Mol. Ligand L₃ is having -104.632 and Ligand L₄ is having energy MolDock score -101.029 Kcal/Mol. Ligand L₅ is having energy MolDock score -115.254. Ligand L₆ is having energy MolDock score -95.455. Also with the help of the Ligplot study we have selected Ligand L₁ as the possible inhibitor lead molecule, as it has minimum energy MolDock score and one of the highest number of interactions with the active site residue, it has 08 hydrophobic and 1 hydrogen interactions. Figure 4 represent interactions of the six ligands drawn by ligplot+ according to the energy MolDock score in cavity2.

Table 4(a,b): shows all hydrogen bonds and hydrophobic interactions exist between six ligands (L₁₋₆) and active site(Cavity1 and Cavity2) respectively.

Table 3. Docking results of food dyes with PTP1B in the both cavities.

	Cavity 1			Cavity 2		
	MolDockScore ^a	Interaction ^b	H-bond	MolDock Score ^a	Interaction ^b	H-bond
L ₁	-145.584	-152.31	-15.564	-141.283	-134.772	-8.481
L ₂	-138.408	-144.733	-22.435	-106.417	-111.957	-11.120
L ₃	-103.515	-101.218	0	-104.632	-114.957	-2.383
L ₄	-137.544	-152.179	-21.170	-101.029	-119.28	-3.594
L ₅	-147.037	-157.729	-23.253	-115.254	-118.117	-8.451
L ₆	-113.958	-114.152	-3.713	-95.455	-108.382	-6.328

^a MolDock score calculated by summing the external ligand interaction (protein–ligand interaction) and internal ligand interaction score using Virtual Molecular Viewer 1.2.0.

^b The total interaction energy between the pose and the target molecules(s).

Table 4(a): List of amino acid residues involved in ligands-protein interaction between L₁₋₆ and cavity1 as predicted by Ligplot+

Compounds	Hydrogen bond ($\leq 3.6\text{\AA}$)	Hydrophobic interactions
L ₁	Arg221	Ser216, Asp181, Phe182, Ala217, Val49, Asp48, Tyr46, Lys120.
L ₂	Gln262, Asp48	Ile219, Val49, Ala217, Phe182.
L ₃	Asp48, Ile219, Gly220, Cys215, Arg221(2).	Arg47, Ala217, Glu262, Asp181, Phe182, Lys120, Tyr46.
L ₄	Arg221, Gly220, Lys116, Asp181(2), Lys120(2), Phe182	Cys215, Gln262, Ala217, Ile219, Tyr46.
L ₅	Asp48, Gln262(3), Cys215, Gly220, Arg221(2), Phe182	Val49, Tyr46, Ala217, Ile219, Ser216, Ser216, Asp181.
L ₆	Phe182, Gly220, Lys120(2), Cys215, Arg221(2)	Gln262, Ala217, Tyr46, Val49, Ser216, Asp181.

Thr230, Val249, Glu76 forms hydrophobic interactions with L₁ (Table 4(b)).

4. CONCLUSION

The molecular docking analysis resulted in the identification of potential ligands (L₁₋₆) molecules. Hence, in present study, it can be concluded that molecules L₅ and L₁ in cavity 1 and 2 respectively have the potential to inhibit the activity of PTP1B and can might cause harmful effects in human health. L₅ and L₁ does not only show interactions with identified active residues that are important for catalytic activity of PTP1B but the free energy of binding also ensures that L₅ and L₁ shows a very strong binding with PTP1B at polymerase active site.

5. ACKNOWLEDGMENTS

Our thanks to the experts who have contributed towards development of the template.

6. REFERENCES

- [1] Zhan X. L, Wishart M. J. and Guan K. L. 2001. Nonreceptor tyrosine phosphatases in cellular signaling: regulation of mitogen-activated protein kinases. *Chem. Rev*; 101(8), 2477-96.
- [2] Östman A. and Böhmer F. D. 2001. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends. Cell. Biol*; 11(6), 258–66.
- [3] Cohen P. 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation—A 25 year update. *Trends. Biochem. Sci* ; 25(12), 596–601.
- [4] Neel B. G. and Tonks N. K. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol*; 9(2), 193–204.
- [5] Zhang Z. Y. 2002. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor developmen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*; 42(1), 209–243.
- [6] Denu J. M. and Dixon J. E. 1998. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol*; 2(5), 633–641.
- [7] Hunter T. and Sefton B. M. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 77(3), 1311–1315.
- [8] Tonks N. K, Diltz C. D. and Fischer E. H. 1988. Purification of the major protein tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem*; 263(3), 6722–6730.
- [9] Tonks N. K, Diltz C. D. and Fischer E. H. 1988. Characterization of the major protein tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem*; 263(14), 6731–6737.
- [10] Blaskovich M. A. and Kim H. O. 2002. Recent discovery and development of protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Exp. Opin. Ther. Pat*; 12(6), 871–905.
- [11] Charbonneau H, Tonks N. K, Walsh K. A. and Fischer E. H. 1988. The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci*; 85(19), 7182–7186.
- [12] Goldstein B. 1998. Tyrosine Phosphoprotein Phosphatases (2nd ed.)Oxford: Oxford University Press.
- [13] Revankar S. M. and Lel, S. S. 2007. Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma* sp. WR-1. *Bioresour. Technol*; 98(4), 775–780.
- [14] Downham A. and Collins P. 2000. Coloring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food. Sci. Technol* ; 35(1), 5–22.
- [15] Minioti S. K, Sakellariou F. C. and Thomaidis S. N. 2007. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Anal. Chim. Acta*; 583(1), 103–110.
- [16] Shrestha S, Shim Y. S. Kim K. C, Lee K. H. and Cho H. 2004. Evans Blue and other dyes as protein tyrosine phosphatase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*; 14(8), 1923-1926.
- [17] Cho H, Lee D. Y, Shrestha S, Shim Y. S, Kim K. C, Kim M. K, Lee K. H, Won J. and Kang J. S. 2004. Aurintricarboxylic acid translocates across the plasma membrane, inhibits protein tyrosine phosphatase and prevents apoptosis in PC12 cells. *Mol. Cells*; 18(1), 46-52.
- [18] Neel B. G. and Tonks N. K. 1997. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol*; 9(2), 193-204.
- [19] Shrestha S, Bhattarai B. R, Lee K. H. and Cho H. 2006. Some of the Food Color Additives Are Potent Inhibitors of Human Protein Tyrosine Phosphatases. *Bull. Korean. Chem. Soc*; 27(10), 1567-1571.
- [20] Stewart J. J. P. 2007. Optimization of parameters for semi-empirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model*; 13(12), 1173-1183.
- [21] Labanowski J. K. and Andzelm J. W. 1991. Editors. Density functional methods in chemistry. New York: Springer Verlag; p.443.
- [22] Baker J. 1986. An algorithm for the location of transition states. *J. Comput. Chem*; 7(4), 385-395.
- [23] Schlegel H. B. 1994. editor. Modern electronic structure theory: geometry optimization on potential energy surfaces. Singapore: World Scientific.
- [24] Hehre W. J, Radom L, Schleyer P. V. R. and Pople J. A. 1986. Ab initio molecular orbital theory. New York: Wiley.
- [25] Hariharan P. C. and Pople J. A. 1973. The influence of polarization functions on molecular orbital hydrogenation energies. *Theor. Chim. Acta*; 28(3), 213-235.
- [26] Becke AD. 1988. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev A*; 38(6), 3098-3100.
- [27] Becke A. D. 1993. A new mixing of HartreeFock and local density-functional theories. *J. Chem. Phys*; 98(3), 1372-1381.
- [28] Lee C, Yang W. and Parr R. G. 1988. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev B*; 37(4),785-794.

