

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° d'ordre:

N° de série :

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Option : Biochimie Moléculaire et Santé

Thème

**Etude *in silico* de la 5-lipoxygénase en tant qu'enzyme impliquée
dans les maladies inflammatoires**

Présenté par :

BOUTRIF Chams Eddine

MERDASSI Abderraouf

Dirigé par

Pr .BENSEGUENI Abderrahmane.

Soutenu : 22/06/2014

Devant le jury

Président : Mr. CHIKHI A.

Rapporteur : Mr. BENSEGUENI A.

Examineur : Mr. MOKRANI E, H.

Pr. Université Constantine 1.

Pr. Université Constantine 1.

M.A.B Université Constantine 1.

2013-2014

REMERCIEMENTS

Tout d'abord merci beaucoup Dieu de nous donner la patience et la force et le courage pour compléter ce travail.

*Il Nous est agréable d'exprimer nos remerciements le plus sincère a notre encadreur Mr .**BENSEGUENI Abderrahmane**, Maître de Conférence à l'université Constantine 1, pour son aide, sa confiance, ses orientations judicieuses et sa disponibilité.*

*C'est avec un grand plaisir que nous remercions Mr **CHIKHI Abdelouahab**, Maître de Conférence à l'université Constantine 1 pour l'honneur qu'il nous fait en présidant le jury de mémoire.*

*Nous tenons à adresser notre profonde reconnaissance à Mr **MOKRANI EL Hassen**, Maître assistant B à l'université Constantine 1, d'avoir accepté de faire partie du jury, ainsi sa contribution à la réalisation de la partie pratique, pour ces nombreux conseils tout le long de travail.*

Nous tenons à exprimer notre gratitude à tous ceux qui étaient à nos côtés au cours de cette expérience.

Table de matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations page

Introduction 1

CHAPITRE 1- Le docking moléculaire

1 Reconnaissance moléculaire 2

1.1. Les forces de Van der Waals..... 2

1.2. La liaison hydrogène 3

1.3. L'effet hydrophobe 3

1.4. Interactions électrostatiques 4

2. Le Docking moléculaire..... 4

3. Applications de docking..... 5

4. Les outils du docking moléculaire..... 5

4.1 .Le récepteur 5

4.2 Le(s) ligand(s) 6

4.3 Un programme de docking moléculaire 7

5. Principe théorique de docking 8

6. Algorithmes de docking..... 9

6.1. Méthodes systématique..... 9

6.2. La méthode stochastique..... 9

7. Les fonctions de score..... 10

7.1 Les fonctions de score basées sur un champ de force..... 10

7.2. Les fonctions de score empiriques 10

7.3. Les fonctions de score basées sur des connaissances statistiques..... 11

7.4. Les fonctions consensus 11

CHAPITRE 2- La 5-lipoxygénase et ses inhibiteurs

1. La lipoxygénase 12

2. L'enzyme 5-lipoxygénase.....	12
2.1 La structure.....	12
2.2 Expression génique.....	13
2.3 Le site actif.....	13
3. La voie métabolique de 5-LOX	14
3.1. Biosynthèse des leucotriènes.....	14
3.2. Distribution tissulaire des enzymes impliquées dans cette voie.....	16
4 Les inhibiteurs de la 5-lipoxygénase.....	17f
4.1. Inhibiteurs redox ou antioxydants	17
4.2. Inhibiteurs chélateurs du	
fer.....	17
4.3 .Les inhibiteurs non-redox	18
4.4. Classes d'inhibiteurs mixtes.....	19
4.5. D'autres inhibiteurs de 5LOX.....	23

CHAPITRE 3 - Matériels et méthodes

1. Matériels	24
1.1 Micro-ordinateur.....	24
1.2. Programmes.....	24
1.2.1 AutoDock.....	24
1.2.2 Titan.....	24
2 .Méthodes.....	24
2.1. Préparation du récepteur.....	24
2.2. Préparation des ligands	25
2.3. Calcul des grilles de potentiel.....	25
2.4. La recherche des solutions d'amarrage.....	26
2.5. Analyse des résultats	27

CHAPITRE 4 - Résultats et discussions

1. Fiabilité de programme utilisé	28
1.1 RMSD.....	28

1.1 L'analyse visuelle.....	29
1.3 Le coefficient de corrélation.....	30
1.4 Conclusion	31
2. Etude des interactions de l'acide caféique et de ZD 2138 avec la 5-lipoxygénase.....	32
2-1 Règle de Lipinski	32
2.2 Interactions acide caféique – 5-lipoxygénase.....	33
2.3 Interactions ZD 2138 – 5-lipoxygénase.....	34
3. Substitutions de l'acide caféique et le ZD 2138	34
3.1 Etude du composé 12 (la molécule de départ l'acide caféique).....	37
3.2 Etude de composé 8 (la molécule de départ le ZD 2138).....	38
4. Application de la règle de Lipinski sur le composé 12 et le composé 8.....	39
Conclusion et perspectives.....	41
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des figures

Page

Figure 1 : Les forces de Van der Waals.....	2
Figure.2 : La liaison hydrogène.....	3
Figure .3 : Interaction hydrophobe.....	4
Figure 4 : Interactions électrostatiques	4
Figure 5 : Comparaison des programmes de docking les plus cités.....	8
Figure 6 : Principe générale d'un programme de docking.....	9
Figure 7 : Structure de la 5-lipoxygénase protéine d'activation.....	13
Figure 8 : Le site actif de 5-LOX.....	14
Figure 9 : Biosynthèse de Leukotriene.....	15
Figure 10 : Structure de leucotriène.....	15
Figure11 : Métabolisme transcellulaire du LTA4 à partir d'un leucocyte polymorphonucléaires.....	16
Figure 12 : Structure et IC ₅₀ de NDGA et Bis-catéchol (inhibiteur redox).....	17
Figure 13 : Acide arylhydroxamique et leur IC ₅₀	18
Figure 14 : Structure de Zileuton (inhibiteur chélateurs du fer).....	18
Figure 15 : Position de la boîte d'amarrage dans le site actif de la 5LOX.....	26
Figure 16 : Résultat du RMSD en (%) obtenus par AutoDock.	28
Figure 17 : Superposition du ligand X8Z du complexe 2X8Z donné par rayons-X (coloré en move) et par docking moléculaire (coloré en vert) avec AutoDock.....	29
Figure 18 : Comparaison des géométries de l'inhibiteur EAL du complexe 1UZE données par rayons-X (coloré en move) et par docking (coloré en vert) avec AutoDock.....	29
Figure 19 : Comparaison de la géométrie de BNX1 du complexe 3QCG donnée par rayon-X (coloré en move) avec celle obtenue par docking moléculaire (coloré en vert)	30
Figure 20 : Corrélation entre l'activité biologique (Log IC ₅₀) de 25 inhibiteurs et leur énergie d'interaction avec la 5-LOX par AutoDock.	31
Figure 21 : Mode de liaison de l'acide caféique avec le site actif de 5-LOX.....	33

Figure 22 : Mode de liaison de ZD 2138 avec le site actif de 5-LOX.....	34
Figure 23 : Structure de l'acide caféique avec les nouvelles substitutions.....	35
Figure 24 : Structure de ZD 2138 avec les nouvelles substitutions.....	36
Figure 25 : Mode de liaison de composé 12 avec le site actif de 5-LOX.....	38
Figure 26 : Mode de liaison de composé 8 avec le site actif de 5-LOX.....	38

Liste des tableaux

Page

Tableau 1 :Adresses des principaux programmes de docking moléculaire.....	8
Tableau 2 : Méthoxyéthylthiazole et son évolution.....	19
Tableau 3 : Structure et IC ₅₀ de ZD-2138.....	19
Tableau 4 : Structures et activité des inhibiteurs mixtes.....	20
Tableaux 5 : Quelques inhibiteurs de la 5-lipoxygénase.....	21
Tableau 6 : Résultat de l'analyse entre les énergies d'interactions de 25 inhibiteurs de la 5LOX et leur activité biologique (log IC ₅₀).....	31
Tableau 7 : Résultats de la règle de Lipinski sur les deux composés.....	32
Tableau 8 : Résultats de la substitution à partir de l'acide caféique et de ZD 2138.....	37
Tableau 9 : Résultats de la règle de Lipinski sur les deux composés (12 et 8).....	39

Liste des abréviations

3D : Trois dimensions.

5 HETE : 5-hydroxy-eicosatétraénoïque 5 HETE.

5 HPETE : 5-hydroxy-peroxy-acide eicosatétraénoïque.

5-LOX / 5-LO : 5-lipoxygénase.

Å: Angström.

ADME-T : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité.

ADT : AutoDock Tools.

AGL : Algorithme Génétique Lamarkien.

AM1: Austin Model 1.

Dlg: Docking LoG file.

Dpf: Dock Parameters File.

GHZ: Giga hertz.

Glg: Grid LoG file.

Go: Giga octet.

GOLD: Genetic Optimisation for Ligand Docking.

IC₅₀: Inhibitory Concentration 50.

KDa: Kilo Dalton.

Ki: Constante d'inhibition.

logP : Le coefficient de partition octanol / eau.

LT : leucotriène.

PDB : Protéine Data Bank.

r : Coefficient de corrélation linéaire.

RMSD: Root Mean Square Deviation.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

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 deux molécules. De même, la découverte de nouvelles drogues 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 de "amarrage" ou "docking" moléculaire ont été développées.

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, où la plupart des principes actifs sont de petites molécules appelés ligand qui interagissent avec une cible biologique macromoléculaire d'intérêt thérapeutique, généralement un acide nucléique ou une protéine désigné par le terme récepteur [1].

Le but de cette étude est :

- De tester, dans un premier temps, la fiabilité de programme AutoDock utilisé dans cette étude pour examiner les interactions protéine-ligand pour cela, nous suis de deux critères :
- le RMSD (*Root Mean Square Deviation*) ou déviation de la structure du ligand donné par docking par rapport à la structure existant dans la PDB (Protein Data Bank)
- le coefficient de corrélation observe par régression linéaire avec l'IC₅₀ des ligands par la littérature et leur énergie d'interaction obtenue par docking moléculaire avec l'enzyme 5LOX.
- d'étudier dans un deuxième temps les mécanismes d'inhibition de la 5-lipoxygénase par les méthodes de docking moléculaire.

Dans cette étude préliminaire, nous nous intéresserons uniquement aux mécanismes d'interactions des deux inhibiteurs présentant la meilleure et la plus faible activité biologique en vue de développer d'autres ligands de la 5-lipoxygénase davantage plus efficaces

Nous présenterons ce travail selon quatre chapitres. Dans le premier chapitre, nous nous intéressons à l'apport de la modélisation moléculaire dans l'étude des interactions protéine-ligand. Le second concerne présentation de la 5-lipoxygénase ainsi qu'à ses inhibiteurs connus à travers les articles. Nous présentons, dans le troisième chapitre, les différents matériels et méthodes utilisés dans cette étude. Enfin le dernier chapitre expose l'essentiel de nos résultats et une discussion.

CHAPITRE 1

Le docking moléculaire

CHAPITRE 1 : Docking moléculaire

1. Reconnaissance moléculaire

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes.

Les états conformationnels choisis lors de l'interaction ne sont pas nécessairement ceux de plus basse énergie en solution, mais des états transitoires stabilisés par celle-ci. Les complexes formés sont alors plus stables que les formes dissociées. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes. Au niveau du processus biochimique, elles s'expriment par différentes interactions : électrostatiques, hydrophobiques, de Van Der Waals et des ponts hydrogène [2].

Ces liaisons sont essentielles pour expliquer les propriétés des molécules biologiques. Du fait de leur faible énergie (généralement comprise entre 4 et 30 kJ/mol), elles peuvent se rompre et se rétablir très facilement à la température physiologique, permettant ainsi des interactions temporaires entre molécules [3, 4, 5].

1.1. Les forces de Van der Waals

Ces forces résultent de l'interaction des nuages électroniques d'atomes ou de molécules proches les uns des autres (**figure.1**). Pour des atomes distants de 3-4 Å, l'énergie de liaison est seulement comprise entre 0.4 et 4 kJ/mol. Les interactions de Van der Waals sont très faibles, mais dans le cas des macromolécules, leur nombre élevé va produire au total une force importante [3, 4, 5].

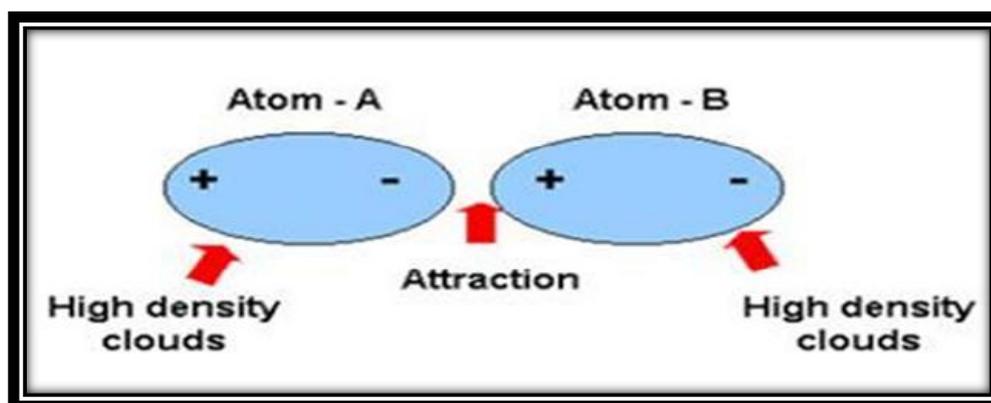
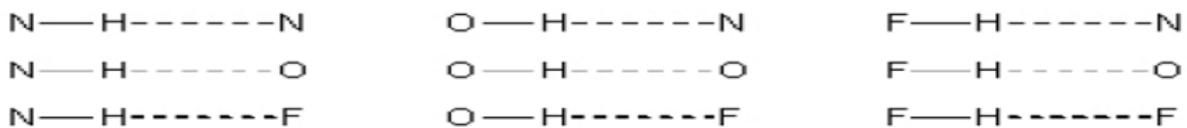


Figure 1 : Les forces de Van der Waals

1.2. La liaison hydrogène

Cette liaison, intervient lorsqu'un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome électronégatif (le donneur D) est attiré par un autre atome électronégatif (l'accepteur A). Le nuage électronique de l'hydrogène est attiré par l'atome donneur qui est relativement plus électronégatif que l'atome d'hydrogène créant ainsi une charge partielle positive sur l'hydrogène : $\delta^-D-H^{\delta+} \dots\dots A^{\delta-}$ (figure.2). Cette charge positive est attirée par la charge partielle négative portée par l'atome accepteur donnant ainsi naissance à une interaction désignée par pont hydrogène, sa force est de l'ordre de 12 à 30 kJ/mol. Elle agit, à très courte distance (0,8 à 2,8 Å°).

Les liaisons hydrogènes habituelles sont :



Les liaisons hydrogène sont peu nombreuses et s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°). Elle est définie par ; la distance entre les deux atomes qui forment la liaison covalente D-H de type δ , la longueur de l'interaction H...A et l'angle D-H...A [3, 4].

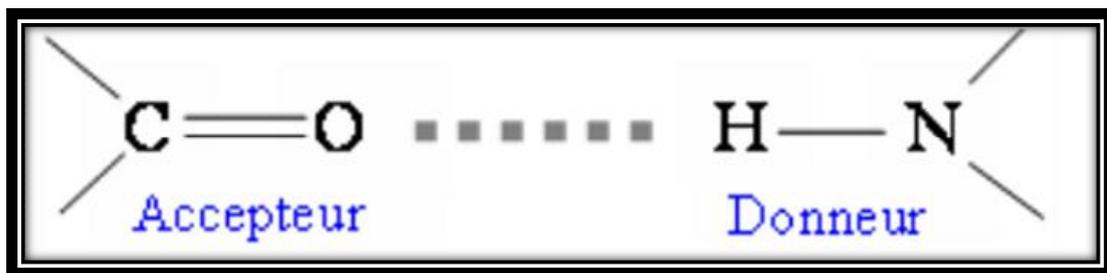


Figure.2 : La liaison hydrogène.

1.3. L'effet hydrophobe

Les molécules ou groupes non polaires ne sont pas capables de former de liaisons hydrogène et ne peuvent donc pas s'hydrater : on les nomme pour cette raison substances hydrophobes. L'effet hydrophobe est la tendance qu'ont ces groupes à se rassembler par coalescence de façon à minimiser les contacts avec l'eau (figure.3). La force des liaisons hydrophobes est de l'ordre de 20 à 30 kJ/mol [3, 4].

