



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des frères Mentouri Constantine
Faculté des sciences de la nature et de la vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : *Biochimie moléculaire et santé*

Intitulé :

Etudes des mécanismes d'interactions des inhibiteurs de la 5-LOX

Présenté et soutenu par :
BOUDERSA Yacer

Le : 05/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIKHI A. (Professeur - UFM Constantine)

Rapporteur : BENSEGUENI A. (Professeur – UFM Constantine)

Examineur : MOKRANI E.H (MAA – UFM Constantine)

**Année universitaire
2015 – 2016**

Dédicaces

♥ Je remercie en premier lieu 'ALLAH' le Miséricordieux de ma avoir donné la force, Volonté, et la patience durant toutes mes années d'étude.

Je décide ce travail à :

♥ A ma chère mère pour sa tendresse, son amour, son affection, sa patience, et ses valeureux conseils durant mes années d'études.

♥ A mon père pour son soutien, sa gentillesse, son aide et sa confiance et surtout pour sa noblesse infinie.

♥ *A ma fleure de mon cœur : ma sœur Ahlem.*

♥ *A tous mes frères (bassem, farouk, Rabie et le petit cher Riad)*

♥ *A mes étoiles brillants : mes neveux wail et Ayoub et surtout ma petite nièce Nour*

♥ *A toute ma famille*

♥ *A tous mes amis.*

♥ *A toute l'équipe de formation master BMS chaque un a son nom.*

♥ *A tous mes collègues de travail chaque un a son nom*

Et surtout

♥ *A ma nouvelle petite nièce Loudjaine* ♥

A toi qui m'a toujours soutenu, supporté et était toujours présenté, même dans les pires moments.

BOUDERSA Yacer

Remerciements

Au terme de ce travail, on tient à remercier en premier lieu à « ALLAH » le bon dieu, le Miséricordieux de nous avoir donné la force, Volonté, et la patience d'achever cette modeste étude.

Mes vifs remerciements vont aussi à **Mr CHIKHI Abdelouahab** Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine, vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail. Pour l'honneur d'avoir accepté de Présider le jury et pour vos conseils les plus importants, merci pour votre gentillesse.

Je souhaite remercier très chaleureusement **Mr BENSEGUENI Abderrahmane** Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine, mon directeur de mémoire. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité votre efficacité et surtout votre rigueur scientifique. Merci pour votre aide et votre regard critique qui m'ont été grandement utiles au cours de mon travail pratique et lors de la rédaction de ce manuscrit, malgré toutes vos occupations. Merci pour votre gentillesse et surtout merci beaucoup m'avoir ouvert cette chance pour continuer mes études.

Un énorme merci à mon co-superviseur et examinateur **Mr MOKRANI E.H** maître-assistant classe A à l'université des Frères Mentouri Constantine, pour sa très importante contribution pratique à ce travail de thèse. C'est un plaisir de travailler avec une personne aussi talentueuse, droite et infatigable, vous me fait l'honneur d'être l'examineur du jury de ce mémoire. Je vous remercie de l'intérêt que vous apportez à ce travail. Je vous prie de trouver ici l'assurance de ma considération la plus respectueuse.

Mes vifs remerciements vont aussi à **Mme TENIOU Soumia** maître-assistante classe A ma 2^{ème} co-superviseur pour sa très importante contribution pratique à ce travail de thèse. C'est un plaisir de travailler avec une personne aussi talentueuse, droite et infatigable.

Je n'oublie jamais de faire le plaisir de mettre tous mes respects, mes salutations et mes remerciements à tous mes collègues de ma promotion chaque un de son nom, de m'avoir encouragé et me respecter.

Merci

La liste des abréviations

12-HPETE :	acide de 12 (S) -hydroperoxy-6-trans-cis-8,11,14-eicosatétraénoïque
12-LOX :	12-lipoxygénase
13-HPODE :	13-hydroperoxy-9Z,11E-octadecadiénoic acid
15-HPETE :	acide de 15 (S) -hydroperoxy-6-trans-cis-8,11,14-eicosatétraénoïque
15-LOX :	15-lipoxygénase
5-HPETE :	acide de 5 (S) -hydroperoxy-6-trans-cis-8,11,14-eicosatétraénoïque
5-LOX :	5-lipoxygénase
AA :	Acide arachidonique
AE :	algorithme évolutionnaire
AINS :	Anti-inflamatoire non stéroïdiens
AKBA :	acide kéto boswilique
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
APGI :	Acides gras poly-insaturés
ATP :	adénosine tri phosphate
ClogP :	logarithme du rapport des concentrations d'une substance dans l'octanol et dans l'eau.
CLP :	Coactosin-like protein
COX-2 :	Cyclooxygénase-2
cPLA2 :	La phospholipase A2 cytosolique
CV :	criblage virtuelle
DTT :	Dithiothréitol (agent réducteur)
EDTA :	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
ERK :	Extracellulaires-signal-regulated kinase
FLAP :	Five lipoxygenase activatig protein
Grb2 :	la protéine récepteur du facteur de croissance2
GSTM1 :	Glutathion S-transférase M1
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène (solution aqueuse appelée eau oxygénée)
K_m :	constant de michaelise menten
Kpb :	kilo paire de base lignée cellulaire des cellules humaines couramment utilisée dans le domaine de
LnCaP :	L'oncologie
LT :	Leucotriènes
LTA :	Leucotriène A
LTB :	Leucotriène B
LTC :	Leucotriène C
LTE :	Leucotriène E
MAP-kinase :	
p38 :	p38 mitogen-activated protein kinase
MKK :	Mitogen-activated protein kinase
NDGA :	acide nordihydroguaiaretique
NIS :	séquences d'importation nucléaire
PC :	phosphatidylcholine
PC3 :	Cellules prostatique3