- [29] Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A. and Cheeseman J. R., et al. 2004. Gaussian 03, Revision D.01. Wallingford, CT: Gaussian, Inc.
- [30] Groves M. R., Yao Z. J., Roller P. P., Burke J. T. R. and Barford D. 1998. Structural basis for inhibition of the protein tyrosine phosphatase 1B by phosphotyrosine peptide mimetics. *Biochemistry*; 37(51), 17773-17783.
- [31] Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N. and Bourne P. E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic. Acids. Res*; 28(1), 235–242.
- [32] da Cunha E. F. F., Martins R. C. A. and Albuquerque M. G. 2004. *LIV-3D-QSAR* model for estrogen receptor ligands. *J. Mol. Mod*; 10(5), 297–304.
- [33] Elaine F. F., da Edilaine F. B., Aline A. O. and Teodorico C. R. 2010. Molecular modeling of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase and its molecular docking study with gatifloxacin inhibitors. *J. Biom. Struct. Dyn*; 27(5), 619–625.
- [34] Ramalho T. C., Rocha M. V. J., da Cunha E. F. F. and Freitas M. P. 2009. The search for new COX-2 inhibitors. *Expert. Opin. Ther. Pat*; 19(9), 1193–1228.
- [35] Thomsen R. and Christensen M. H. 2006. MolDock: a new technique for highaccuracy molecular docking. *J. Med. Chem*; 49(11), 3315-3321.
- [36] Schulz H., Dale E., Karimi-Nejad Y. and Oefner C. 2009. Structure of human endothelin-converting enzyme 1 complexed with phosphoramidon. *J. Mol. Biol*; 385(1), 178–187.
- [37] Malamas M. S., Sredy J., Moxham C., Katz A., Xu W., McDevitt R., Adebayo F. O., Sawicki, D. R., Seestaller L., Sullivan D. and Taylor JR. 2000. *J. Med. Chem*; 43: 1293.
- [38] Wallace, A. C. Laskowski, R. A. and Thornton, J. M. 1995. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein. Eng.*, 8, 127–134.



Scholars Research Library

Der Pharma Chemica, 2012, 4(4):1594-1602
(<http://derpharmachemica.com/archive.html>)



ISSN 0975-413X
CODEN (USA): PCHHAX

Studies on binding modes between salivary amylase-food dyes and effect of Copper ions: molecular docking approach

Ismail. Daoud*, Mourad. Mesmoudi and Said. Ghalem

Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University Aboubekr Belkaïd Tlemcen, Algeria
Laboratory of Naturals Products and Bio-actives (LASNABIO), University, Aboubekr Belkaïd ,
13000, Tlemcen, Algeria

ABSTRACT

The interaction between metal ions and the oral environment is a major subject matter in dental research. The saliva acts as an electrolyte solution for different dental alloys. Saliva is expected to be of significance for the perception of food stimuli in the mouth. Mixing the food with saliva, including breakdown and dilution, is considered to be of large importance for semi-solids as these products are masticated without chewing, Saliva contains a range of enzymes that are susceptible to proteolysis. α -Amylase, present in large concentrations in whole saliva (WS). Starch is hydrolyzed to glucose, maltose and dextrin by α - and β -amylases and other related enzyme. In the other hand the affinity interactions between pigments and saliva were influenced by some factors, such as functional groups, molecular weight of pigments, temperatures, pH values, and salt concentrations. All these factors suggest that the complex of pigments may be difficult to remove from the WS film. The aim of this study was to test the effect of metal ions (copper) released from dental amalgam on the α -amylase activity.

Keywords: Food dyes, Copper(II), α -amylase activity, Molecular Docking, Interaction.

INTRODUCTION

Dental amalgam, an alloy formed by mercury with another metal or metals, is one of the oldest materials used in restorative dentistry, and still is one of the most commonly employed. Several metal ions are constantly released from amalgam by electrochemical reactions [1-3].

Part of these ions are formed the nature complexes with some food dyes. Azo dyes account for the majority of all dyestuffs, produced because they are extensively used in the textile, paper, food colorants, leather, cosmetics and pharmaceutical industries [4]. Azo dyes make up approximately 70% of all dyestuffs used worldwide by weight [5], making them the largest group of synthetic colorants and the most common synthetic dyes released into the environment [6-8]. Azo dyes absorb light in the visible spectrum due to their chemical structure, which is characterized by one or more azo groups ($-N=N-$) [9].

The complexes formed by Cu^{2+} with some food dyes (amaranth , ponceau 4R, and sunset yellow) has been studied spectrophotometrically under varied conditions [10], indigo carmine [11], tartrazine [12] .

In the other hand the properties and behaviour of such chemical systems in the oral cavity are poorly known, the terms "whole saliva", "mixed saliva" and "oral fluid" are used to describe the combined fluids present in the oral cavity. This fluid is mainly composed of water (99.5%), proteins (0.3%) and inorganic and trace substances (0.2%) [13-15] .The proteins in saliva (1-2 mg/ml) are mainly constituted by glycoproteins [13] enzymes (e.g., α -amylase,

carbonic anhydrase), immunoglobulins, and a wide range of peptides (cystatins, statherin, histatins, proline-rich proteins) with antimicrobial activities [13,15-17].