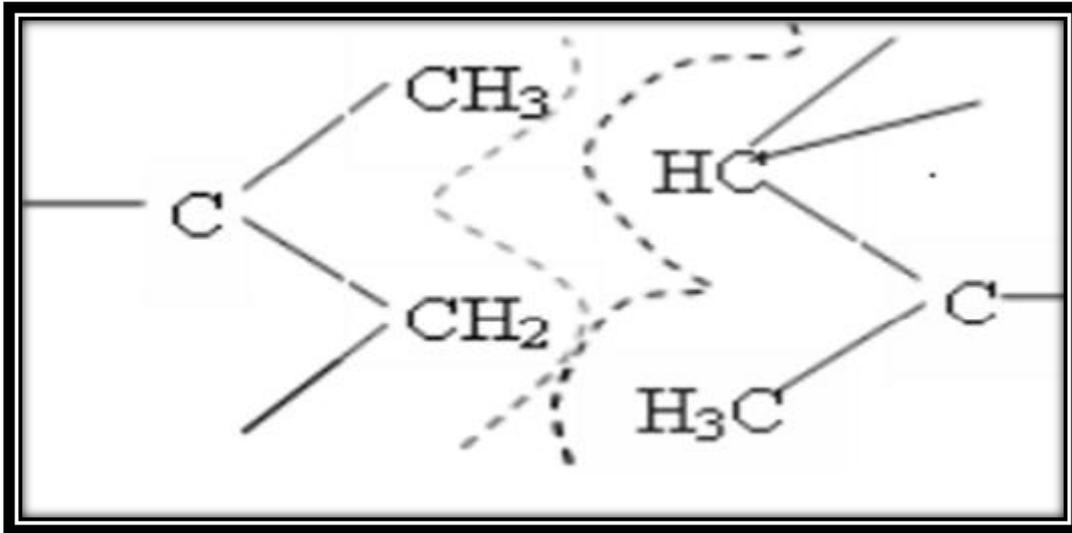


Figure .3 : Interaction hydrophobe.

1-4. Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques agissent à plus grande distance entre dipôles chargés (**Figure4**). La distance pour une liaison saline, par exemple, est de 3,7 à 4,5 Å, et sa force est de l'ordre de 8 Kcal/mol. En présence de solvant, ces interactions sont favorisées du fait de la polarité et de la petite taille de la molécule d'eau.

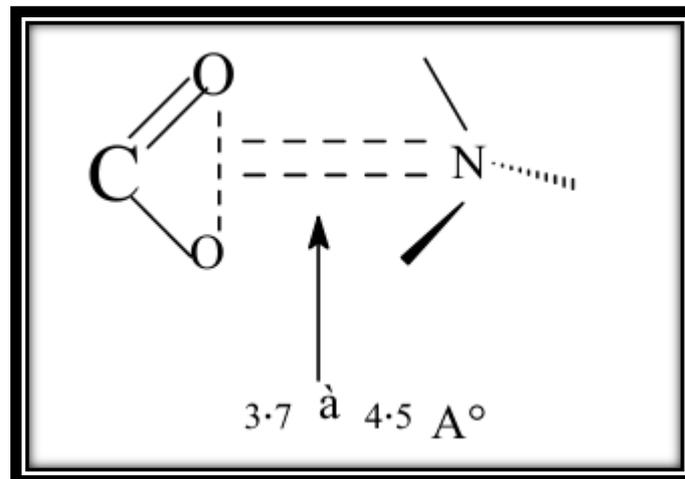


Figure 4 : Interactions électrostatiques

2. Le Docking moléculaire

Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur

macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand ». [5].

3. Applications de docking:

Il y a au moins deux applications principales au programme de Docking. La plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction, qui consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. L'autre utilisation consiste à optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur.

L'optimisation de la structure de ligands déjà connus peut avoir plusieurs raisons : l'amélioration de son affinité, de sa spécificité, de sa synthèse ou encore de ses propriétés ADME-T (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité).[6]

Le docking moléculaire a été appliqué avec succès sur un certain nombre de cibles thérapeutiques (protéines) dont la structure 3D en complexe avec le ligand a été parallèlement déterminée. Actuellement, un bon nombre de médicaments mis sur le marché proviennent d'une conception rationnelle basée sur des stratégies de criblage virtuel comme par exemple :

- Des inhibiteurs de l'adose réductase: par recherche dans des bases de données de composés [7].
- Un inhibiteur d'un élément de réponse de la trans-activation de la HIV-1 RNA: par docking rigide et recherche dans des bases de données de composés [7].
- Un inhibiteur de la thrombine et celui de la glyceraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase : par docking sur des chimiothèques combinatoires [8].

4. Les outils du docking moléculaire

4.1 .Le récepteur

Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la PDB («Protéine Data Bank », en anglais), la plus grande archive de données structurales de macromolécules biologiques, comme les protéines et les acides nucléiques (ARN et ADN). Cette banque de données a été établie en 1971 et contenait à l'époque sept structures [9]. En avril 2011, plus de 72300

structures 3D, dont environ 67000 structures de protéines sont disponibles et accessibles gratuitement. Elles ont été résolues pour la grande majorité par cristallographie aux rayons X (un peu plus de 63000 structures) du fait que cette technique présente de nombreux avantages, notamment celui de ne pas être limitée par la taille de la protéine. L'étape limitant de cette méthode se situe principalement au niveau de l'obtention de monocristaux diffractant à une résolution suffisante. La RMN fournit, quant à elle, plus de 8800 structures contre seulement 360 dans le cas de la microscopie électronique [10].

De nombreuses informations associées à chaque structure sont accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique via la PDB par un serveur internet (<http://www.rcsb.org/pdb/>). On peut y trouver la séquence correspondante, ses coordonnées atomiques, les conditions expérimentales (par exemple, la résolution), des images 3D...etc. Cette base de données est fiable car elle est vérifiée et maintenue par différents centres (RCSB, PDBj, MSD-EBI).

Les coordonnées atomiques des structures se trouvent dans un format de référence, appelé `pdb`, lu par différents logiciels de visualisation, de modélisation, de criblage virtuel...etc. Donc il suffit de consulter la PDB et d'inscrire le nom de la structure pour télécharger le fichier du récepteur au format `pdb` indispensable à l'opération de docking moléculaire.

Le fichier `pdb` contient diverses informations sur la macromolécule telle que le nom du récepteur, l'équipe qui a résolu la structure, la méthode expérimentale, ...etc. On y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéro-atomes (ligand, métaux, résidus modifiés, ...etc.), la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. Enfin, la dernière section du fichier fournit des informations sur les connections chimiques entre les atomes [9].

Il est important de signaler que certaines protéines ne sont pas encore disponibles dans cette banque de données et si cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, il devient alors possible de construire la structure 3D de la cible souhaitée, en utilisant la modélisation par homologie [11].

4.2 Le(s) ligand(s)

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules [12].

A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné : La première souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de données de structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimique [13].

Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que chemDraw, Arguslab, Titan ou Sybil pour ne citer que ces exemples.

Un ligand peut être :

1-Un substrat : molécule qui se fixe au site actif de la protéine ou de l'enzyme pour subir une action :(décarboxylation, hydrolyse, déshydrogénation ...).

2- Coenzyme : molécule qui complète l'action de certaines enzymes.

3-Activateur : composé chimique qui entraîne un changement de conformation du site actif de l'enzyme pour augmenter son affinité pour le substrat.

4- Inhibiteur : contrairement à l'activateur, ce type de ligand modifie la structure électronique du site actif diminuant l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

4.3 Un programme de docking moléculaire

Le docking moléculaire à pour objectif essentiels de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable du ligand au sein de son récepteur. Initié au début des années 1980, ce domaine s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs [14.15].

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles [1]. Les plus fréquemment cités sont respectivement: AutoDock [16], GOLD [17], FlexX [18], DOCK [19] et ICM [20] (voir figure 5).

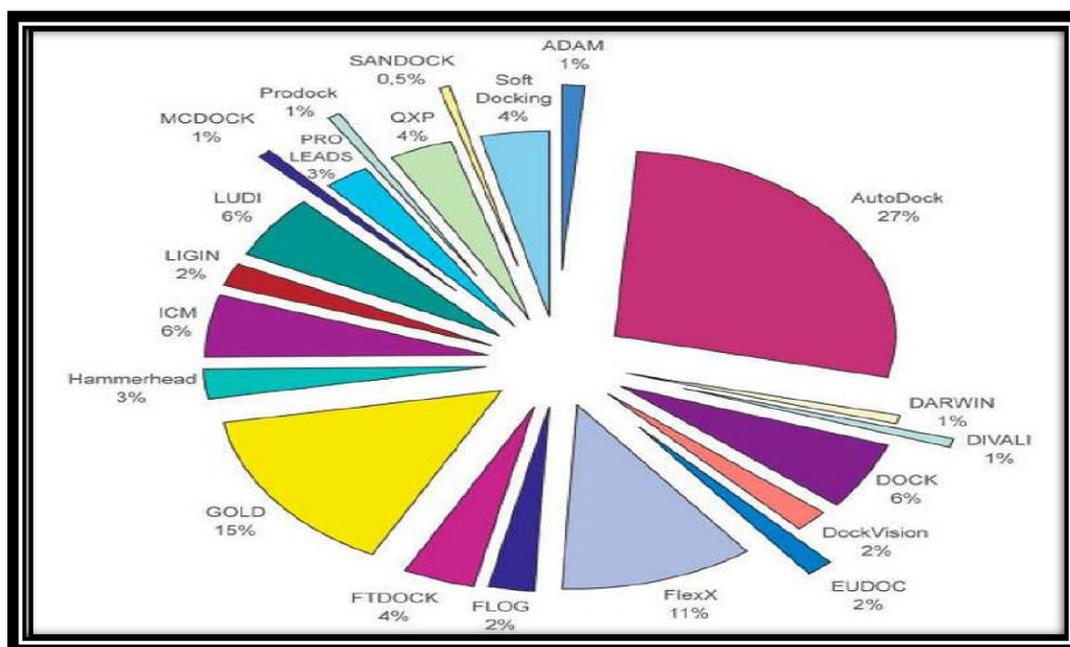


Figure 5 : Comparaison des programmes de docking les plus cités [21].

Tableau 1 : Adresses des principaux programmes de docking moléculaire [22].

Nom	Editeur	SiteInternet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

5. Principe théorique de docking

- La première (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.

- La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure réponse parmi toutes celles proposées [23, 24].

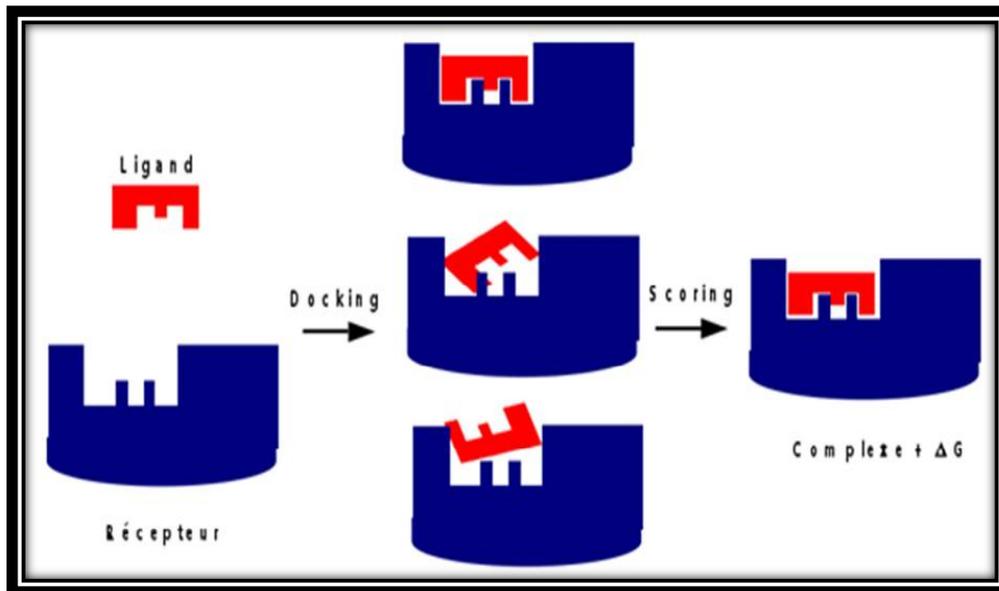


Figure 6 : Principe générale d'un programme de docking.

6. Algorithmes de docking

Il existe différentes méthodes qui permettent de prendre en compte la flexibilité du ligand notamment des méthodes systématiques et des méthodes aléatoires ou stochastiques.

6.1. Méthodes systématique

Le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs ancres sont définies. Dans un premier lieu, un [19, 25] ou plusieurs [26, 27] fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site actif et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion. Cette méthode a été incorporée dans plusieurs programmes dont Dock [19], FlexX [25] et Surflex [28].

6.2. La méthode stochastique

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand. Un des principaux algorithmes stochastiques est la méthode par

algorithme génétique. Cette méthode a été implémentée dans plusieurs programmes dont AutoDock et GOLD [17].

7. Les fonctions de score

Les différentes fonctions de score implémentées dans les programmes de docking ont fait l'objet de nombreuses publications [29] [30] [31]. Elles sont généralement classées suivant trois catégories : les fonctions de score basées sur un champ de force, les fonctions de score empiriques et celles basées sur des connaissances statistiques. Enfin, plusieurs fonctions de score de nature différente peuvent être combinées pour former des fonctions de score dites de consensus.

7.1 Les fonctions de score basées sur un champ de force

Les champs de force dans leur forme standard évaluent la somme de deux énergies : l'énergie entre atomes liés au sein d'une molécule donnée (énergie interne) et l'énergie entre atomes non-liés. Ce deuxième terme correspond au terme principal de l'énergie d'interaction protéine-ligand dans le cas d'une application à un problème de docking. La plupart du temps, les fonctions de score basées sur un champ de force ne considèrent qu'une conformation donnée de la protéine. Ainsi, si l'on compare l'activité de deux ligands par rapport à cette même conformation, cela permet de faire abstraction du terme d'énergie interne de la protéine qui s'annule dans l'expression de la différence d'énergie libre d'interaction entre les deux ligands.

De telles fonctions de score présentent certaines limitations qui s'ajoutent à celles induites par la représentation du système (p. ex. la non représentation explicite du solvant). En particulier, les effets d'entropie, qui peuvent varier d'un ligand à l'autre pour un site actif donné, aussi bien que pour un ligand donné d'un site actif à l'autre, ne sont pas pris en compte. Seule la contribution enthalpique de l'énergie libre d'interaction est ainsi prise en compte.

Les fonctions G-Score [32] (basée sur le champ de force de Tripos [32]) et celle implémentée dans AutoDock [33] (basée sur le champ de force AMBER) sont des exemples de ce type de fonction de score.

7.2. Les fonctions de score empiriques

Ce type de fonction de score approxime l'énergie libre de liaison en sommant de façon pondérée différents termes d'interaction dérivés de paramètres structuraux. Les différents poids de la fonction de score sont ajustés pour reproduire en priorité des données expérimentales, telles que les constantes de liaison tirées d'un jeu d'entraînement de complexes protéine-ligand.

La plupart des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité (en terme de rapport précision/rapidité). Cependant, le principal inconvénient de ces fonctions empiriques est leur forte dépendance aux données utilisées pour les calibrer qui, en cas de mauvaise paramétrisation, peut limiter leur transférabilité sur des systèmes différents. Parmi les principales fonctions de score empiriques, on peut citer : LigScore [34].

7.3. Les fonctions de score basées sur des connaissances statistiques

Ces fonctions de score sont construites à partir de règles fondées sur une analyse statistique des complexes protéine-ligand résolus expérimentalement. Elles partent du principe que les distances interatomiques les plus représentées statistiquement dans les complexes constituent des contacts énergétiques favorables et, qu'à l'inverse, les plus rares représentent des interactions moins stables. Ainsi, leur paramétrisation dépend de la quantité d'informations expérimentales disponibles et on doit leur apparition à la profusion de données structurales accessibles dans des bases de données telles que la PDB. Comme exemple populaire de ces fonctions de scores : DrugScore [35].