PDB :	Protein Data Bank
PKC :	Phosphokinase C
PMLN :	Polymorphonuclear Leukocyte
RMN :	résonance magnétique nucléaire
Ser-271 :	Sérine-271
TGFβ :	facteur de croissance des tumeurs- β
tHGA :	2,4,6-Trihydroxy-3-Geranylacetophenone
TNFα :	facteur de la nécrose des tumeurs- α
VMD :	Visual Molecular Dynamics
RMSD :	Ecart quadratique moyen déviation

Liste des figures

Figure 1 : Aperçu du criblage virtuel.....	5
Figure 2 : Le gène de la 5-LOX.....	9
Figure 3 : Conversion de l'acide arachidonique en leucotriènes (LT).....	11
Figure 4 : Les domaines de la 5-LOX.....	13
Figure 5 : La localisation des éléments fonctionnels du domaine catalytique...15	
Figure 6 : Le positionnement de l'hélice α_2 dans la 5-LOX.....	16
Figure 7 : Le site actif de la 5-LOX et la cavité interne.....	17
Figure 8 : L'activation de la 5-LOX dans la cellule.....	20
Figure 9 : Les effets intracellulaires des métabolites de la 5-LOX.....	27
Figure 10 : La connexion entre l'activité de la 5-LOX et l'activité de NF-kB dans le cancer de la prostate.....	28
Figure 11 : l'hyperforine.....	30
Figure 12 : Les inhibiteurs redox de la 5-LOX.....	31,32
Figure 13 : les chélateurs du Fer non-hémique.....	33,34,35
Figure 14 : Les inhibiteurs non-redox de la 5-LOX.....	38,39,40,41
Figure 15 : La cible thérapeutique (5-LOX).....	46
Figure 16: Le positionnement du site actif dans la chaîne A de la 5-LOX.....	47
Figure 17 : Les acides aminés constituant le site actif de la 5-LOX.....	47
Figure 18 : Résultats en pourcentage obtenus par Surfex à deux intervalles du RMSD (Å).....	50
Figure 19: La visualisation des différents résultats RMSD.....	51
Figure 20 : Corrélation entre l'activité biologique (pIC50) des différents complexes (62) et leurs affinités données par Surfex.....	53
Figure 21 : Le composé 23 (un dérivé de l'aminothiazol).....	54
Figure 22: l'emplacement du composé 23 dans le site actif de la 5-LOX.....	54

<u>Figure 23:</u>	Mode d'interaction du composé 23 dans le site actif de la 5-LOX..	55
<u>Figure 24:</u>	Mode d'interaction du composé 1 dans le site actif de la 5-LOX...	57
<u>Figure 25:</u>	L'emplacement du composé 2 dans le site actif de la 5-LOX	58
<u>Figure 26:</u>	Mode d'interaction du composé 2 dans le site actif de la 5-LOX...	58
<u>Figure 27:</u>	Mode d'interaction du composé 3 dans le site actif de la 5-LOX...	59
<u>Figure 28:</u>	L'emplacement du composé 4 dans le site actif de la 5-LOX	60
<u>Figure 29:</u>	Mode d'interaction du composé 4 dans le site actif de la 5-LOX...	60
<u>Figure 30:</u>	L'emplacement du composé 5 dans le site actif de la 5-LOX	61
<u>Figure 31:</u>	Mode d'interaction du composé 5 dans le site actif de la 5-LOX....	62