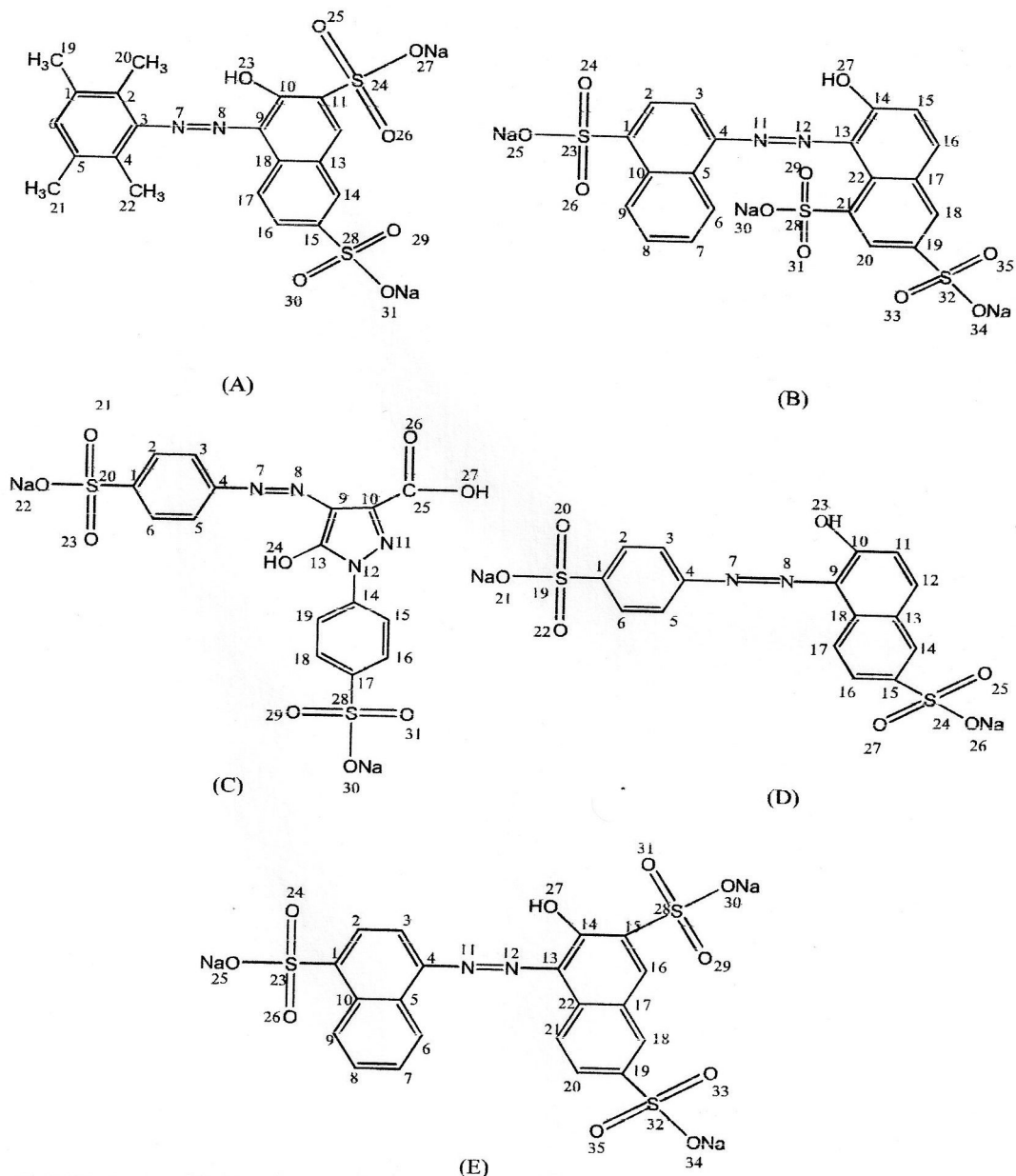


Fig.1. (A): Ponceau 4R, (B): Cochineal red A, E 124, (C): Tartrazine, E 102, (D): Sunset Yellow: E110, (E): Amara

Although the oral cavity is the initial site exposed to food pigments [18], little information exists on the molecular dynamics of the response of interactions between natural pigments and proteins [19-22], particularly the mixed salivary proteins.

The affinity interactions between pigments and saliva were influenced by some factors, such as functional groups, molecular weight of pigments, temperatures, pH values, and salt concentrations. All these results suggest that the complex of pigments may be difficult to remove from the whole saliva (WS) film [23].

Saliva contains a range of enzymes that are susceptible to proteolysis. α -Amylase, present in large concentrations in WS [24]. Starch is hydrolyzed to glucose, maltose and dextrin by α - and β -amylases and other related enzyme [25]. The interaction between the dye (Cibacron Blue F3GA (CB)) ligand and α -Amylase can be by complex combination of electrostatic, hydrophobic, and hydrogen bonding [26].

In this study, computations on the interactions at the active site of α -Amylase were carried out for five ligands. All these ligands have shown to be competitive or non competitive inhibitors for the α -Amylase activity.

The availability of several co-crystallized structures for α -Amylase with different inhibitors makes it possible to apply a molecular docking protocol to explore the enzyme-inhibitor interactions.

The study also focuses on the comparison between the inhibitory potentials of these five free food dyes on α -Amylase and the inhibitory potentials of these five complexed food dyes on α -Amylase. Also we examined the effects of Cu^{+2} on the activity of the major α -amylase.

MATERIALS AND METHODS

2.1. Ligands structure

A series of food dyes ligands (figure 1) as α -amylase inhibitor is considered in this study. For the geometry optimization, the ligand structures were prepared by use of the MM+ force-field (calculations in vacuo, bond dipole option for electrostatics, Polak-Ribiere algorithm, and RMS gradient of 0.01 kcal/Å mol) as implemented in HyperChem7.0 [27]. The most stable conformer was fully optimized with AM1 semi-empirical molecular orbital calculations encoded in the Gaussian03 [28]. Conformer energy of compounds was calculated.

2.2.PDB entries used in search

The three dimensional coordinates of α -amylase (PDB ID: 1XV8) [29] were obtained through the Protein Data Bank. (www.rcsb.org/pdb) [30]. Waters, cofactors and originally bounded ligands for α -amylase were removed from the docking procedure (figure 2).

We used the molecular docking to try to understand the interactions between:
1/ α -amylase and free five food dyes.

2/ α -amylase and complexed food dyes.

Were carried out employing the Molegro Virtual Docker (MVD 2011) [31-33] program, graphical-automatic software (<http://molegro.com/mvd-product.php>).