7.4. Les fonctions consensus

Ces fonctions hybrides combinent les résultats issus de diverses fonctions de score. On estime qu'il est possible de compenser partiellement les faiblesses intrinsèques de chacune des fonctions de score employées, évitant leurs erreurs individuelles et ainsi d'augmenter la probabilité d'identifier des composés actifs [36]. Cependant, si les termes des différentes fonctions de score sont fortement corrélés, l'intérêt du consensus devient limité car il peut entraîner une amplification des erreurs, au lieu de les atténuer. Ces fonctions consensus ont récemment fait l'objet d'une revue [37].

CHAPITRE 2

La

5-lipoxygénase et ses inhibiteurs

CHAPITRE 2 : La 5-lipoxygénase et ses inhibiteurs

1. La lipoxygénase

La lipoxygénase est un type de protéine enzymatique, dioxygénase non héminique, qui catalyse l'oxydation des acides gras ou autres alcènes. Elle entre notamment en jeu dans le métabolisme de l'arachidonate (acide eicosatétraénoïque) pour sa transformation en eicosanoïdes linéaires : les leucotriènes (dans les leucocytes, les poumons, le cœur, le cerveau et la rate), qui sont impliqués dans les réactions d'anaphylaxie. Ils sont largement représentés dans le règne animal et végétal [38]. Mais également chez les champignons et certaines espèces de bactéries. Elles sont constituées par une seule chaîne polypeptidique dont la masse moléculaire varie de 94 à 104 kDa. Pour cette raison des médicaments tentent d'être mis au point pour inhiber leur activité et réduire certaines réactions inflammatoires (asthme, allergies...).

La dioxygénation de lipide (activité dioxygénase) consiste à réaliser l'incorporation régiospécifique et stéréospécifiques de dioxygène (O₂) sur le système bis-allylique 1,4(Z, Z)-pentadiène d'un acide gras polyinsaturé pour générer l'hydroperoxyde diénique conjugué correspondant [39].

2. L'enzyme 5-lipoxygénase

5-lipoxygénase (5-LO) est un membre d'une grande famille d'enzymes, appelées lipoxygénase, qui oxyde les acides gras polyinsaturés libres et estérifiés. 5-LO introduit d'abord de l'oxygène moléculaire au carbone actif 5 de l'acide arachidonique conduisant à la formation de 5-hydroxy-peroxy-acide eicosatétraénoïque (5 HPETE). Ce dérivé est instable et va être en réduit en acide 5-hydroxy-eicosatétraénoïque (5 HETE), ou converti en leucotriène (LT) A₄. Cependant, LTA₄ peut servir soit comme intermédiaire intracellulaire dans la synthèse de LTB₄ et LTC₄, ou peut être libéré à l'extérieur de la cellule et ensuite être absorbé par les cellules adjacentes dépourvues d'activité 5-LO, mais exprimant LTA₄-hydrolase et / ou LTC₄ synthase. LT et les dérivés cystéines de LT ont tous de fortes activités pro-oxydant et pro-inflammatoire [40].

2.1 La structure

Il existe plusieurs structures de la lipoxygénase connus, y compris: la lipoxygénase L1 et L3 de soja, la 8-lipoxygénase de corail, la 15-lipoxygénase de lapin et 5-lipoxygénase humaine. La protéine est constituée d'un petit domaine de PLAT N-terminal et un domaine

catalytique C-terminal principal, qui contient le site actif. Dans les deux enzymes de mammifères et de plantes, le domaine N-terminal contient une β -baril antiparallèle huit brins.

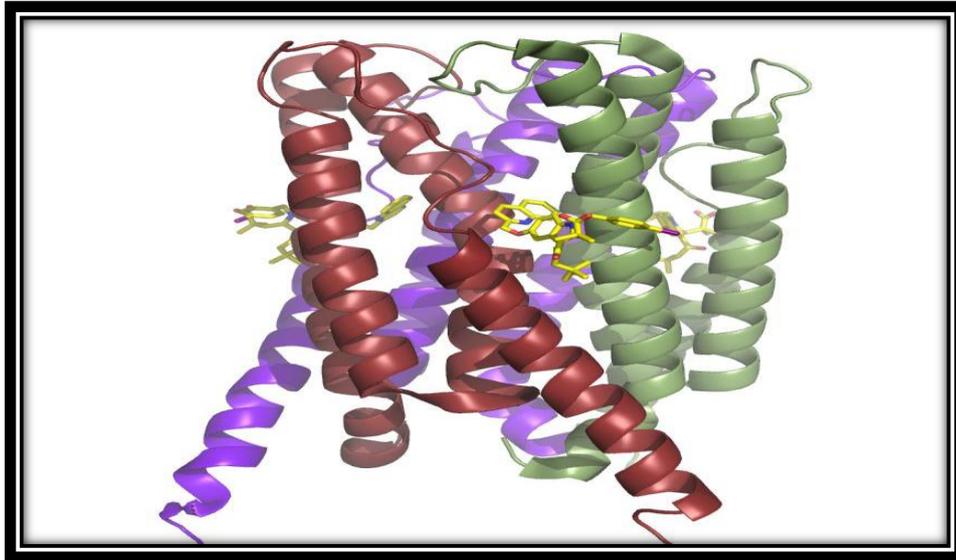


Figure 7 : Structure de la 5-lipoxygénase protéine d'activation.

Représentation de bande dessinée d'FLAP trimérique (code d'adhésion Protein Data Bank, 2Q7R) avec chaque protomère colorée en rouge, bleu ou vert. FLAP est une protéine transmembranaire qui est essentiel pour la biosynthèse des leucotriènes dans des cellules intactes.

2.2 Expression génique

Contrairement aux autres gènes LOX, qui se trouvent sur le chromosome 17 et ont une taille comprise entre 7 et 21 kb [41], le gène de la 5-LOX humaine est localisé sur le chromosome 10. Il compte plus de 82 kb, avec 14 exons séparés par 13 introns. [42] Il présente certaines caractéristiques des gènes domestiques, à savoir pas de boîte TATA et une région riche en GC dans le promoteur. L'enzyme étant présente pratiquement uniquement dans les cellules d'origine myéloïde, il est clair que son expression est régulée de manière très efficace et en fonction du type de cellule. [43]

2.3 Le site actif

Chez les lipoxygénases l'atome de fer établit quatre (4) liaisons, dont trois avec des résidus d'histidine. Six histidines sont conservées dans toutes les séquences de la lipoxygénase dont cinq d'entre eux se trouvent groupés dans un tronçon formé de 40 acides aminés.

Les deux hélices centrales longues se croisent au niveau du site actif. Deux cavités dans le domaine majeur de la lipoxigénase de soja -1 (cavités I et II) s'étendent à partir de la surface vers le site actif. La cavité I en forme d'entonnoir fonctionne comme un canal de dioxygène. La cavité II étroite et longue est probablement une poche de substrat. L'enzyme de mammifère plus compact contient seulement une cavité en forme de botte (cavité II).

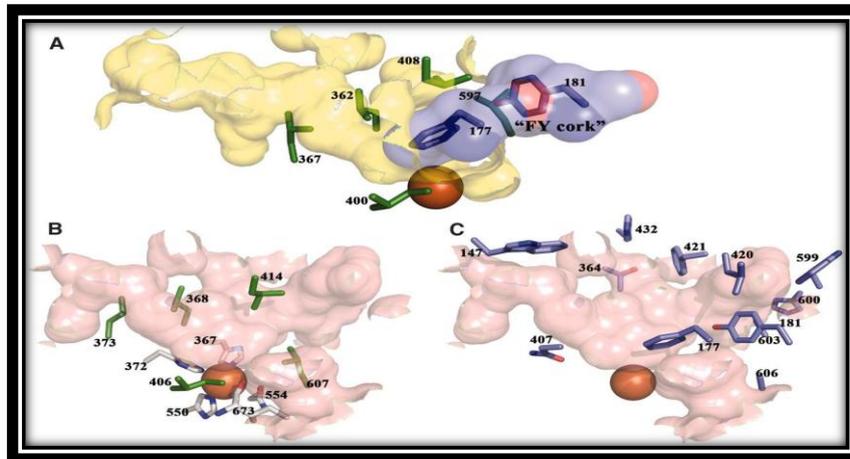


Figure 8. Le site actif de 5-LOX.

Des cavités internes calculées avec CastP. (A) La cavité du site actif de la 15-LOX (2P0M) est en jaune. L'exercice liège 5-LOX est superposé à la cavité 15-LOX et branche l'entrée. (B) L'orientation équivalente de la cavité du site actif de 5-LOX stable dans les roses. (C) Acides aminés 5-LOX qui contribuent à la cavité du site actif, L'entrée dans cette cavité nécessite un changement de conformation.

3. La voie métabolique de 5-LOX

La **5-LOX** est, d'un point de vue biologique, la plus importante des LOXs. Elle est impliquée dans la formation des **leucotriènes** (LTs). Le nom de ces médiateurs proinflammatoires reflète d'une part, leur découverte dans les leucocytes et d'autre part, leur structure caractéristique de triène conjugué. [44]

3.1. Biosynthèse des leucotriènes

La 5-LOX est une enzyme bifonctionnelle. En effet, elle catalyse les deux premières étapes de la biosynthèse des LTs (Figure 9.) : d'abord, l'oxygénation de l'AA menant au **5S-HPETE** et ensuite, la déshydratation de ce hydroperoxyde pour donner l'époxyde **LTA4**. [45.46]

A partir de cet intermédiaire instable, deux voies métaboliques sont possibles. D'une part, le LTA4 peut être converti en **LTB4** par la LTA4 hydrolase [47]. D'autre part, il peut

être conjugué au tripeptide glutathion par la LTC₄ synthase pour donner le LTC₄. Celui-ci peut ensuite, être métabolisé en LTD₄ par clivage de l'acide glutamique par la γ - glutamyl-transférase. A son tour, le LTD₄ peut être converti en LTE₄ suite à l'élimination de la glycine par une dipeptidase. Ces composés **LTC₄, D₄ et E₄** sont également appelés **cystéinyl- ou peptido-LTs**.

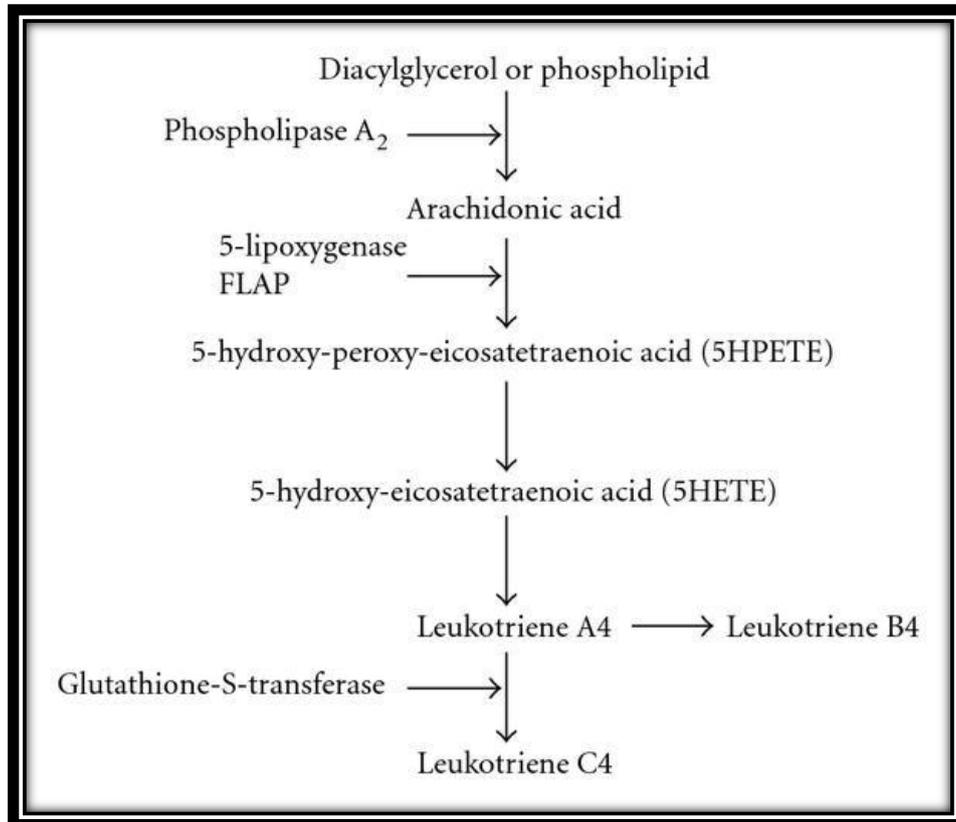


Figure 9 : biosynthèse de Leukotriène.

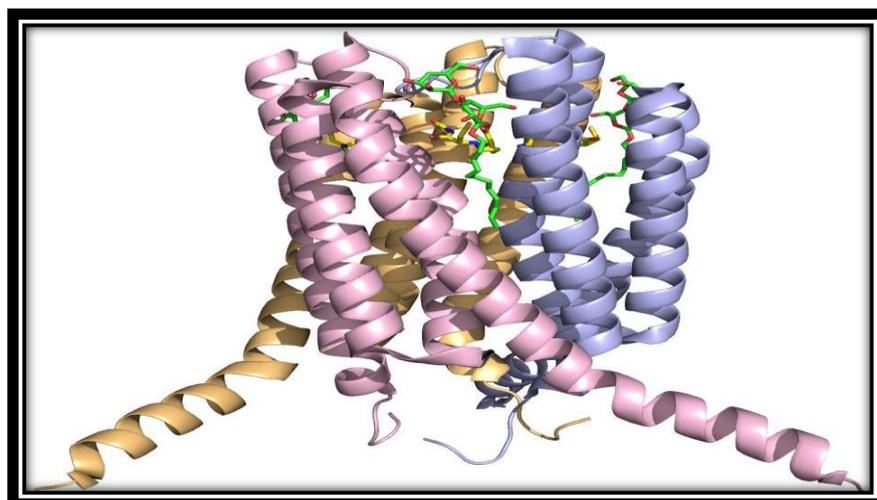


Figure 10 : Structure de leucotriène.

3.2. Distribution tissulaire des enzymes impliquées dans cette voie

Au contraire des prostanoïdes, les LTs sont synthétisés de manière prépondérante par les cellules inflammatoires, comme les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages et les mastocytes. Cependant, celles-ci, selon leur équipement enzymatique, n'expriment pas tous les composants de cette voie.

La **5-LOX** est spécifiquement exprimée dans les cellules d'origine myéloïde comme les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages, les monocytes, les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes B. [48]

La **LTA₄ hydrolase**, par contre, est plus largement distribuée : on la retrouve dans l'intestin, la rate, les poumons, mais aussi au niveau du sang dans les neutrophiles, monocytes, lymphocytes et érythrocytes.

La **LTC₄ synthase** possède également une large distribution. Elle est présente dans les myélocytes, mastocytes, éosinophiles mais également dans les cellules endothéliales, plaquettes et cellules musculaires lisses. Cette large répartition permet la production de LTs à partir de cellules qui ne possèdent pas la 5-LOX et ce, par un **métabolisme transcellulaire**. [49] En effet, à condition que le substrat LTA₄, fourni par les cellules possédant la 5-LOX, soit disponible dans le liquide extracellulaire, il peut être exporté vers d'autres cellules possédant les enzymes capables de le métaboliser. Ainsi, le LTA₄ produit en excès dans le milieu extracellulaire par les leucocytes polymorphonucléaires peut être métabolisé en LTB₄ au niveau des érythrocytes par la LTA₄ hydrolase ou encore en LTC₄ dans les cellules endothéliales par la LTC₄ synthase. (**Figure 11**).