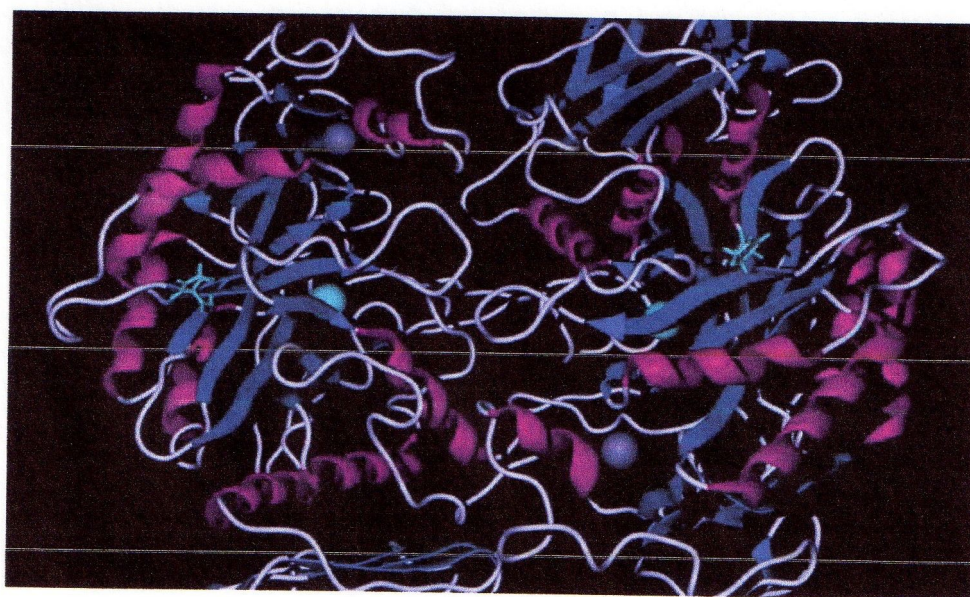


Fig. 2. The dimerous form of α -amylase

1. DOCKING CALCULATION PROCEDURES

The goal of this paper was to develop methodology for understanding mode of reductive activity of azo dyes. This methodology will be used in future studies for selection of compounds for focused screening libraries.

Two assumptions were central to this approach: 1) competitif antagonism , 2) non competitif antagonism.

Several studies have shown that azo dyes inhibit enzyme activity [34]. One study reported that the enzyme activity of amylase was reduced by 66% with tartrazine and 64% with erythrosine.

In order to test the validity of assumptions, we docked the free and complexed ligands into the active site of α -amylase crystal structure (1XV8.pdb) as well as in the other that may be influence on the enzyme activity indirectly. Molegro Virtual Docker (MVD) is based on a differential evolution algorithm; the solution of the algorithm takes into account the sum of the intermolecular interaction energy between the ligand and the protein, and the intramolecular interaction energy of the ligand. It could be accurately forecast the active sites of protein molecules based ligands. MVD is a precise semi-flexible molecular docking program. By increasing the qualifications, the recognition accuracy of bonding models is enhanced. Compared with the other dock softwares, the accuracy of MVD is higher. (MVD: 87%, Glide: 82%, Surflex: 75%, FlexX: 58%) [35,36].

MolDock Algorithm

The MolDock scoring function (MolDock Score) used by Molegro Virtual Docker program is derived from the PLP (Piecewise Linear Potential. The MolDock score uses a PLP to approximate the steric energy), (approximate binding energies between protein and ligand, generally expressed in kcal/mol) .Scoring functions originally proposed By Gehlhaar et al. and later extended by Yang et al. The scoring Function was further improved to include new charge schemes and hydrogen bonding term [37].

MolDock [35] is an implementation of Evolutionary algorithm (EA), focused on molecular docking simulations [38]. Computational approximations of an evolution process, called genetic operators, are applied to simulate the permanence of the most favorable features. In a sample space, where there is a problem or a search routine and many different possible solutions (candidates), each option is ranked based on a set of parameters (scoring function, or fitness function), and only the best ranked solutions are kept for the next iteration. This process is repeated until an optimal solution can be found.

The program MolDock makes use of a slight variation of the EA, which is called guided differential evolution algorithm. This methodology is based on an EA modification called differential evolution (DE), which brings a different method to choose and alter candidate solutions (individuals). The major original idea in DE is to generate offspring from a weighted difference of parent solutions. The DE works as follows. In the first step, all individuals are initialized and evaluated according to the fitness function. Afterward, the following process will be carried out if the termination condition is not satisfied. For each individual in the population, an offspring is created by adding a weighted difference of the parent solutions, which are randomly chosen from the population. After that the offspring replaces the parent, if and only if it is fitter. Otherwise, the parent survives and is passed on to the next generation (iteration of the algorithm). The termination condition is reached when the current number of fitness (energy) evaluations performed exceeded the maximum number of evaluations allowed (max evaluations parameter setting). Furthermore, early termination was permitted if the variance of the population was below a certain threshold (0.01 here). Moreover guided differential evolution employs a cavity prediction algorithm to limit predicted conformations (poses) during the search procedure. More specifically, if a candidate solution is placed outside the cavity, it is translated so that a randomly chosen ligand atom will be located within the region spanned by the cavity. (Figure 3) shows the cavities predicted by MolDock. Obviously this strategy is only employed if a cavity has been found. If no cavities are reported, the search process does not limit the candidate solutions.

To obtain better potential binding sites in the α -amylase (PDB ID: 1XV8), a maximum of five cavities was detected using default parameters. The volume and surface area details were given as (Table 1). The volume of cavity 1 was found to be highest than the other cavities, also we found that the reference ligand of α -amylase is fixed in cavity 2. Out of the detected cavities, cavity 1 and 2 was selected for further studies (figure 3). The chosen cavity was further refined using side chain minimization by selection of an add-visible option set at a maximum of 10,000 steps per residue and at a maximum of 10,000 global steps. The grid resolution was 0.30 Å; the max iterations were 1,500; the max population size was 50 and the energy threshold was 100.

Table 1. Chemical properties of our cavities

Cavities	Volume Å ³	Surface Å ²
Cavity 1	141.312	411.84
Cavity 2	42.496	170.24
Cavity 3	34.304	142.08
Cavity 4	32.256	154.92
Cavity 5	24.064	92.16

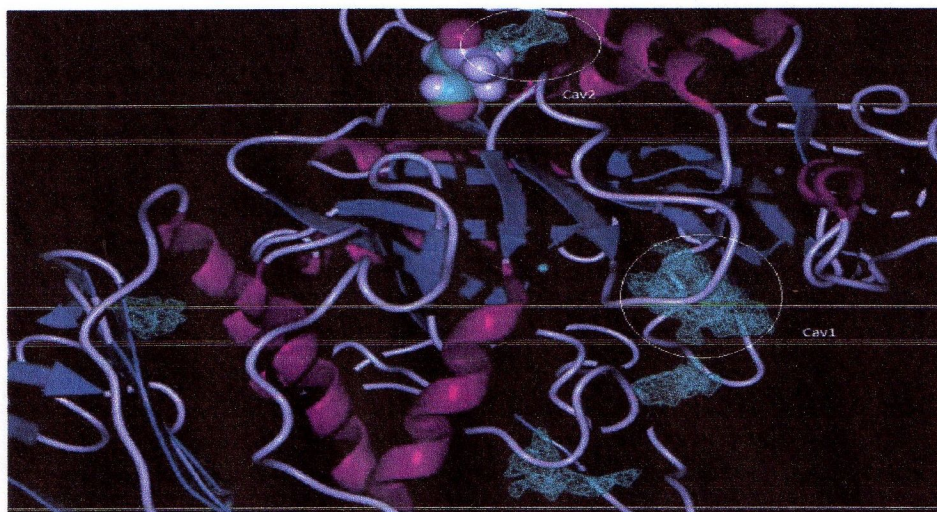


Fig.3. Graphical interface with the cavities (cavity 1 and cavity 2 indicated by ellipses) identified by MolDock.

RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Chemical properties of ligands:

In this *in silico* analysis, the basic goal is to analyze the interaction between the α -amylase with a number of food dyes. Although only tartrazine was reported to have reductive activity against α -amylase, it is also a part of this work to assess such property *in silico* for other food dyes, for which the activity against α -amylase has not been experimentally evaluated out.

Table 2: summarizes the chemical properties of compounds used in docking experiments. The conformer energy value of (B) was found to be less than the other ligands, which explain: (B) has the most stable structure. In the other hand topological polar surface area for the dataset were greater than 966.20 \AA^2 and lesser than 1179.94 \AA^2 indicating a high possibility of complete absorption [39].

Table 2. Chemical properties of our compounds

Compound	Conformer energy (kcal/mol)	Volume \AA^3	Surface \AA^2
A	-188.381	1179.94	679.56
B	-251.823	1166.72	656.32
C	-159.076	1160.52	705.05
D	-165.351	1018.09	619.10
E	-257.471	966.20	580.94

1.2 Molecular Docking Analysis

a. Part 1: Results: Interaction of free ligands with α -amylase in the both cavities

To gain more details of the possible binding mode of the compounds and the interacting residues of the α -amylase enzyme (PDB ID: 1XV8), we performed molecular docking analysis. The molecules were docked into the activator binding site using the crystal structure of (Protein Data Bank code: PDB ID: 1XV8).

Table 3. Docking results of free ligands with α -amylase in the both cavities.

	Cavity 1			Cavity 2		
	MolDockScore ^a	Interaction ^b	H-bond	MolDock Score ^a	Interaction ^b	H-bond
A	-115.227	-127.464	-5.234	-120.863	-132.882	-4.373
B	-125.352	-129.437	-3.030	-137.174	-153.394	-7.089
C	-140.226	-146.618	-15.272	-142.101	-151.698	-10.231
D	-103.239	-116.030	-5.585	-126.009	-137.292	-7.410
E	-117.944	-134.071	-3.235	-148.422	-161.116	-10.878

^a MolDock score calculated by summing the external ligand interaction (protein-ligand interaction) and internal ligand interaction score using Virtual Molecular Viewer 1.2.0.

^b The total interaction energy between the pose and the target molecules(s).

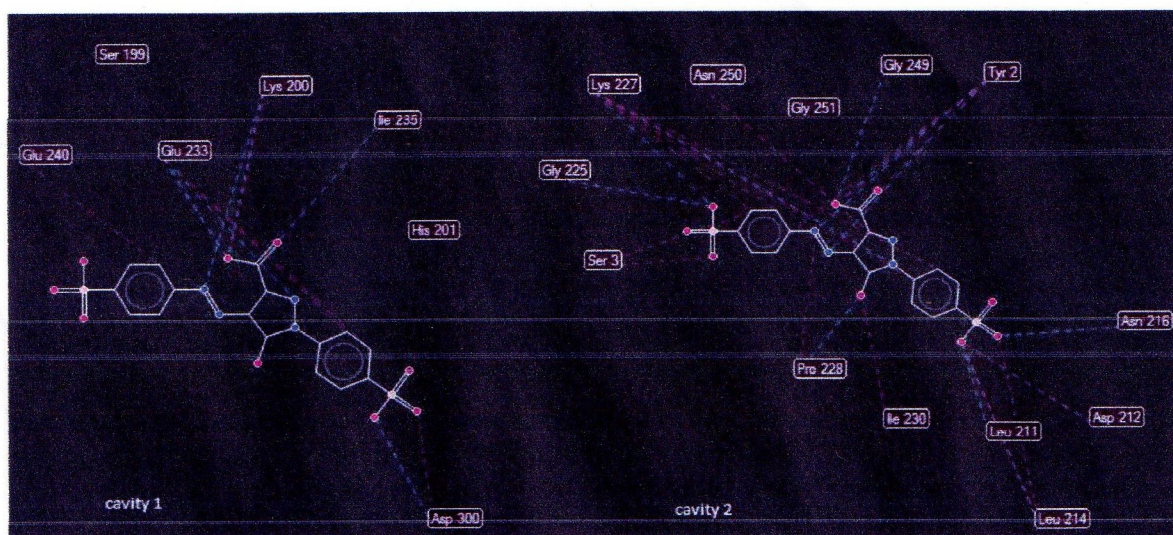


Fig.4. Predicted protein-ligand contacts of tartrazine in both cavities (—: H-bond interactions, —: steric interactions).

The free ligands-receptors, and their corresponding docking results are listed in Table 3, and receptor-ligand interactions demonstrated in Figure 4. In these docking experiments, all selected ligands were able to bind with α -amylase in both cavities. In cavity 2 Amaranth (E) showed the highest binding affinity (MolDockScore kcal/mol) at -117.944, followed by Tartrazine (C), Cochineal red A (B), Sunset Yellow (D) and Ponceau 4R (A) respectively. A similar pattern of binding affinity was found for ligands in cavity 1, except for Amaranth (E). Tartrazine (C) had the highest binding affinity at -140.226 kcal/mol followed by Cochineal red A (B), Amaranth (E), Cochineal red A (B), and Ponceau 4R (A) respectively.

If we compared between the two cavities, it was noted that tartrazine for example (figure 4) in the cavity 2 establish multiple interactions enzyme-substrate, which gives it great stability. For these reasons, we can deduce that cavity 2 is more favorable than cavity 1. These give us an idea on the mechanism of inhibition the azo dyes against α -amylase.

All these results support an assumption 1 (previously specified above), that azo dyes play a crucial role as competitive inhibitor, but without ignored the second assumption since we found a quite important affinity of these inhibitors in a cavity 1.