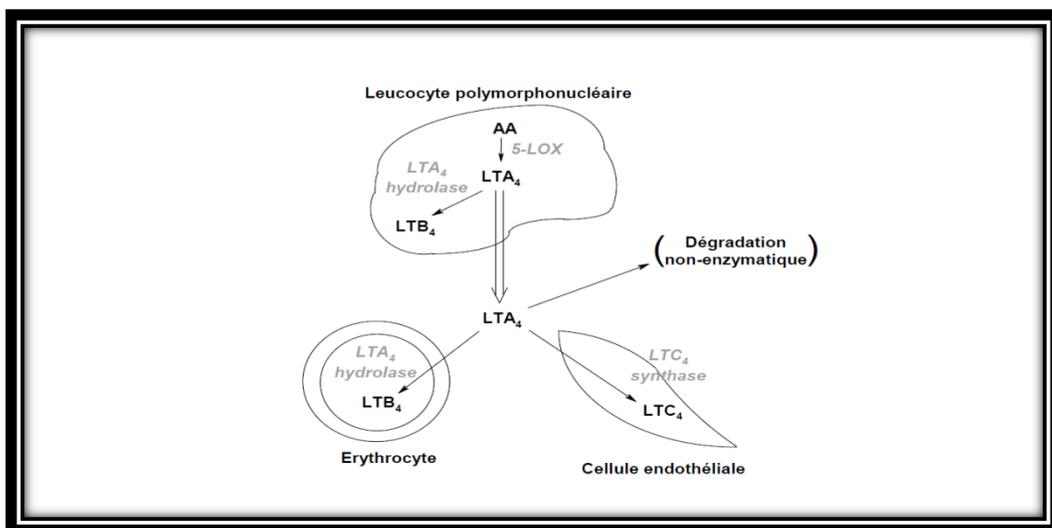
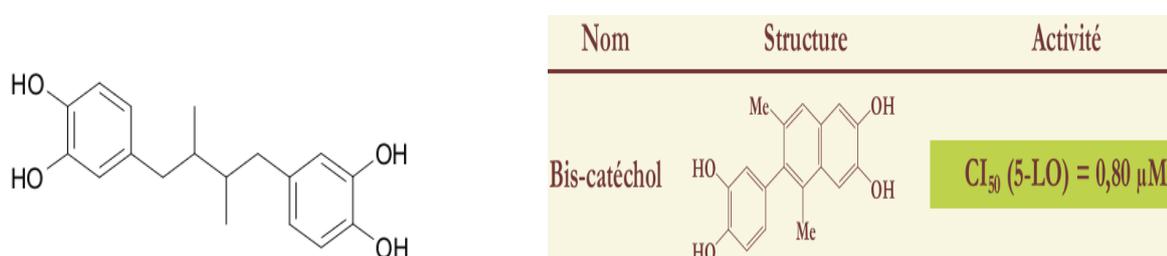


Figure 11. Métabolisme transcellulaire du LTA₄ à partir d'un leucocyte polymorphonucléaires.

4. Les inhibiteurs de la 5-lipoxygénase

4.1 Inhibiteurs redox ou antioxydants

Les inhibiteurs redox de la 5-LOX sont généralement de petites molécules aromatiques mono- ou polycycliques (de type catéchol, quinone, phénol, etc.). Il est difficile de définir des relations structure-activité pour les nombreuses familles existantes. Toutefois, en plus de leur faible potentiel redox, la lipophilie est une caractéristique importante pour leur activité inhibitrice. [50] Ces agents, réducteurs à un électron, entrent en compétition avec l'AA pour occuper le centre catalytique (l'atome de fer). Ils peuvent alors agir comme un substrat alternatif pour la 5-LOX et être oxydés par un transfert radicalaire, convertissant de ce fait l'atome de fer activé (Fe^{3+}) en Fe^{2+} inactif. Ils détournent donc l'enzyme de sa tâche normale. [51]



NDGA (Nordihydroguaiaretic acid) $IC_{50} = 0.2 \mu$ M

Figure 12 : structure et IC_{50} de NDGA et Bis-catéchol (inhibiteur redox).

4.2 Inhibiteurs chélateurs du fer

La conception d'inhibiteurs capables de chélater l'atome de fer présent au sein de la 5-LOX s'est avérée être une démarche intéressante. De nombreux inhibiteurs de la 5-LOX ont présenté, dans un premier temps, une fonction acide hydroxamique, un des ligands de métaux les plus puissants. [52] Bien que ces composés possèdent un pouvoir inhibiteur important in vitro, le groupement hydroxamate est rapidement hydrolysé in vivo pour donner le carboxylate correspondant inactif. [53] Dans le but de réduire ce métabolisme hydrolytique, des modifications structurales importantes ont été effectuées : la substitution d'un groupement lipophile R2 sur l'hydroxylamine a conduit aux acétylhydroxamates (type B).

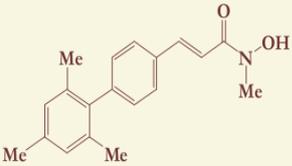
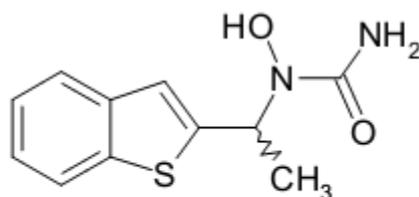
Nom	Structure	Activité
Acide arylhydroxamique		$IC_{50} (5-LO) = 22 \text{ nM}$

Figure 13 : acide arylhydroxamique et leur IC_{50} .

Ces composés présentent encore, malgré tout, des problèmes de métabolisation in vivo, notamment de glucuronidation. D'autres études ont conduit à l'identification des N-hydroxyurées, plus stables du point de vue métabolique [53].

Parmi celles-ci, le zileuton (**Figure 14**) est le premier inhibiteur sélectif de la 5-LOX mis sur le marché. Il est indiqué dans le traitement de l'asthme chronique. Il présente cependant certains effets indésirables, notamment une toxicité hépatique. Des analogues du zileuton, possédant de meilleures propriétés pharmacocinétiques, ont été synthétisés, dont l'ABT-761, actuellement en essais cliniques de phase III, pour le traitement de la bronchoconstriction dans l'asthme. [54].



Zileuton

$IC_{50} (5LOX) = 700 \text{ Nm}$

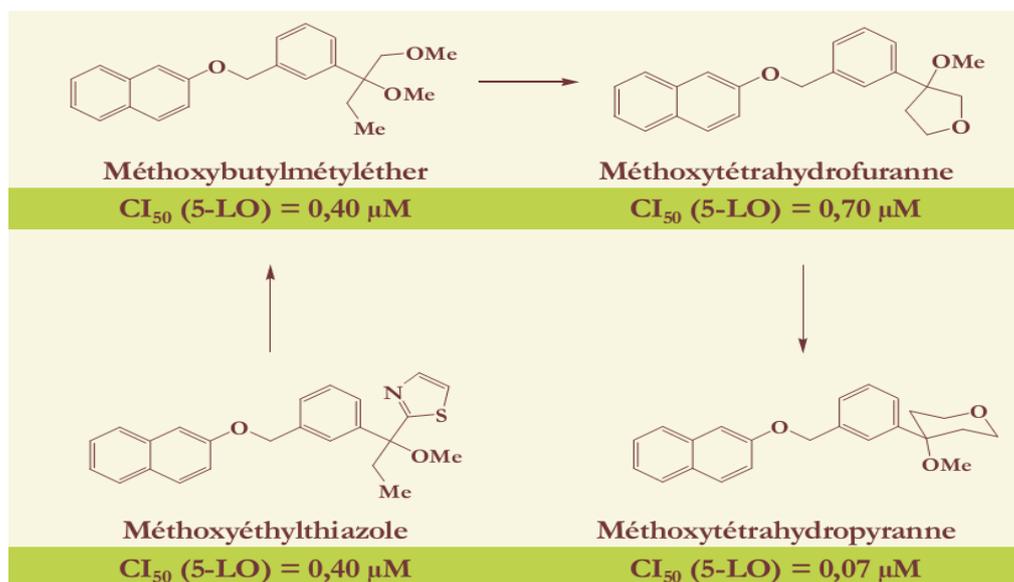
Figure 14 : structure de zileuton (inhibiteur chélateurs du fer).

4.3. Les inhibiteurs non-redox

Compte-tenu de la toxicité que peut apporter l'utilisation des inhibiteurs 5-LO conçus jusqu'ici, la firme pharmaceutique Astra Zeneca a entrepris des plans de recherche structure-activité dans le but de découvrir des inhibiteurs ciblant le site actif de la 5-LO et dépourvus de propriétés redox ou chélatrices de fer [55]. De ces études, d'importantes RSA émanèrent et représentent, à l'heure actuelle, un accomplissement majeur dans le design de novo d'inhibiteurs 5-LOX.

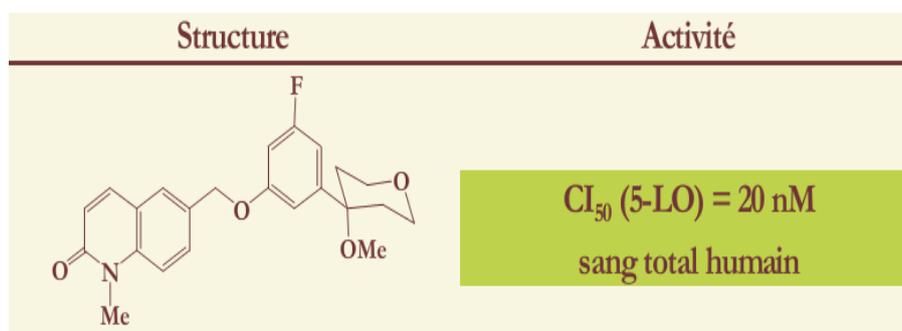
Le méthoxyéthylthiazole (IC_{50} 5-LOX) = 0,40 μ M) représentait alors un « hit » à développer pour le design de nouveaux chefs de file. Son évolution s'effectua étape par étape à travers des séries d'éthers et d'esters [56] pour aboutir à un dérivé méthoxytétrahydropyranne

Tableau 2 : Méthoxyéthylthiazole et son évolution.



Par la suite, en ciblant une alternative plus soluble que le groupe naphtyle, et bloquant un site potentiel de métabolisme par un fluor, l'exploration aboutit en l'inhibiteur achiral sélectif et oralement actif le ZD-2138 [56] (tableau 3).

Tableau 3: Structure et IC_{50} de ZD-2138.



4.4 Classes d'inhibiteurs mixtes

Comparée à des inhibiteurs simples, cette classe d'inhibiteurs mixtes dispose de l'avantage d'une action anti-inflammatoire associée à une réduction d'effets indésirables [57]. Ces molécules n'ont pas encore été utilisées pour le traitement de patients atteints d'un

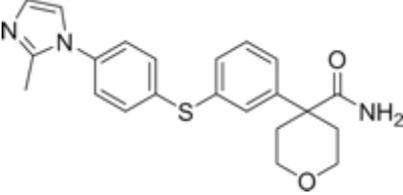
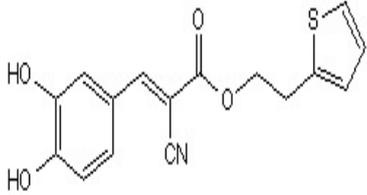
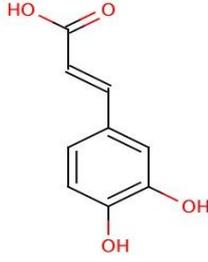
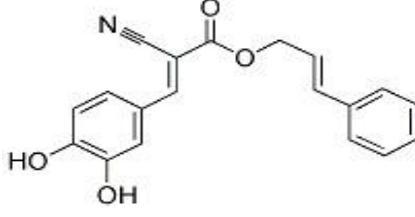
cancer, car l'inhibition simultanée de 5-LO et de COX2 doit pouvoir empêcher la production d'eicosanoïdes mitogènes et pro-angiogènes tels que PGE2, 5-oxo-ETE, 5(S)-HETE et LTA4. Une difficulté dans la conception de tels inhibiteurs est de trouver une répartition du potentiel inhibiteur envers ces deux enzymes afin de ne pas favoriser une voie contrôlant la cascade de l'AA par rapport à l'autre [58].

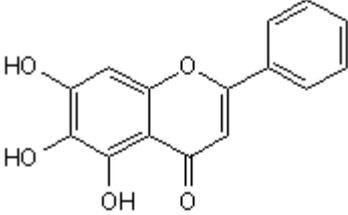
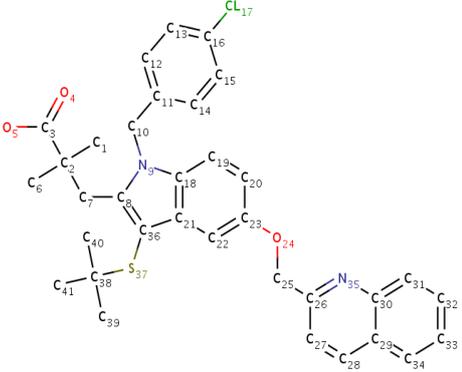
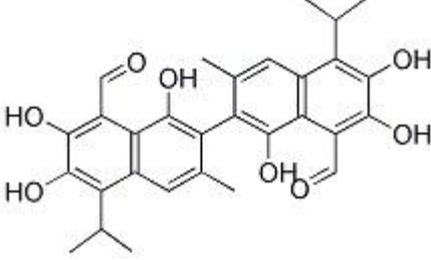
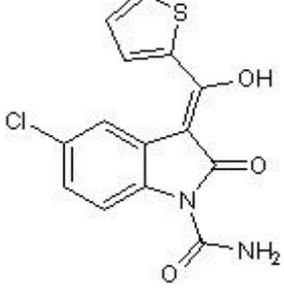
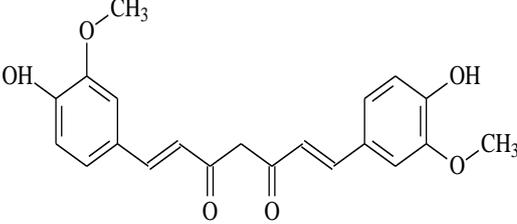
Tableau4 : structures et activité des inhibiteurs mixtes.

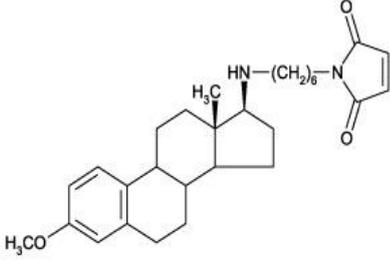
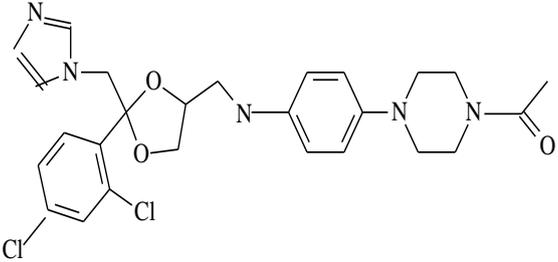
Nom ou DCI	Structure	Activité
S-2474		$CI_{50} (COX_1) > 10 \mu M$ $CI_{50} (COX_2) = 9,5 \text{ nM}$ $CI_{50} (5-LO) = 2,5 \mu M$
Tryptanthrine		$CI_{50} (COX_1) = 37 \text{ nM}$ $CI_{50} (COX_2) = 0,36 \mu M$ $CI_{50} (5-LO) = 0,15 \mu M$
Licofélone		$CI_{50} (COX_1) = 0,16 \mu M$ $CI_{50} (COX_2) = 0,37 \mu M$ $CI_{50} (5-LO) = 0,21 \mu M$
ALIOX 18		$CI_{50} (COX_1) > 10 \mu M$ $CI_{50} (COX_2) = 50 \text{ nM}$ $CI_{50} (5-LO) = 3 \text{ nM}$
Tépoaxaline		$CI_{50} (COX_1) > 10 \mu M$ $CI_{50} (COX_2) = 4,2 \mu M$ $CI_{50} (5-LO) = 1,7 \mu M$

4.5 .D'autres inhibiteurs de 5LOX

Tableaux 5 : quelques inhibiteurs de la 5-lipoxygénase.

NOM	STRUCTUR	IC ₅₀ (5LOX)
4-(3-(4-(2-methyl-1 <i>H</i> -imidazol-1-yl)phenylthio)phényle)-tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-4-carboxamide (CJ-13,610)		7 nM
2-TEDC Chemical Name: 2-(1-Thienyl)ethyl 3,4-dihydroxybenzylidencyanoacetate		0.09 μM
Acide caféique		3.7 μM
CDC Cinnamyl-3, 4-dihydroxy- α-cyanocinnamate		15 Nm

Baicalein		9.5 UM
3-[3-(TERT-BUTYLTHIO)-1-(4-CHLOROBENZYL)-5-(QUINOLIN-2-YLMETHOXY)-1H-INDOL-2-YL]-2,2-DIMETHYLPROPANOIC ACID		1.6 Nm
Gossypol		0.3 μM
Tenidap		30 μM
Curcumin		8 μM

<p>U-73122</p> <p>1-(6-((17β-3-methoxyestra-1, 3,5(10)-trien-17-yl) amino) hexyl)-1H-pyrrole-2,5-dione</p>		<p>30 nM</p>
<p>Ketaminazole</p> <p>Chemical Name: 2-(1-Thienyl)ethyl 3,4-dihydroxybenzylidenecyanoacetate</p>		<p>700 nM</p>

CHAPITRE 3

Matériel et méthodes

CHAPITRE 3 : Matériels et méthodes

1. Matériels

La manipulation du docking moléculaire nécessite l'utilisation des outils suivants :

1.1 Micro-ordinateur

Dans cette étude, nous avons utilisé un micro-ordinateur ayant un processus de 2.40 GHZ Intel Core I5 et une mémoire vive de 4 Go, sous le system d'exploitation Windows 7. 32 bits version 2010.