The models revealed the possible binding orientation when ligands were docked into the empty α -amylase enzyme and also showed that ligands were anchored to the binding pocket via similar fashion (figure 5).

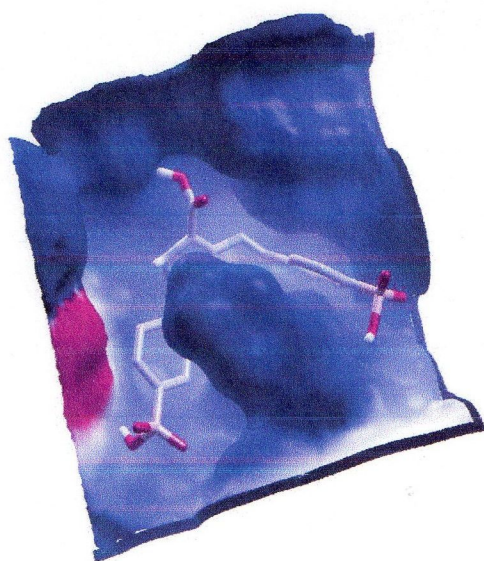


Fig. 5. Tartrazine is anchored to the binding pocket.

The hydroxyl and amino groups of ligands were hydrogen bonded to the backbone amide proton and the carbonyls of α -amylase. They could also be involved in additional hydrogen bonding with the side chain of polar amino acid of α -amylase enzyme. All the compounds showed negative MolDock score values and most of them formed hydrogen bonds (up to ~ 3.2 Å) with the protein residues.

Tartrazine interacted with the α -amylase by forming hydrogen bonds as shown in (Figure 6). The hydroxyl groups OH₂₂, OH₂₇ and OH₃₀ of tartrazine were hydrogen bonded to the backbone carbonyl group of Asp-212, Leu-214 and Tyr-2 and Gly-225 respectively

Therefore, in general, both hydroxyl and amino groups of these molecules are important for their interaction with α -amylase.

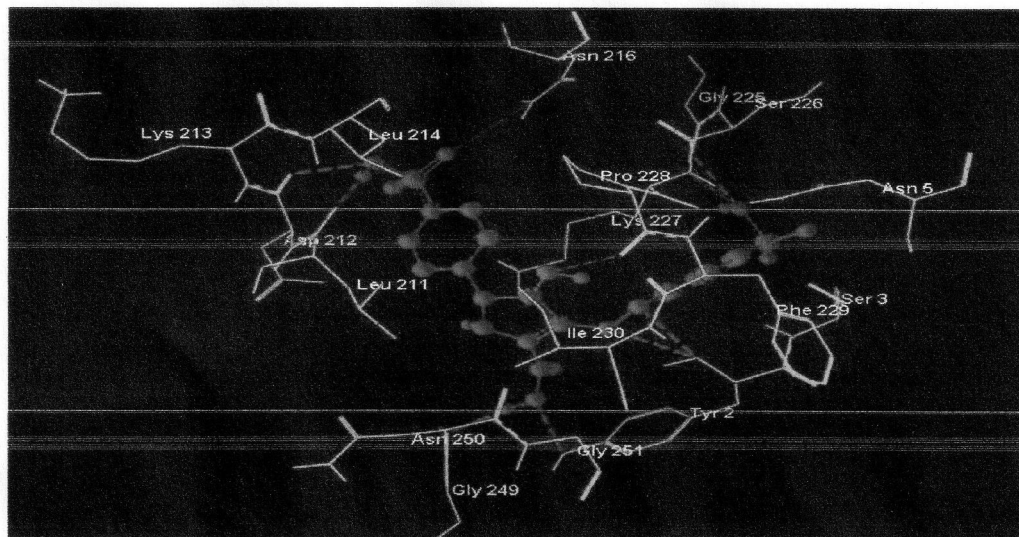


Fig.6. The binding mode between selected ligand (C) with binding site of α -amylase. Key residues and hydrogen bonds were labeled.

Table 4 showed the exact hydrogen bond length between the selected compound (C) and the keys residues of α -amylase.

Table 4. Hydrogen bond lengths

groups	OH ₂₂			O ₂₁	OH ₃₀		γ N=N ₈	OH ₂₇	OH ₂₄	N ₁₁	
residues	Asp212	Leu211	Leu214	Asn216	Gly225	Ser226	Tyr2	Tyr2	Gly249	Lys227	Pro228
Length (Å)	2.57	3.04	2.88	3.39	2.96	3.06	2.65 2.77	2.77	3.03	3.44	2.41

b. Part 2: Results: Interaction of free and complexed ligands with α -amylase in cavity2

The five complexed ligands could be docked on the α -amylase, with energies of interaction per subunit ranging between -87.564 and -122.503 kJ.mol⁻¹ (Figure 7).

Figure 8: showed the change interactions between free and complexed Sunset Yellow with the residues of α -amylase.

On docking complexed Sunset Yellow for example is showing bad binding to α -amylase enzymes suggesting that its mechanism of inhibition might be changing in presence copper ions. It was found that the copper changes the conformation of the dye and subsequently the interactions are modified. We note that there appear a new copper-Ile230 interaction and the disappearance of other H-bond interaction, which explains the destabilization of the enzyme-substrate complex by the existence of copper.

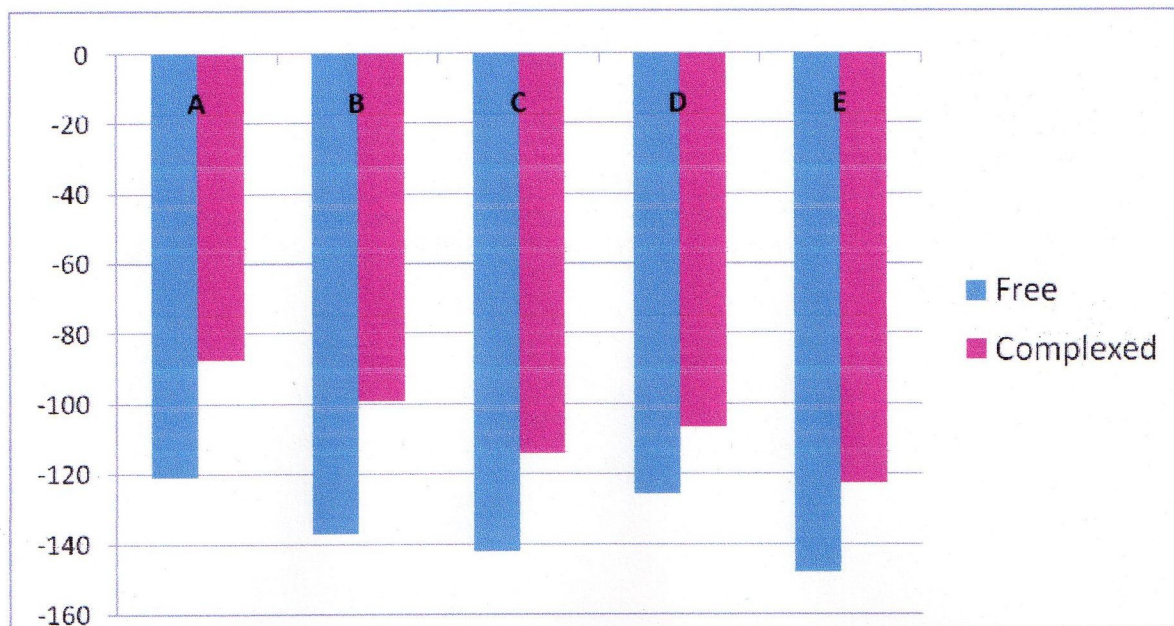


Fig.7. Graphical representations of MolDock Score values of free and complexed ligand with α -amylase in cavity 2.

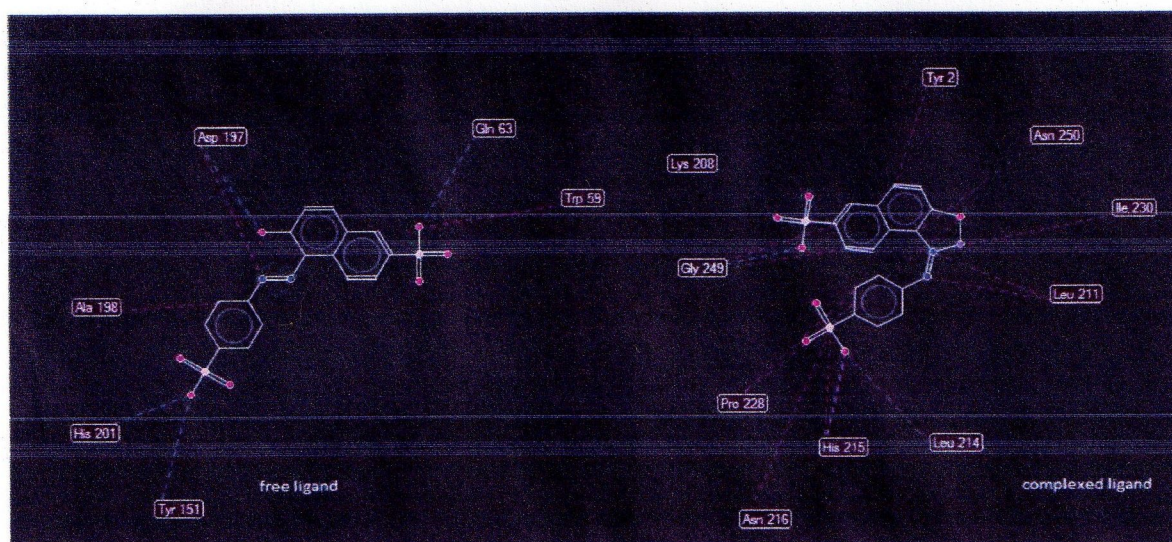


Fig.8. Predicted protein-ligand contacts of Sunset Yellow in cavity 2 (—: H-bond interactions, —: steric interactions).

CONCLUSION

The results presented in this paper show that, α -amylase is active to break down starch macromolecules into dextrans, with sufficient hydrolysis occurring to make the products soluble and not susceptible to gelling upon cooling. Specifically, α -amylase EC 3.2.1.1. (1,4, α -D-glucan glucohydrolase) catalyses the hydrolysis of α -1,4 glucosidic linkages in polysaccharides of three or more α -1,4 linked D-glucose units to produce maltose and larger oligosaccharides [40]. There are several evidences indicating that α -amylase play an important role in oral cavity, but copper released from dental amalgam can be directly affect host responses by inhibiting α -amylase activity in presence the food dyes. Also there are a group of compounds such as foods and drugs containing azo function which show good binding affinities with the α -amylase enzyme, why we recommend to avoid using α -amylase with azo dyes and especially for people who have dental amalgams (for example MAXILASE®). In the last our findings show that the activity of oral salivary (α -amylase) may be modulated by metal ions present in the oral environment.