1.2 Programmes

1.2.1 AutoDock

La version la plus récente d'AutoDock 4.2.2.5, est utilisé sous le système d'exploitation Windows 7.

L'AutoDock est un program de docking moléculaire qui est constitué d'un ensemble de trois sous-programmes destinés à prédire la conformation la plus favorable d'un ligand au sien de son récepteur .le test des paramètres déterminant les propriétés du ligand qui est réalisé avec le sous-programme AutoTors .Le sous-programme AutoGrid effectue, de son coté, le calcul des différentes grilles de potentiel .Enfin ,le sous programmes AutoDock réalise les calculs d'amarrage moléculaire parfaitement .Nous utilisons également l'interface graphique « ADT » (AutoDock Tools) version 1.5.6 pour visualiser la localisation précise de l'espace à l'intérieur du quel vont se faire les calculs.

1.2.2 Titan

Permet de construire et de minimiser l'énergie des structures tridimensionnelle (3D) des inhibiteurs de 5-lipoxygénase obtenus à partir de la littérature.

2 Méthodes

2.1. Préparation du récepteur

Le fichier du récepteur utilisé par AutoDock doit être sous format mol2 ou pdb. En consultant la banque PDB, il est possible de télécharger le fichier du récepteur, l'enzyme **5LOX** dans notre cas, dans le format pdb .Parmi les deux complexes proposés par la PDB,

nous avons choisi le code **2Q7M**, car il s'agit d'une structure correctement définie avec une résolution de 4.25 Å [7].

Avant son utilisation par AutoDock, le complexe **2Q7M** est séparé de son ligand afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre. Le récepteur est ensuite préparé en définissant les charges partielles de ses atomes par l'intermédiaire du sous-programme AutoTors qui attribue des charges de type "Kollman" calculées avec le champ de forces empirique Amber [59]. Il est aussi nécessaire de rajouter à ce récepteur les hydrogènes dits polaires c'est à dire « essentiels ». Le fichier de la protéine ainsi préparée est converti par AutoDock au format `pdbq` qui correspond aux données des charges. Enfin, On intègre dans ce fichier les paramètres de solvation des atomes avant de l'enregistrer dans le format `pdbqt` (format propre à AutoDock).

2.2. Préparation des ligands

Les ligands utilisés dans ce travail sont dessinés avec le logiciel Titan, en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome et du type de liaison simple, double ou triple. Une étape d'optimisation de la géométrie devient alors nécessaire. Pour cela, nous avons appliqué la méthode semi-empirique Austin Model 1 (AM1) [60]. Les molécules ainsi obtenues sont enregistrées au format `pdb`.

La phase finale de préparation du ligand est réalisée par le sous-programme AutoTors. Ce dernier a pour rôle de contrôler les mouvements du ligand, en définissant les atomes aromatiques, les liaisons flexibles et les angles de torsion. La molécule finale est enregistrée dans le format `pdbqt` avant son utilisation par AutoDock 1.5.6.

2.3. Calcul des grilles de potentiel

Pour augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, le récepteur **5LOX** (**2Q7M**) est plongé dans une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine étudiée et permettant la libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées $X = 64.002$, $Y = 57.629$ et $Z = 39.286$ avec les dimensions $40 \times 40 \times 40 \text{ \AA}^3$ (**figure 15**). L'espacement ou la maille de la grille est fixé par défaut à 0.375 \AA (correspondant au quart de la longueur d'une simple liaison C-C). La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés. L'ensemble de ces instructions sont sauvegardées dans un fichier texte de paramétrage avec l'extension `gpf` (Grid Paramètres File)

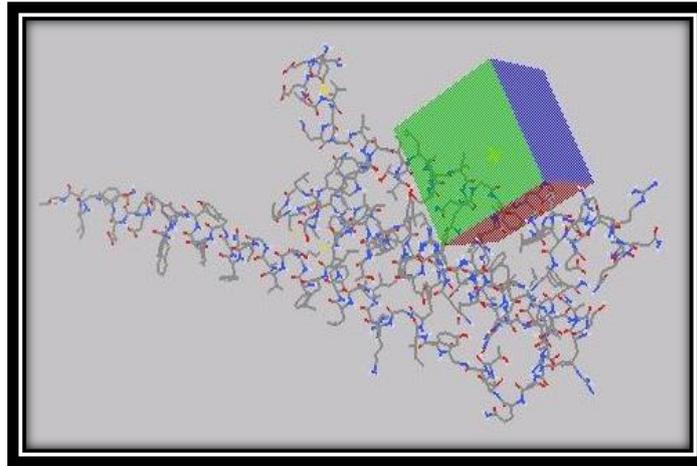


Figure 15: Position de la boîte d'amarrage dans le site actif de la 5LOX.

L'étape suivante du programme AutoDock 1.5.6 consiste à exécuter les instructions contenues dans le fichier `gpf` grâce au sous-programme AutoGrid. Il s'agit de calculer l'affinité entre les différents types d'atomes de la protéine (C, H, O, N et S) et le ligand. Les résultats sont générés dans un fichier texte avec l'extension `glg`.

2.4. La recherche des solutions d'amarrage

Le mode de fonctionnement d'AutoDock consiste à faire varier les différentes positions du ligand (axes de translation, de rotation et angles dièdres) à l'intérieur de la boîte. Il utilise les grilles de potentiels pour calculer l'énergie d'interaction entre le ligand en une position donnée et la macromolécule. Cette méthode permet de calculer très rapidement l'énergie d'interaction ligand - récepteur car les potentiels sont pré-calculés, bien entendu, par le sous programme AutoGrid. [7]

L'étape de docking moléculaire est réalisée grâce au sous-programme AutoDock 4. Il recherche les solutions d'amarrage en fonction des paramètres suivants qu'il retrouve dans le fichier `dpf` (Dock Paramètres File). [7]

- les noms des fichiers contenant le ligand et les grilles de potentiels à utiliser.
- l'état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précisée).
- La méthode de recherche à utiliser avec les paramètres associés.

Dans notre étude, nous avons utilisé l'AGL avec les paramètres suivants :

- La taille de la population (150).
- Le nombre maximum d'évaluations d'énergie (2500000).

- Le nombre maximum de générations (27000).
- Le niveau de sélection élitiste: le nombre des meilleurs individus qui survivent automatiquement à la génération suivante. La valeur standard est 1.
- Le taux de croisement (0.8).
- Le taux de mutation (0.02).
- Le nombre de cycles à exécuter, c'est-à-dire le nombre de solutions souhaitées (10).

2.5. Analyse des résultats

Les résultats de docking effectués par le sous-programme AutoDock 4 sont générés dans un fichier texte avec l'extension `dlg` (format propre à AutoDock). Ce fichier fournit les coordonnées atomiques des 10 meilleurs positions du ligand dans le site actif de l'enzyme étudié, leur énergie d'interaction ainsi que les K_i correspondants et enfin les différentes valeurs de l'écart quadratique moyen (Root Mean Square Déviation ou le RMSD).

CHAPITRE 4

Résultats et discussions

CHAPITRE 4 : Résultats et discussions

1 . Fiabilité de programme utilisé :

1.1 RMSD

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB. La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms [61, 62].

Le test sur la fiabilité du logiciel utilisé a été réalisé sur 110 complexes. Toutes les valeurs de $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ sont considérées comme positives. Dans le graphe suivant, les résultats sont donnés en pourcent (%), pour le programme AutoDock.

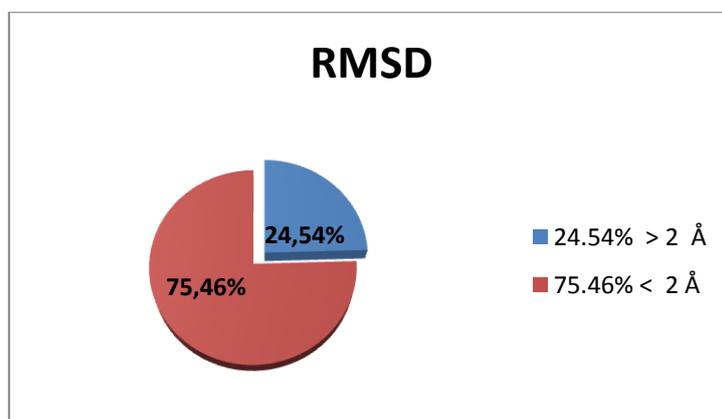


Figure16 : Résultat du RMSD en (%) obtenus par AutoDock.

D'après les résultats du graphe, nous remarquons que le programme AutoDock reproduit bien les données expérimentales. En effet, 75,46% des valeurs de RMSD sont inférieures à 2 Å. suivant les travaux de Chikhi A, Bensegueni A [61, 62], ces résultats apportent la preuve de la fiabilité de programme AutoDock

1.2 L'analyse visuelle

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape essentielle pour juger la performance du programme AutoDock

Les résultats de docking des trois complexes, le 2X8Z (le meilleur), le 1UZE (l'intermédiaire) et le 3QCG (le plus mauvais), sont montrés dans les figures suivantes. La meilleure conformation du ligand générée par le docking (colorée en vert) est superposée à la pose expérimentale du ligand de référence (colorée en move).

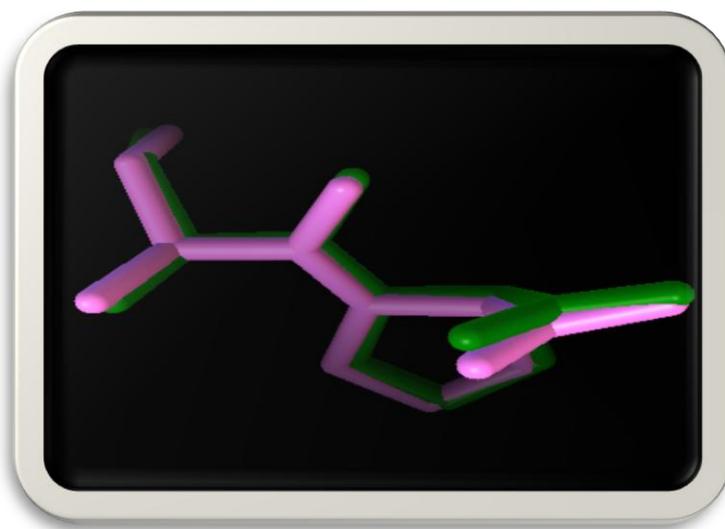


Figure 17 : Superposition du ligand X8Z du complexe 2X8Z donné par rayons-X (coloré en move) et par docking moléculaire (coloré en vert) avec AutoDock

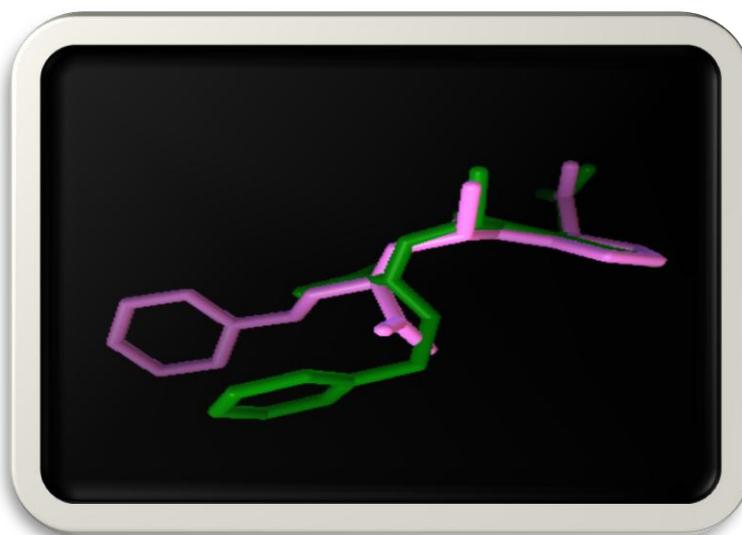


Figure 18 : Comparaison des géométries de l'inhibiteur EAL du complexe 1UZE données par rayons-X (coloré en move) et par docking (coloré en vert) avec AutoDock

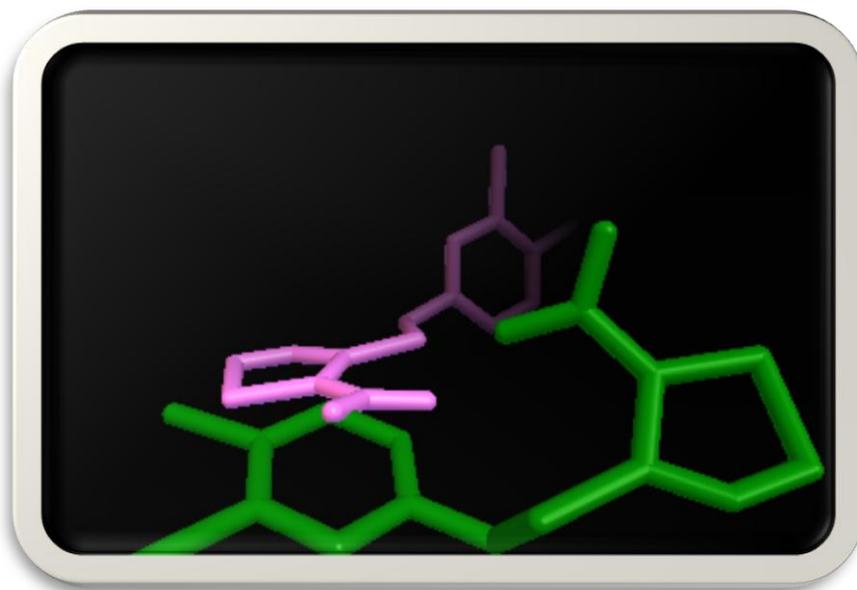


Figure 19 : Comparaison de la géométrie de BNX1 du complexe 3QCG donnée par rayon-X (coloré en rose) avec celle obtenue par docking moléculaire (coloré en vert) .

Dans le premier cas, avec un RMSD de 0.27 Å, la superposition de la conformation optimale du ligand obtenue par docking moléculaire avec la géométrie du même ligand donnée par diffraction des rayons-X est maximale; dans le deuxième cas, avec un RMSD de 1,95 Å, elle l'est moins; alors que dans le troisième cas, avec un RMSD de 6.94 Å elle ne l'est pas du tout.

1.3 Le coefficient de corrélation

L'analyse par régression linéaire a été réalisée sur 25 inhibiteurs de la 5-lipoxygénase dont l'activité biologique a déjà été testée (IC_{50}). Le coefficient de corrélation montre le degré de relation linéaire entre l'énergie d'interaction obtenue par docking moléculaire avec AutoDock et les IC_{50} déterminées expérimentalement. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : résultat de l'analyse entre les énergies d'interactions de 25 inhibiteurs de la 5LOX et leur activité biologique ($\log IC_{50}$).