REFERENCES

- [1] D. Brune, *Scand. J. Dent. Res.*, **1991**, 89, 506-514.
- [2] S. J. Jensen, *Scand. J. Dent. Res.*, **1983**, 9, 325-333.
- [3] B.De. Johansson, T. Hrand, *Scand. J. Dent. Res.*, **1983**, 91, 320-324.
- [4] R. G. Saratale, , G. D. Saratale, J. S. Chang, S. P. Govindwar, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.*, **2011**, 42, 138-157.
- [5] H. Zollinger, , *Colour Chemistry—Synthesis, Properties of Organic Dyes and Pigments*. VCH Publishers, New York, USA, **1987**, 92.
- [6] J. S.C. Chang, Y. Chou, J. Ho. Lin, and T. L. Hu. *Water. Res.*, **2001**, 35, 2041-2850.
- [7] R. G. Saratale, G. D. Saratale, , J. S. Chang, ,S. P. Govindwar. *J. Hazard. Mater.*, **2009**, 166, 1421-1428.
- [8] X. Zhao, I. R. Hardin. *Dyes Pigments.*, **2007**, 73, 322- 325.
- [9] J. S. Chang, , T. S. Kuo, , Y. P. Chao, , J. Y. Ho, P. J. Lin, *Biotechnol. Lett.*, **2000**, 22, 807-812.
- [10] S. B. Tara, R. R. Bidhan, M. Biswadev, *J. Sci. Fd Agric.*, **1977**, 28, 405-414.
- [11] B. Z. Thalita, A. C. Arnaldo, V. B. Z. Maria, A. P. F. Antonio. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (BJPS)*, **2010**, 46, 723-730.
- [12] G. D. Misra, D. Gautam, R. K. Sinha. *J. Fd. Sci. Technol.*, **1985**, 22, 209.
- [13] A. Van Nieuw Amerongen, J. G. M. Bolscher, E. C. I. Veerman, *Caries Res.*, **2004**, 38, 247-253.
- [14] A. Zalewska, K. Zwierz, K. Zołkowski, A. Gindzienski, *Acta. Biochim. Polonica.*, **2000**, 47, 1067-1079.
- [15] S. P. Humphrey, R. T. Williamson, *J. Prosthet. Dent.*, **2001**, 85, 162-169.
- [16] R. F. Troxler, G. D. Offner, T. Xu, J. C. Vanderspek, F. G. Oppenheim, *J. Dent. Res.*, **1990**, 69, 2-6.
- [17] K. De Smet, R. Contreras, *Letts.*, **2005**, 27, 1337- 1347.
- [18] Y. Lu, A. Bennick, *Arch. Oral. Biol.*, **1998**, 43, 717-728.
- [19] Y. L. Sua, L. K. Leunga, Y. Huangb. Z. Y. Chena, *Food. Chem.*, **2003**, 83, 189-195.
- [20] J. Dai, A. Gupte, L. Gates, R. J. Mumper, *Food, Chem Toxicol.*, **2009**, 47, 837-847.
- [21] D. K. Colin, A. Paul. A. C. Kroonand, *Mol. Nutr. Food. Res.*, **2009**, 53, 92-101.
- [22] Y. J. Wang, M. H. Pan, A. L. Cheng, L. I. Lin, Y. S. Ho, C. Y. Hsieh, *J. Pharm Biomed. Anal.*, **1997**, 15, 1867-1876.
- [23] Y. Jiang-Wu, L. Feng, T. Tao, L. Chang-Jian, *Arch. Oral. Biol.*, **2011**, 56, 285-293.
- [24] C. A. Francis, M. P. Hector, G. B. Proctor, *Arch. Oral. Biol.*, **2000**, 45, 601-606.
- [25] T. Noda, S. Furuta, I. Suda, *Carbohydr. Polym.*, **2001**, 44, 189-195.
- [26] T. Nalan, K. Tülden, D. Adil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.*, **2012**, 78, 16-23.
- [27] M. Froimowitz, *Biotechniques.*, **1993**, 14, 1010-1013.
- [28] M. J. Frisch, , G.W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, , J. R. Cheeseman J. A. Montgomery Jr, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, , S. S. Iyengar, , J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, , G. A. Petersson, , H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, , R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, , Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. X. Li. Klene, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, , Gaussian 03, Revision C.02, Gaussian, Inc., 340 Quinipiac Street, Building 40, Wallingford, CT, 06492, **2004**, (Copyright C 1994-2003).
- [29] S. Z. Fisher, L. Govindasamy, C. Tu, M. Agbandje-McKenna, D.N. Silverman, H.J. Rajaniemi, R. McKenna, *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **2006**, 62, 88-93.
- [30] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, , G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, , I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, 235-242.
- [31] E. F. F. da Cunha, R. C. A. Martins, M. G. Albuquerque, *J. Mol. Mod.*, **2004**, 10, 297-304.
- [32] F. F. da Elaine, F. B. Edilaine, A. O. Aline, C. R. Teodorico, *J. Biom. Struct Dyn.*, **2010**, 27, 619-625.
- [33] T. C. Ramalho, M. V. J. Rocha, E. F. F. da Cunha, M. P. Freitas, *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2009**, 19, 1193-1228.
- [34] G. Kroyer, *Ernahrung.Nutr.*, **1986**, 10, 465-472.
- [35] R. Thomsen, M. H. Christensen, *J. Med. Chem.*, **2006**, 49, 3315-3321.
- [36] B. D. Bursulaya, M. Totrov, R. Abagyan, C. L. Brooks, *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, **2003**, 17, 755-763.
- [37] H. Schulz, E. Dale, Y. Karimi-Nejad, C. Oefner, *J. Mol. Biol.*, **2009**, 385, 178-187.
- [38] D. E. Goldberg, *Genetic Algorithms in Search, Optimization, and Machine Learning*, Addison-Wiley, New York, 1989.
- [39] K. Palm, P. Stenberg, K. Luthman, P. Artursson, *Pharm. Res.*, **1997**, 14, 568-571.
- [40] J.Y. Yoo, J. Hong, R.T. Hatch, *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, 30, 147-157.

Résumé :

Le but de ce travail, est d'étudier deux types d'interactions moléculaires via plusieurs approches théoriques (Mécanique quantique, Mécanique moléculaire et Docking moléculaire). Dans un premier temps, nous avons traité le mode d'interaction des colorants avec des ions métallique (Cu(II) et Hg(II)), où nous avons obtenu que les complexes de mercure qui été toxiques, facile a formé et plus stable par apport aux ceux de cuivre. Dans un second temps, nous avons réalisé l'étude des interactions entre les colorants et les enzymes par la technique de Docking moléculaire pour identifier les colorants qui possèdent la meilleure inhibition d'activité à travers de deux types d'enzymes, à savoir l'enzyme PTP1B possède une meilleur inhibition d'activité par les colorants L₁ et L₅ et l'enzyme α -amylase qui possède également une inhibition sous l'effet de la présence des complexes de cuivre.

Mots-clés : modélisation moléculaire, colorants, DFT, métaux lourds, interactions.

Abstract :

The aim of this work is to study two types of molecular interactions via several theoretical approaches (Quantum Mechanics, Mechanics Molecular and Docking Molecular). At first time, we treated the mode of interaction of dyes with metal ions (Cu (II) and Hg (II)), where we obtained that the complex of mercury was toxic, easily formed and stable then contribution to the copper. In a second step, we carried out the study of the interactions between dyes and enzymes for molecular docking technique to identify dyes that have the best inhibition activity through two types of enzymes, namely PTP1B has a better enzyme inhibition activity by the dyes L₁ and L₅ and the α -amylase, which also has an inhibiting effect in the presence of the copper complex.

Key-words: molecular modeling, dyes, DFT, heavy metals, interactions.

الملخص:

الهدف من هذا العمل هو دراسة نوعين من التفاعلات الجزيئية باستعمال الطرق النظرية (ميكانيكا الكم، الميكانيكا والالتحام الجزيئي)، في البداية، عالجنا طريقة تفاعل ملونات مع ايونات المعادن (النحاس (II) و الزئبق (II))، حيث تحصلنا على معقدات تتكون من الزئبق السام، والتي تشكلت بسهولة و بصفة مستقرة مقارنة مع المعقدات التي تكونت مع النحاس. الخطوة الثانية، أجرينا دراسة التفاعلات بين الملونات والأنزيمات وذلك باستعمال الالتحام الجزيئي لتحديد الملون الذي لديه أفضل تثبيط

النشاط الموجود في أنزيمان مختلفان. فبالنسبة لانزيم PTP1B لديه أفضل تثبيط لنشاط من قبل L₁ و L₅ اما بالنسبة لانزيم- α اميلاز لديه تثبيط لنشاطه و ذلك بوجود معقدات النحاس

الكلمات المفتاحية: النمذجة الجزيئية، الملونات، DFT، المعادن الثقيلة، التفاعلات،