Inhibiteur	IC_{50} (nM)	$\log IC_{50}$	Energie d'interaction (Kcal/Mole)
2Q7R	1,6	0,20	-5,42
2 TED	90	1,95	-4,03
Tryphtanthrine	150	2,17	-4,99
Tepoxaline	1700	3,23	-4,64
ALIOX 18	3	0,47	-5,51
Baicalein	9500	3,97	-3,90
Bis-catéchol	800	2,90	-3,78
Acide caféique	3700	3,56	-3,08
CDC	15	1,17	-3,98
Acide arhylhydroxamique	22	1,34	-5,03
U 73122	30	1,47	-5,11
ZD 2138	20	1,30	-5,76
CJ-13610	7	0,84	-4,65
Curcumin	8000	3,90	-4,27
Gossypol	300	2,47	-3,91
Zileuton	700	2,84	-4,32
Ketaminazole	700	2,84	-4,42
Licofélone	210	2,32	-4,42
Méthoxybutylmétyléther	400	2,60	-4,17
Méthoxyéthylthiazole	400	2,60	-4,57
Méthoxytétrahydrofuranne	700	2,84	-5,20
Méthoxytétrahydropuranne	70	1,84	-5,11
NDGA	200	2,30	-3,42
S-2474	2500	3,39	-3,26
Tenidap	30000	4,47	-4,12

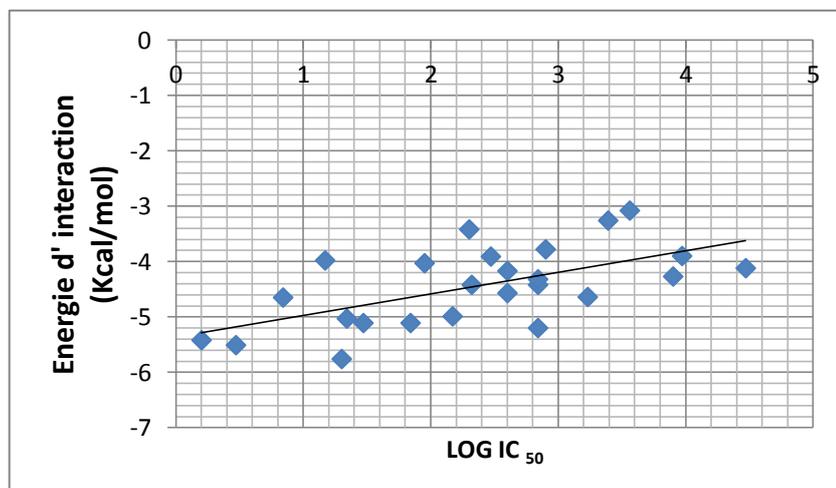


Figure 20 : Corrélation entre l'activité biologique ($\log IC_{50}$) de 25 inhibiteurs et leur énergie d'interaction avec la 5-LOX par AutoDock.

Le coefficient de corrélation calculé à partir du graphe est égal à 0,60, celui-ci permet de dire que l'énergie d'interaction et le log IC 50 sont fortement corrélés et qu'AutoDock représente un outil de choix par prédire les potentialités biologiques d'une structure moléculaire donnée.

1.4 Conclusion

A la lumière des résultats obtenus avec le RMSD, l'analyse visuelle et le coefficient de corrélation linéaire, nous pouvons conclure que le programme AutoDock est hautement performant qu'on peut l'utiliser sans trop risque d'erreurs, pour générer par simulation *in silico* des inhibiteurs de la 5-lipoxygénase.

2. Etude des interactions de l'acide caféique et de ZD 2138 avec la 5-lipoxygénase.

2-1 Règle de Lipinski

La règle de 5 de Lipinski [63] est en relation directe avec les propriétés biologiques d'absorption, de digestion, de métabolisme et d'excrétion (ADME) éventuelles des molécules étudiées, repose sur cinq propriétés physico-chimiques à savoir :

- Un poids moléculaire (PM) maximum de 500g/mol
- Un maximum de 5 liaisons H-donneurs (DH) (OH ou NH)
- Un maximum de 10 liaisons H-accepteurs(AH) (O ou N)
- nombre de liaisons retables (LF) ≤ 15
- Un coefficient de partition octanol / eau "logP" ou une lipophilie ≤ 5 .

Le tableau suivant présente les résultats de la règle de Lipinski appliquée sur l'acide caféique et le ZD 21387.

Tableau 7: Résultats de la règle de Lipinski sur les deux composés.

	L'acide caféique	Le ZD 2138
PM	180	397,446
DH	3	0
AH	4	5
LF	2	5
Log P	0,941	3,794

Ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur molinspiration [64].

PM = Poids Moléculaire, DH = Donneur d'Hydrogène (OH et NH), AH = Accepteur d'Hydrogène (O et N), LF = Liaison Flexible, LogP =coefficient de partition Eau/octanol.

D'après le tableau les deux composés répondant parfaitement aux critères de la règle de Lipinski.

2.2 Interactions acide caféique – 5-lipoxygénase

L'acide caféique est le mauvais inhibiteur de la 5-lipoxygénase parmi les 25 inhibiteurs utilisé dans notre étude.

Le docking de l'acide caféique dans le site actif de la 5-lipoxygénase donne une énergie d'interactions égale -3,08 Kcal/Mole .Nous avons fait appel à l'interface graphique ADT de programme AutoDock pour visualiser et analyser le nombre et le type de liaisons formant le complexe acide caféique—5LOX.

L'analyse visuelle montre que le complexe formé entre la 5-lipoxygénase et le ligand (acide caféique) est stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus Val20, Asn23, Gln22, Gly24, Phe25, Phe28, Ala27, Glu31. Le ligand est stabilisé aussi par trois liaisons hydrogène dont la première a lieu entre la fonction amine de His28 et l'oxygène du ligand séparé par une distance de 1,895 Å (His28 ...O-ligand). Les 2 autres liaisons hydrogène sont mises en place entre l'oxygène de résidu Val21 et les fonctions hydroxyles du ligand (Val21=O ...O-ligand ; distance =1,921Å), (Val21=O...O-ligand ; distance =1,796) (voir figure 21).

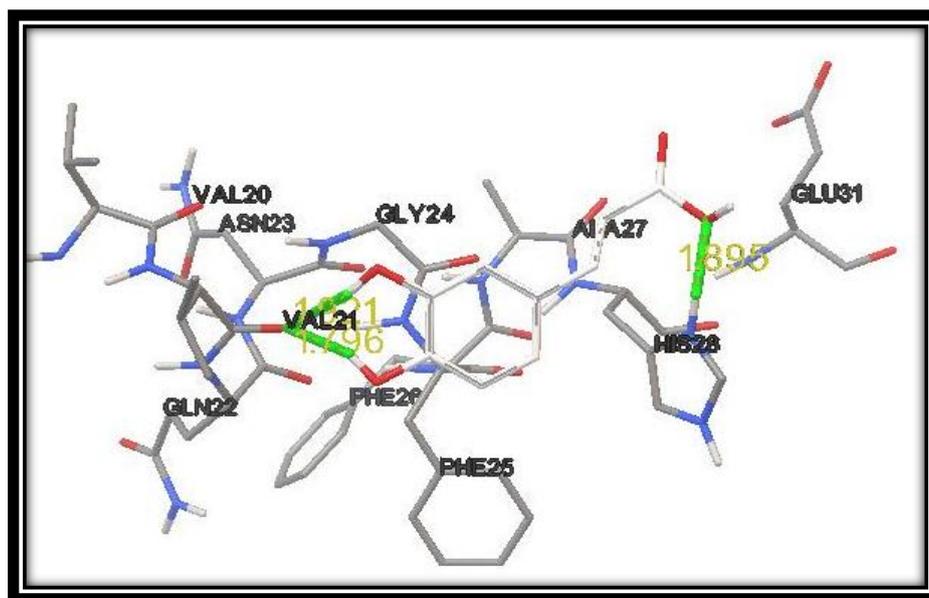


Figure 21: Mode de liaison de l'acide caféique avec le site actif de 5-LOX.

2.3 Interactions ZD 2138 – 5-lipoxygénase

Le ZD 2138 est le meilleur inhibiteur de la 5-LOX avec une énergie d'interaction égal - 5,76 Kcal/Mole et une valeur de l'IC₅₀ égal 20 Nm.

Le complexe ZD2138--5-LOX est stabilisé par une liaison hydrogène formée entre la fonction amine du résidu Asn23 et l'oxygène de ZD 2138 (Asn23NH ...O-ligand) séparées par une distance de 2.040 Å .Le ligand est stabilisé aussi par des interactions hydrophobiques avec les résidusVal20, Val21, Val61, Gln22, Phe25, His28, Ala2 (**voire figure 22**).

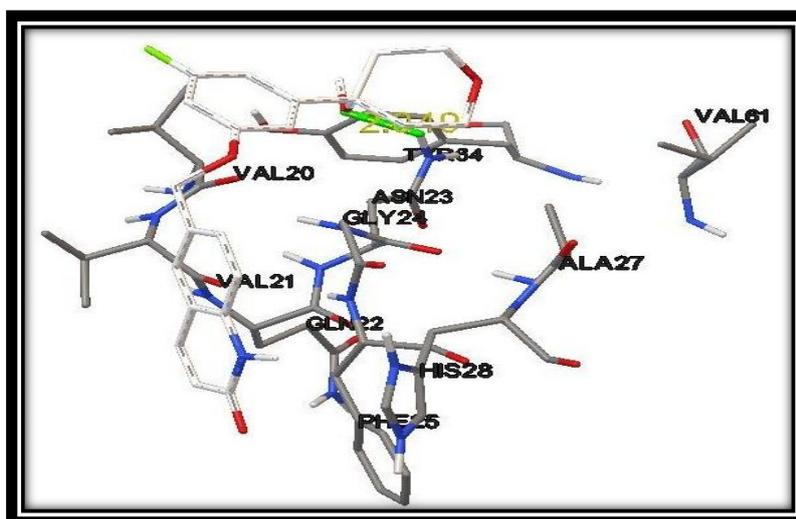


Figure 22 : Mode de liaison de ZD 2138 avec le site actif de 5-LOX.

3. Substitutions de l'acide caféique et le ZD 2138

Dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de la 5LOX, nous avons utilisé comme structure de départ, le mauvais et le meilleur inhibiteur parmi les 25 inhibiteurs étudiés : l'acide caféique et le ZD 2138.

Afin d'améliorer l'affinité de ces deux inhibiteurs, plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité d'engager des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions de la molécule comme le cycle de benzène et des fonctions alcool (-OH); acide (-COOH) et amine (-NH₂) (**voire figure 23 et 24**).

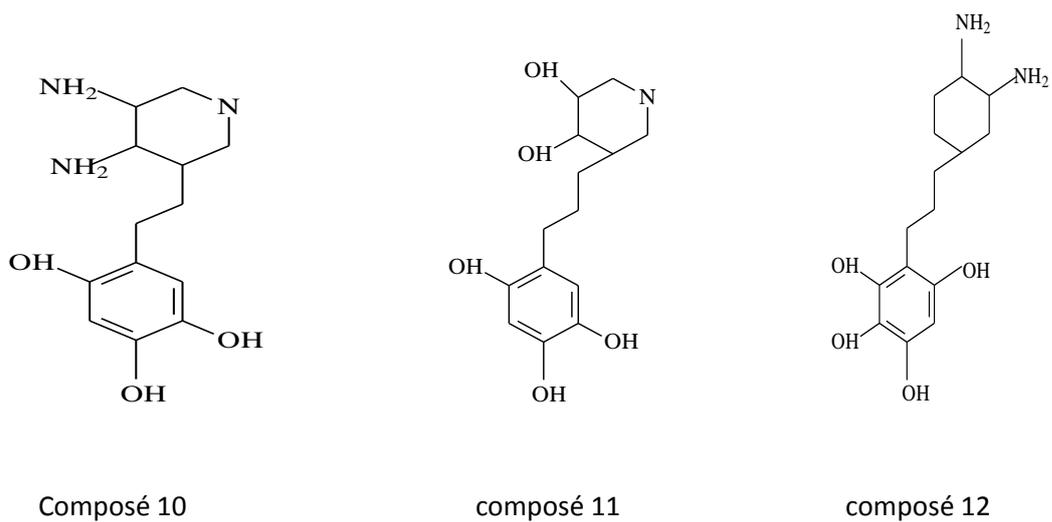
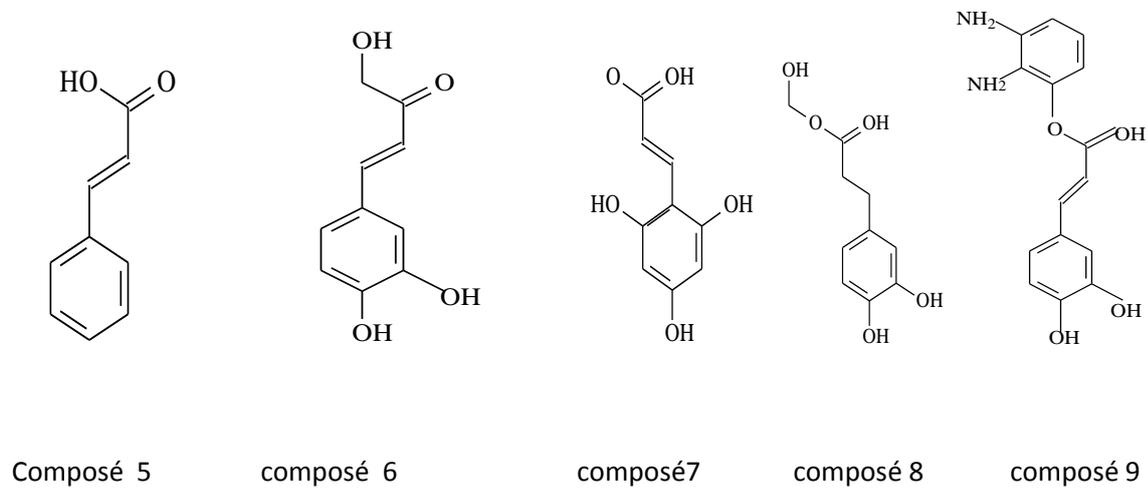
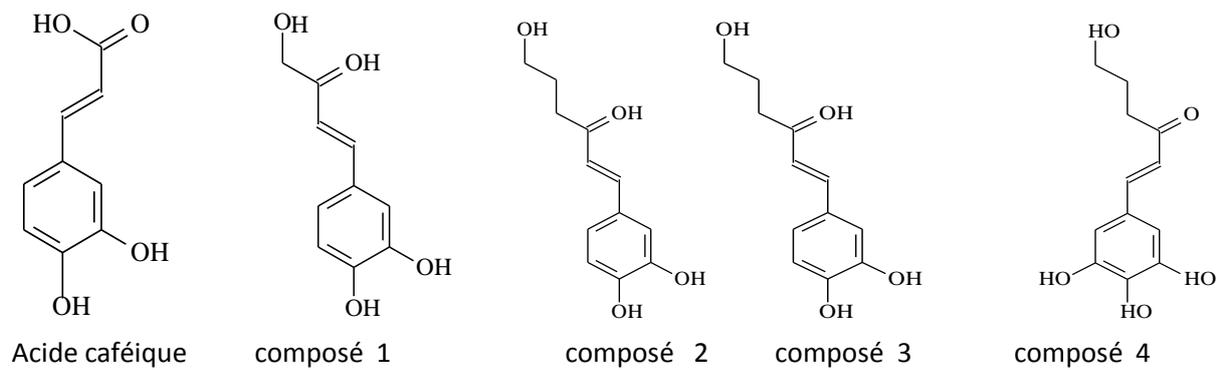
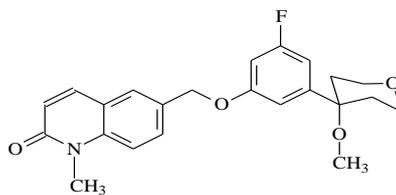
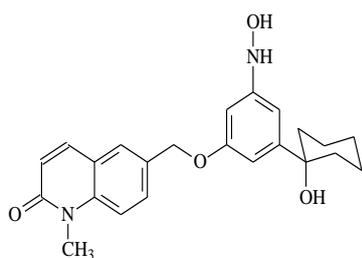


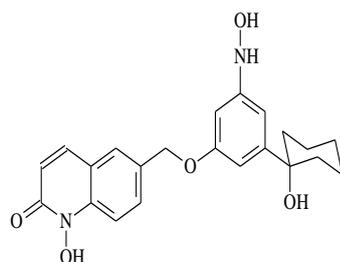
Figure 23 : structure de l'acide caféique avec les nouvelles substitutions.

ZD 2138

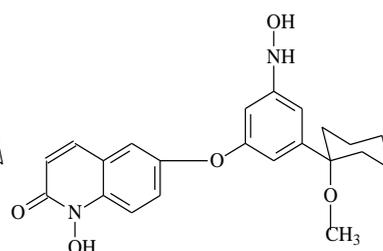




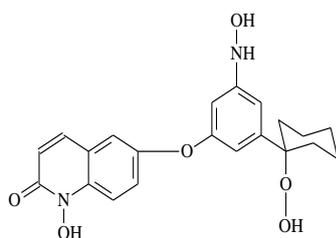
composé 1



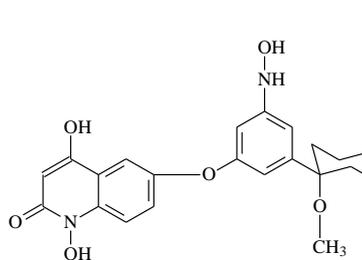
composé 2



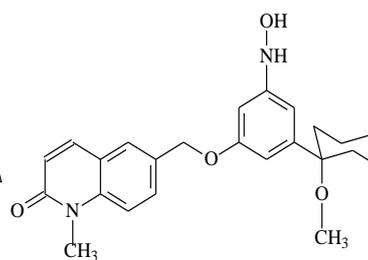
composé 3



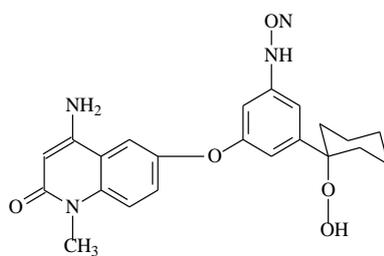
composé 4



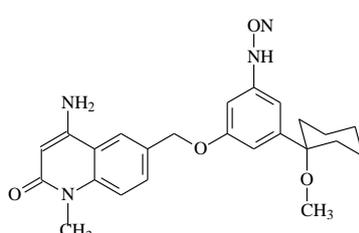
composé 5



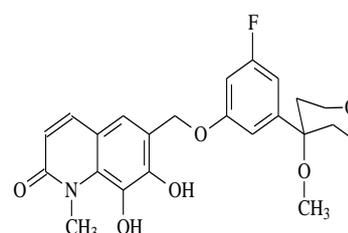
composé 6



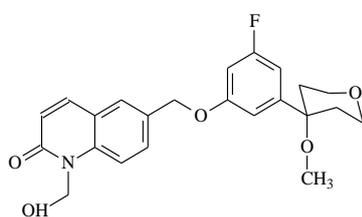
composé 7



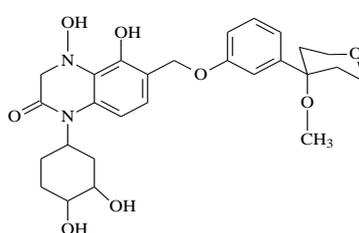
composé 8



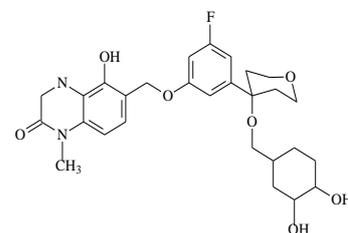
composé 9



composé 10



composé 11



composé 12

Figure 24: structure de ZD 2138 avec les nouvelles substitutions.

Tableau 8 : Résultats de la substitution à partir de l'acide caféique et de ZD 2138.

La molécule de départ	Acide caféique	ZD 2138
Numéro de composé	Energie d'interaction Kcal/Mole	
1	-3,28	-5,32
2	-3,48	-5,09
3	-3,59	-4,89
4	-3,09	-5,29
5	-3,40	-5,34
6	-3,74	-5,52
7	-2,95	-5,15
8	-2,72	-5,58
9	-4,79	-4,81
10	-3,74	-3,93
11	-4,77	-4,61
12	-5,04	-4,97

Les résultats du tableau montrent que :

Parmi les différentes substitutions réalisées sur l'acide caféique seuls les composés 7 et 8 ont présenté une énergie d'interaction inférieure de la molécule de départ (acide caféique) qui est de -3,08 Kcal/mol, par ailleurs le composé 12 donne une meilleure énergie d'interaction qui est égale -5,04 Kcal/mol.

Pour les substitutions de ZD 2138 tous les composés donnent une énergie d'interaction inférieure à la molécule de départ, le composé 8 donne une énergie d'interaction égale à -5,58 Kcal/Mole, cette énergie est proche de -5,76 Kcal/Mole (énergie d'interaction de ZD 2138).

3.1 Etude du composé 12 (la molécule de départ l'acide caféique)

Le complexe formé entre le composé 12 et le site actif de la 5LOX est stabilisé par cinq liaisons hydrogène, la première liaison hydrogène formée entre le hydroxyle de composé 12 (ligand) et l'oxygène du résidu Gly24 avec une distance égale 2,046 Å (ligand-OH...O-Gly24 ; d=2,046), la deuxième formée entre l'oxygène de ligand et la fonction amine du résidu His28 (ligand-O...NH-His28 ; d=2,063), la troisième liaison est formée entre la fonction hydroxyle de ligand et l'oxygène du résidu Ala27 (ligand-OH...O-Ala27 ; d=1,874), la quatrième et la cinquième formées entre la fonction amine de ligand et les deux oxygènes du résidu Glu31 (ligand-NH...O-Glu31 ; d=1,912) et (ligand-NH...O-Glu31 ; d=1,986). Enfin le composé 12 est stabilisé par des liaisons hydrophobiques formées par les résidus Phe25, Val30. (voir figure 25).

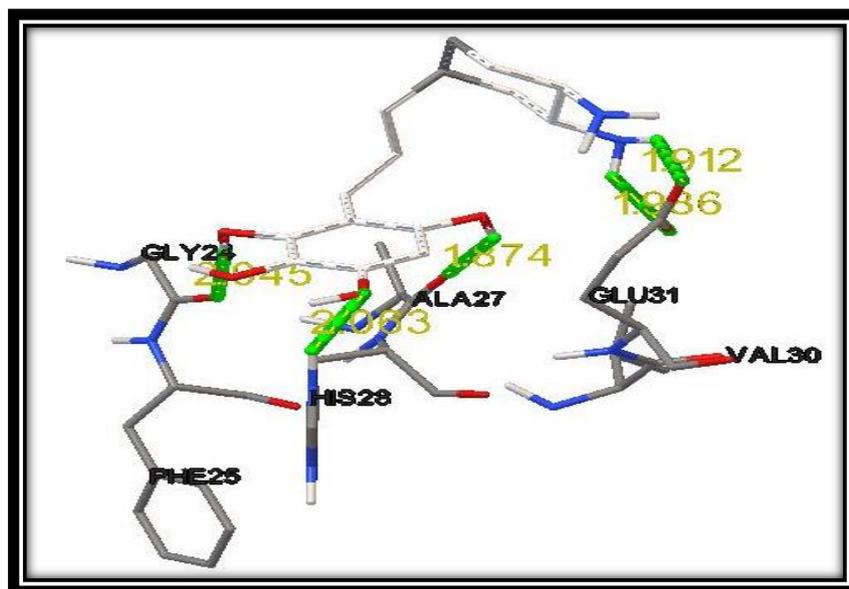


Figure 25 : Mode de liaison de composé 12 avec le site actif de 5-LOX.

3.2 Etude de composé 8 (la molécule de départ le ZD 2138)

La visualisation des interactions entre le composé 8 (ligand) et le site actif de 5LOX montre une liaison hydrogène formée entre l'oxygène de ligand et la fonction amine du résidu His28 séparée par une distance 1,842 Å (ligand-O...HN-His, $d= 1,842$ Å). le composé est stabilisé également par des interactions hydrophobiques par les résidus Val21, Gly24, Gln22, Phe25, Ala27, Glu31, Val30.

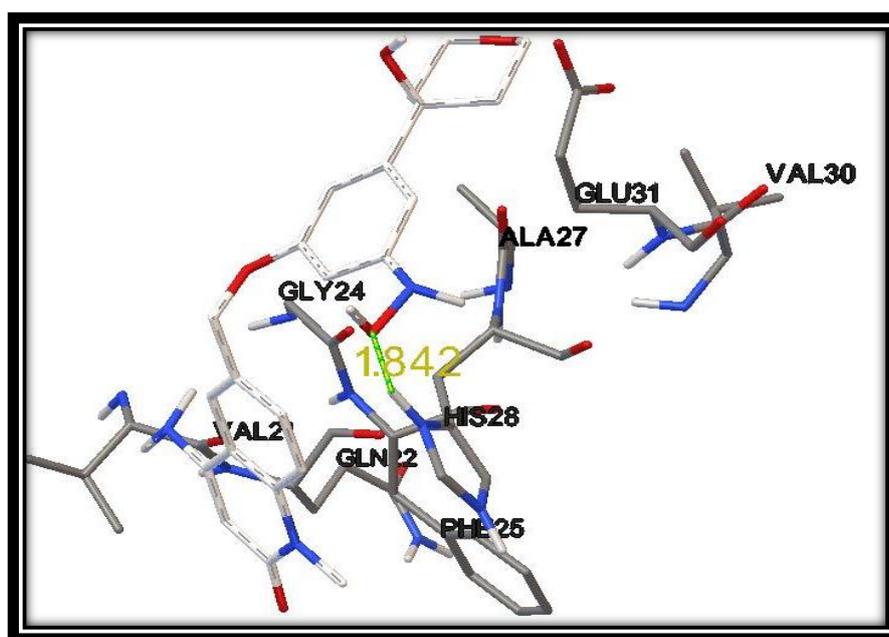


Figure 26 : Mode de liaison de composé 8 avec le site actif de 5-LOX.

4. Application de la règle de Lipinski sur le composé 12 et le composé 8

Tableau 9: Résultats de la règle de Lipinski sur les deux composés (12 et 8).

	Composé 12	Composé 8
PM	296,367	425,485
DH	8	4
AH	6	8
LF	4	6
Log P	0,743	2,884

Ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur molinspiration [64].

PM = Poids Moléculaire, DH = Donneur d'Hydrogène (OH et NH), AH = Accepteur d'Hydrogène (O et N), LF = Liaison Flexible, LogP = coefficient de partition Eau/octanol.

D'après Lipinski, tout les composés ne validant pas au moins trois des ces condition sont susceptibles de poser des problèmes d'absorption par voie orale [63]. A l'exception que les groupements donneurs d'hydrogène un peu plus élevé au composé 12, les composés 12 et 8 répondent parfaitement aux autres critères de la règle de Lipinski. En se référant particulièrement à leur coefficient de partition eau / octanol, parfaitement dans les normes, il apparait que ces inhibiteurs peuvent se dissoudre très facilement dans les phases aqueuses de l'organisme et traverser les membranes lipidiques pour parvenir jusqu'à leur lieu d'action.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspective

Ce travail avait pour but essentiel de nous initier aux outils de la simulation informatique, en particulier le docking moléculaire par AutoDock afin de rechercher de nouveaux inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé plusieurs étapes :

A/- première étape : constituant la vérification de la fiabilité du programme AutoDock par l'application de trois tests.

Le premier : test RMSD (*Root Mean Square deviation*), c'est-à-dire l'écart quadratique moyen entre la conformation du ligand calculé par docking vis-à-vis de la structure cristalline du ligand donnée expérimentalement.

Sur l'ensemble des 110 complexes pris arbitrairement de la PDB après simulation par AutoDock 75,56 % ont présenté un RMSD inférieur à 2 Å, donc une preuve significative de la performance du programme AutoDock.

Le deuxième Test : l'analyse visuelle de composés issus de la simulation, ont montré des différents cas entre la conformation de la structure simulée par AutoDock et elle obtenue par cristallographie.

Le troisième test : analyse par régression linéaire de 25 inhibiteurs de la 5-lipoxygénase avec des IC_{50} connus donne un coefficient de corrélation favorable égal 0,60.

Ces différents tests, ont permis de conclure que le programme AutoDock 4.2.2.5 est fiable et peut être utilisé en toute confiance pour la simulation des interactions des inhibiteurs de la 5-lipoxygénase.

B/- deuxième étape : Dans la perspective de développer de nouveaux inhibiteurs plus affines et plus sélectifs de la 5-LOX, nous nous sommes servis de deux inhibiteurs parmi les 25 étudiés plus haut. Le docking moléculaire avec AutoDock nous a permis de calculer leur énergie d'interaction qui révèle que l'acide caféique est le mauvais inhibiteur avec une énergie d'interaction égale à -3,08 Kcal/Mole, et que le ZD 2138 est le meilleur inhibiteur de la 5-LOX. Avec une énergie d'interaction égale à -5.76 Kcal/Mole.

C/- troisième étape : nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs en prenant comme structures de départ l'Acide caféique et le ZD 2138. Afin d'améliorer l'affinité de ces

deux inhibiteurs, plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité d'engager des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions.

Les résultats des différentes substitutions montre est que le composé 12 résultant de la substitution de l'acide caféique présente une nette amélioration de son énergie d'interaction qui passe de -3,08 Kcal/mol à -5.04 Kcal/Mole, contrairement a la substitution de ZD 2138 que ne présente aucune amélioration de l'énergie d'interaction, donc seul le composé 8 donne nue énergie proche de le ZD 2138 égale à -5,58 Kcal/Mole .

Enfin, l'application de la règle de 5 de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME du composé 12 qui se présente comme l'inhibiteur le plus actif vis-à-vis la 5-LOX.

Comme perspectives d'avenir, des tests *in vitro et/ou in vivo* de l'activité biologique de l'inhibiteur 12 sont recommandés pour compléter les résultats théoriques et vérifier l'efficacité de l'approche *in silico*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Grosdidier A. 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. 2007. **90p**
- [2] Petronson J., Dwyer J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*.1998; 18:1995-2018.
- [3] Karp G. Biologie moléculaire et cellulaire. 3^{ème} édition. France : De Boeck. 2004. **850p**.
- [4] Voet D., Voet J. G. Biochimie. 2^{ème} édition. France : De Boeck. 2005. 1600p.
- [5] Gauchard P. A. Les interactions de faible énergie. [En ligne].http://www.umvf.biomedicale.univparis5.fr/.../gauchard_pierre_alexis_P05.pdf. Consulté le: [16/03/2011].
- [6] Merzoug.A. Étude in silico de l'inhibition de la peptide déformylase .Thèse de Magistère. Univ Mentouri Constantine. 2012.**65p**.
- [7] Mokrani E.H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de Magistère. Univ Mentouri Constantine. 2012.**122p**
- [8] Arrault A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : Modélisation Moléculaire et Chimoinformatique. Orléans : Université d'Orléans. France. 2007. **176 p**.
- [9] Martin L. Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif : une application sur la protéine kinase FAK. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique. Montpellier : Université Montpellier 2. France. 2006. **149 p**.
- [10] Douguet D. Etude des interactions protéine-protéine et protéine-ligand par bio- et chimie-informatique structurale : Identification de petites molécules bio-actives. Thèse d'habilitation à diriger des recherches : pharmacologie. Valbonne : Université de Nice-Sophia Antipolis. France. 2007. **65 p**.
- [11] RCSB PDB. RCSB PDB statistics. [En ligne] http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html. Consulté le : [17-04-2011].
- [12] Monge A. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico» de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat d'université : Chimie Informatique et Théorique. Orléans : Université d'Orléans. France. 2006. **154 p**.

[13] Renvez G. Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking. Thèse de doctorat d'université: Nanophysique. Toulouse : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 2010. **163 p.**

[14] Thiriot E. Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. Thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. 2009. **291 p.**

[15] Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase – Substances antibactériennes a l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat d'université : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2007. **90p.**

[16] Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., HueyR., Lindstrom W., Hart W. E., et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*. 1998; 19:1639-1662.

[17] Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*. 1997; 267:727-48.

[18] Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology*. 1996; 261:470-489.

[19] Ewing T. J., Makino S., Skillman A. G., Kuntz I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-Aided Molecular*. 2001; 15:411-428.

[20] Abagyan R., Totrov M. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1994; 235:983-1002.

[21] Sousa S. F., Fernandes P. A., Ramos M. J. Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *Proteins*. 2006; 65:15-26.

[22] Taylor R. D., Jewsbury P. J., Essex J. W. 2003. FDS: flexible ligand and receptor docking with a continuum model and soft-core energy function. *J. Comput. Chem.* 24 (13), 1637–1656.

[23] Warren G. L., Andrews C.W., Capelli A. M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S. F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J. M., Peishoff C. E., Head M. S. 2006. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *Journal of Medicinal Chemistry*. 49: 5912-5931.

[24] Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. 2002. Principles of Docking: An Overview of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 47: 409-443.

- [25] Claußen H., Buning C., Rarey M., Lengauer T. 2001. FLEXE: Efficient Molecular Docking Considering Protein Structure Variations. *Journal of Molecular Biology*. 308: 377-395.
- [26] Welch W., Ruppert J., Jain A. N. 1996. Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. *Chemistry & Biology*. 3: 449-462.
- [27] Budin N., Majeux N., Caflisch A. 2001. Fragment-Based Flexible Ligand Docking by Evolutionary Optimization. *Journal of Biological Chemistry*. 382: 1365-1372.
- [28] Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. 2004. Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 57: 225-242.
- [29] Gohlke H.; Klebe G., 2002, Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl*, 41(15), 2644-2676.
- [30] Ferrara P., Gohlke H., Price D. J., Klebe G., Brooks III, C. L., 2004, Assessing scoring functions for protein-ligand interactions. *J. Med. Chem*, 47, 3032-3047.
- [31] Wang R., Lu Y., Fang X., Wang S., 2004, An extensive test of 14 scoring functions using the PDBbind refined set of 800 protein-ligand complexes. *J.Chem. Inf. Comput. Sci*, 44(6), 2114-2125.
- [32] Kramer B., Rarey M., Lengauer T., 1999, Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins: Struct, Funct, Genet*, 37(2), 228-241.
- [33] Goodsell D. S., Morris G. M., Olson A. J., 1996, Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *J. Mol. Recognit*, 9(1), 1-5.
- [34] Krammer A., Kirchhoff P. D., Jiang X., Venkatachalam C. M., Waldman M., 2005. LigScore: a novel scoring function for predicting binding affinities. *J.Mol. Graph. Model*, 23(5), 395-407.
- [35] Gohlke.H., Hendlich. M., Klebe.G., 2000, Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. *J. Mol. Biol*, 295(2), 337-356.
- [36] Charifson P. S., Corkery J. J., Murcko M. A., Walters W. P., 1999, Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J. Med. Chem*, 42 (25), 5100-5109.
- [37] Feher M., 2006, Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discov. Today*, 11(9-10), 421- 428.
- [38] Siedow J.N. 1991. plant lipoxygenase : structure and function. *Annu.Rev.PlantPhysiol.Plant Mol.Biol.*, 42, 145-188).

- [39] Martini D., et Iacazio G.,(1995)Les lipoxygenase et les voies métaboliques associées.O.C.L,5,374-385.
- [40] A. R. Brash, "Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 34, pp. **23679–23682**, 1999.
- [41] Funk, C. D.; Chen, X. S.; Johnson, E. N.; Zhao, L. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002**, *68-69*, **303-312**.
- [42] Radmark, O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995**, *12*, 171-184.
- [43] Ford-Hutchinson, A. W.; Gresser, M.; Young, R. N. 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem***1994**, *63*, **383-417**.
- [44] Samuelsson, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **1983**, *220*, **568-575**
- [45] Rouzer, C. A.; Matsumoto, T Samuelsson, B . Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and Leukotriene A4 synthase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, **857-861**
- [46] Shimizu, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, *81*, **689-693**.
- [47] Samuelsson, B.; Funk, C. D. Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4. *J Biol Chem* **1989**, *264*, **19469-19472**
- [48] Steinhilber, D. 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr Med Chem* **1999**, *6*, **71-85**.
- [49] Lewis, R. A.; Austen, K. F.; Soberman, R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* **1990**, *323*, **645-655**.
- [50] Hammond, M. L.; Kopka, I. E.; Zambias, R. A.; Caldwell, C. G.; Boger, J.; Baker, F.; Bach, T.; Luell, S.; MacIntyre, D. E. 2,3-Dihydro-5-benzofuranols as antioxidant-based inhibitors of leukotriene biosynthesis. *J Med Chem* 1989, *32*, 1006-1020.
- [51] Dailey, L. A.; Imming, P. 12-Lipoxygenase: classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors. *Curr Med Chem* **1999**, *6*, **389-398**.
- [52] Muri, E. M.; Nieto, M. J.; Sindelar, R. D.; Williamson, J. S. Hydroxamic acids as pharmacological agents. *Curr Med Chem* **2002**, *9*, **1631-1653**.
- [53] Brooks, C. D.; Summers, J. B. Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation. *J Med Chem* 1996, *39*, **2629-2654**.

- [54] McMillan, R. M.; Walker, E. R. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **1992**, *13*, 323-330
- [55] Bird T.G.C., Dowell R.I., Edwards P.N., Foster S.J., McMillan R.M., Walker E.R.H., Waterson D., 1992. Methoxytetrahydropyrans. A new series of selective and orally potent 5-lipoxygenase inhibitors. *J. Med. Chem.*; **35**; 2600-2609.
- [56] Crawley G.C., Dowell R.I., Edwards P.N., Foster S.J., McMillan R.M., Walker E.R.H., Waterson D., 1992. Methoxytetrahydropyrans. A new series of selective and orally potent 5-lipoxygenase inhibitor. *J. Med. Chem.*; **35**; 2600-2609.
- [57] Fiorucci S., Meli R., Bucci M., Cirino G., 2001. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? *Biochem. Pharmacol.*; **62**; 1433-1438.
- [58] Julémont F., Dogné J.M., Pirotte B., de Leval X., 2004. Recent development in the field of dual COX / 5-LOX inhibitors. *Mini Rev. Med. Chem.*; **4**; 633-638
- [59] Weiner P. K., Kollman P. A. AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement. A General Program for Modeling Molecules and Their Interactions. *Journal of Computational Chemistry*. **1981**; *2*:287-303.
- [60] Dewar M. J. S., Zoebisch E. G., Healy E. F., Stewart J. J. P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Model. *Journal of the American Chemical Society*. **1985**; *107*:3902-3909.
- [61] Chikhi A., Bensegueni A. Comparative Study of the Efficiency of Three Protein-Ligand Docking Program. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. **2008**; *1*:161-165.
- [62] Vieth M., Hirst J. D., Kolinski A., Brooks C.L. Assessing energy functions for flexible docking. *Journal of Computational Chemistry*. **1998**; *19*:1612-22.
- [63] Lipinski C.A., Lombardo F., Domini B.W., Feney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**; *23*:3-25.
- [64] Molinspiration .Calculation of Moléculair Properties and Bioactivities Scor [En ligne] <http://www.molinspiration.com/cgi-nin/properties>. Consulté le [28 - 05 - 2014]

Annexes

Annexe 1

Tableau : liste de 110 complexes utilisés pour tester le programme de docking avec le RMSD

Numéro de complexe	Code PDB	RMSD	Numéro de complexe	Code PDB	RMSD
1	1JNQ	1.71	56	2X7T	1.36
2	1N8Q	1.03	57	2X7U	1.10
3	1NO3	0.41	58	3S7S	0.34
4	2Q7M	2.71	59	4GL5	0.49
5	2Q7R	2.09	60	4GL7	0.56
6	3RED	0.86	61	3VLL	0.59
7	2JFH	3.36	62	1EQG	9.03
8	3RUX	1.36	63	1EQH	8.82
9	2WJP	0.88	64	1HT5	1.83
10	3V7C	2.94	65	1HT8	16.28
11	3V7R	2.46	66	4O1Z	1.39
12	3V7S	1.81	67	1CX2	14.14
13	3V8K	0.50	68	1IGX	3.31
14	3V8L	0.78	69	2AW1	1.01
15	3ZM5	0.58	70	3HS6	1.82
16	3ZM6	0.62	71	3LN1	18.84
17	4EEQ	0.63	72	3LNO	0.96
18	4GLW	2.44	73	3MQE	3.07
19	4GLX	0.66	74	3NT1	0.74
20	4JSC	0.99	75	3PGH	14.22
21	4KK8	1.72	76	3Q7D	0.89
22	1K8Q	1.39	77	3QMO	2.26
23	1RAZ	2.60	78	3RR3	0.65
24	1R50	1.58	79	4COX	15.60
25	2NW6	1.46	80	4FM5	1.15
26	3ICW	1.17	81	4LLZ	0.65
27	4GXN	2.75	83	4M10	16.27
28	4LIP	0.99	83	4M11	1.02
29	2DJF	5.15	84	4DPR	0.49
30	3G0C	0.72	85	4GAA	1.46
31	3G0D	0.66	86	4JE2	3.58
32	3N0T	0.62	87	4OK3	0.50
33	3QBJ	1.83	88	1AQ1	1.17
34	4G1F	0.38	89	1EV1	1.02
35	3E7A	1.03	90	1GIH	1.07
36	3PGL	3.89	91	1QIT	1.12
37	3QCG	6.94	92	1A9M	1.98
38	3QCJ	1.32	93	1B6J	1.55
39	3QCL	0.60	94	1QBR	1.89
40	4J51	1.68	95	2BE2	0.82
41	1O5A	1.39	96	3JVY	1.22
42	1O5C	1.57	97	3OXX	1.96
43	1O5E	0.97	98	1IKV	0.55
44	1O5F	1.37	99	1EC2	1.46
45	1VIJ	4.17	100	1KC3	1.66

46	1VIK	3.41	101	1W5W	1.44
47	3BKL	1.77	102	1W5Y	1.88
48	3BKK	1.44	103	3FX5	1.70
49	2X94	0.80	104	1DTQ	0.84
50	2X93	0.66	105	3MXE	1.82
51	2X91	2.38	106	1QBU	0.84
52	2X8Z	0.27	107	1K6C	1.80
53	1UZE	1.95	108	1AJL	0.91
54	2JFF	1.45	109	1WBM	1.59
55	2X7S	6.36	110	3DJK	1.27

Annexe 2 Format *gpf* de complexe 2Q7M

```

npts 40 40 40 # num.grid points in xyz
gridfld 2Q7Rprot.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C HD N OA SA # receptor atom types
ligand_types A C I NA OA N # ligand atom types
receptor 2Q7Rprot.pdbqt # macromolecule
gridcenter 74.849 65.576 15.954 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in
rad(A)
map 2Q7Rprot.A.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.C.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.I.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.NA.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.OA.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.N.map # atom-specific affinity map
elecmap 2Q7Rprot.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap 2Q7Rprot.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0,
constant

```

Annexe 3 Format *dpf* de complexe 2Q7M

```

autodock_parameter_version 4.2 # used by autodock to validate
parameter set
outlev 1 # diagnostic output level
intelec # calculate internal
electrostatics
seed pid time # seeds for random generator
ligand_types A C I NA OA N # atoms types in ligand
fld 2Q7Rprot.maps.fld # grid_data_file
map 2Q7Rprot.A.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.C.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.I.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.NA.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.OA.map # atom-specific affinity map
map 2Q7Rprot.N.map # atom-specific affinity map
elecmap 2Q7Rprot.e.map # electrostatics map
desolvmap 2Q7Rprot.d.map # desolvation map

```

```

move 2Q7Rlig.pdbqt
about 75.3046 64.2225 14.8934
tran0 random
random
quaternion0 random
dihe0 random
or random
torsdof 11
rmstol 2.0
extnrg 1000.0
e0max 0.0 10000
number of retries
ga_pop_size 150
population
ga_num_evals 2500000
evaluations
ga_num_generations 27000
ga_elitism 1
survive to next generation
ga_mutation_rate 0.02
ga_crossover_rate 0.8
ga_window_size 10
ga_cauchy_alpha 0.0
distribution
ga_cauchy_beta 1.0
distribution
set_ga
GA or LGA
sw_max_its 300
local_search
sw_max_succ 4
changing rho
sw_max_fail 4
changing rho
sw_rho 1.0
sample
sw_lb_rho 0.01
ls_search_freq 0.06
local search on individual
set_psw1
Wets parameters
unbound_model bound
ga_run 10
runs
analysis
analysis

```

```

# small molecule
# small molecule center
# initial coordinates/A or
# initial orientation
# initial dihedrals (relative)
# torsional degrees of freedom
# cluster_tolerance/A
# external grid energy
# max initial energy; max
# number of individuals in
# maximum number of energy
# maximum number of generations
# number of top individuals to
# rate of gene mutation
# rate of crossover
#
# Alpha parameter of Cauchy
# Beta parameter Cauchy
# set the above parameters for
# iterations of Solis & Wets
# consecutive successes before
# consecutive failures before
# size of local search space to
# lower bound on rho
# probability of performing
# set the above pseudo-Solis &
# state of unbound ligand
# do this many hybrid GA-LS
# perform a ranked cluster

```

Résumé

Résumé :

Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur l'inhibition de la 5-lipoxygénase (5-LOX) en tant qu'enzyme impliquée dans les maladies inflammatoires.

Le programme de docking moléculaire AutoDock a été développé pour aider à la mise au point des molécules à activité thérapeutique. Avec un bon pourcentage de valeur RMSD inférieures à 2Å et un coefficient de corrélation fort, Les performances du programme AutoDock sont incontestables. Il a été utilisé pour étudier l'inhibition de la 5-LOX par divers composés provenant de la littérature.

Nous avons réalisé plusieurs substitutions sur l'acide caféique, l'énergie d'interaction a pu être améliorée de -3.08 Kcal/Mole à -5.04 Kcal/Mole. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME du composé 12 issu de la substitution qui se présente comme un inhibiteur théorique plus affin et plus sélectif de la 5-LOX.

L'approche *in silico* par AutoDock s'avère donc une méthode fiable pouvant contribuer de manière efficace au développement de nouveaux inhibiteurs d'une enzyme donnée.

Mots clés: 5-lipoxygénase, AutoDock, Docking moléculaire, Inhibiteur, Energie d'interaction.

Abstarct

In our research , we have focused on the inhibition of 5-lipoxygenase(5-LOX),which is considered as an enzyme that involved in the inflammatory diseases.

The Molecular docking program AutoDock was developed to assist the development of molecules with therapeutic activity. With good percentage of RMSD values less than 2 Å and a strong coefficient of correlation. The performance of AutoDock program is undeniable. It has been used to study the inhibition of 5-LOX by various compounds from the literature.

We have realized several substitution on the caffeic acid. The binding energy was increased from -03,08 Kcal/Mole to -05,08 Kcal/Mole. The application of Lipinski rule informs us in a positive way about ADME properties of the compound 12 which is derived from the substitution, and which is considered as a better theoretical inhibitor of 5-LOX.

The approach of the Molecular Docking with AutoDock program is considered among the best technics which is used nowadays to develop more effective enzymes.

Key words : 5-Lipoxygenase, AutoDock, Molecular Docking,inhibitor, Binding energy

الملخص

تركز في عملنا هنا على تثبيط إنزيم 5-ليبوكسيجيناز الذي يتدخل في الأمراض الالتهابية.

وقد تم تطوير برنامج AUTODOCK للمساعدة في اكتشاف الجزيئات ذات النشاطات العلاجية , مع نسبة جيدة لقيم RMSD أقل من 2 Å ومعامل ارتباط يكون كبير , النتائج التي يقدمها برنامج AutoDock تكون محققة وقد تم استعماله لدراسة تثبيط إنزيم 5-LOX بواسطة مركبات مختلفة ناتجة من المؤلفات.

لقد قمنا بإجراء تغييرات عديدة على مركب حمض الكافريك , فاستلحنا تحسين طاقة الارتباط من - 03.08 ك كال/مول إلى - 05.04 ك كال/مول. إن تطبيق قاعدة LIPINSKI على المثبط 12 يؤكد تميزه بخصائص ADME ما يجعله كأفضل مثبط نظري.

تعتبر طريقة DOCKING من أفضل التقنيات المستعملة حالياً لتطوير وعرض مثبطات أكثر فعالية لإنزيم معين.

الكلمات المفتاحية: إنزيم 5-ليبوكسيجيناز, AUTODOCK, مثبط , DOCKING, طاقة الارتباط.

Présenté par :

BOUTRIF Chams Eddine

MERDASSI Abderraouf

Dirigé par :

Pr .BENSEGUENI Abderrahmane.

Soutenu le : 22/06/2014

Thème

Etude *in silico* de la 5-lipoxygénase en tant qu'enzyme impliquée dans les maladies inflammatoires

Résumé :

Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur l'inhibition de la 5-lipoxygénase (5-LOX) en tant qu'enzyme impliquée dans les maladies inflammatoires.

Le programme de docking moléculaire AutoDock a été développé pour aider à la mise au point des molécules à activité thérapeutique. Avec un bon pourcentage de valeur RMSD inférieures à 2Å et un coefficient de corrélation fort, Les performances du programme AutoDock sont incontestables. Il a été utilisé pour étudier l'inhibition de la 5-LOX par divers composés provenant de la littérature.

Nous avons réalisé plusieurs substitutions sur l'acide caféique, l'énergie d'interaction a pu être améliorée de -3.08 Kcal/Mole à -5.04 Kcal/Mole. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME du composé 12 issu de la substitution qui se présente comme un inhibiteur théorique plus affin et plus sélectif de la 5-LOX.

L'approche *in silico* par AutoDock s'avère donc une méthode fiable pouvant contribuer de manière efficace au développement de nouveaux inhibiteurs d'une enzyme donnée.

Mots clés: 5-lipoxygénase, AutoDock, Docking moléculaire, Inhibiteur, Energie d'interaction.

Devant le jury

Président : Pr. CHIKHI A.
Rapporteur : Pr. BENSEGUENI A.
Examineur : Mr. MOKRANI E, H.

Pr. Université Constantine 1.
Pr. Université Constantine 1.
M.A.B Université Constantine 1.

2013-2014