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Différents logiciels du docking moléculaire.....	7
<u>Tableau 2</u> : Structures secondaires des chaînes A et B de la 5-LOX.....	12
<u>Tableau 3</u> : L'activité mitogène des produits du métabolisme de l'acide arachidonique par la 5-LOX.....	27
<u>Tableau 4</u> : Les dérivés de 1,5diarylpyrazol.....	35
<u>Tableau 5</u> : Les dérivés de l'aminothiazol.....	36
<u>Tableau 6</u> : Résultats obtenus de RMSD des complexes protéines-ligands.....	49
<u>Tableau 7</u> : Résultats de l'analyse par régression linéaire.....	52
<u>Tableau 8</u> : Valeurs des affinités d'interaction des 5 nouveaux composés.....	57
<u>Tableau 9</u> : Propriété pharmacocinétique du composé 23 et ses dérivés.....	63

Table des matières

Introduction	1
 Chapitre 1 : Le Docking moléculaire	
1. Définition.....	3
2. Généralités.....	3
3. Les approches du docking.....	3
3-1. L'approche combinatoire.....	3
3-2. L'approche stochastique.....	3
3-3. L'approche déterministe.....	4
4. L'obtention des structures.....	4
5. Les applications.....	4
5-1. Le criblage virtuel.....	4
5-2. Conception de médicament basée sur le docking de fragments.....	6
6. Les programmes utilisés dans le docking moléculaire.....	6
7. Surflex.....	7
7-1. La génération protomol.....	7
 Chapitre 2:La 5-LOX et le cancer de la prostate	
1. Généralités.....	8
2. La 5-lipoxygénase.....	8
2-1) Le gène de la 5-LOX.....	9
2-2) La nomenclature internationale de la 5-LOX.....	10
2-3) La structure générale de la 5-LOX.....	11
2-4) Les structures secondaires de la 5-LOX.....	11
2-5) Les domaines structuraux de la 5-LOX.....	12
2-6) Les sites présentés par la 5-LOX.....	13

2-6-1)	Le site de la phosphorylation MAPKAP2.....	14
2-6-2)	Le domaine de la liaison SH3.....	14
2-7)	Le site actif.....	15
2-7-1)	Les facteurs stimulant l'activité de la 5-LOX.....	17
2-7-2)	Le Ca ⁺²	17
2-7-3)	La phosphatidylcholine.....	18
2-7-4)	L'ATP.....	18
2-7-5)	Les lipidhydroperoxyde.....	18
2-8)	La phosphorylation de la 5-LOX.....	18
2-9)	Autres protéines relié à la 5-LOX.....	21
2-9-1)	La 5-LOX activating-protein (FLAP).....	21
2-9-2)	Facteur de croissance lié à la protéine récepteur 2 (Grb2)	21
2-9-3)	Coactosin-like protein (CLP).....	22
2-9-4)	TGFβ receptor-I-associated protein-1 (TRAP-1).....	23
2-10)	La localisation subcellulaire de 5-LOX.....	23
3.	La prostate.....	24
3-1)	Le cancer de la prostate.....	24
3-2)	L'implication de la 5-LOX dans le cancer de la prostate.....	25
3-3)	Les traitements de cancer de la prostate.....	29

Chapitre 3 : les inhibiteurs de la 5-LOX

1.	Les classes des inhibiteurs de la 5-LOX.....	30
1-1	Les inhibiteurs non-spécifiques.....	30
2-1	Les inhibiteurs spécifiques (compétitifs).....	30
2-1-1)	L'inhibition redox.....	31
2-1-2)	L'inhibition par l'interaction avec le Fer du site actif.	32
1)	Zileuton.....	32

2) BW-A4C.....	32
3) Dérivé de l'indométhacine.....	32
4) Tepoxaline et ses dérivés.....	33
5) BW B70C.....	33
6) NDGA.....	33
7) 1-(benzyloxy)-2-heptyn-4-ol et 1-[(4méthylbenzyl)-oxy]-2-heptyn-4-ol.....	33
8) Les dérivés de 1,5 diarylpyrazol.....	35
9) Les dérivés aminothiazol.....	35
2-1-3) L'inhibition non-redox.....	36
1) ZD-2138 et L697198.....	36
2) Isoimpératorine.....	37
3) ER-34122.....	37
4) PF-4191834.....	37
5) C ₂₉ H ₂₉ FN ₂ O ₅ S.....	37
6) Les analogues de (tHGA).....	37
7) Les nouveaux inhibiteurs développés.....	38

Chapitre 4 : Matériels et méthodes

1. Matériels.....	42
1-1-Microordinateur.....	42
1-2-Les programmes.....	42
2. Méthodes.....	42
2-1-La préparation de la cible thérapeutique (5-LOX).....	42
2-2-La sélection et la préparation des inhibiteurs.....	43
2-3-Test d'évaluation de Surflex.....	43
2-3-1) RMSD.....	43

2-3-2) Le coefficient de corrélation.....	44
2-4-Les essais de modélisation.....	44
2-4-1) Les substitutions.....	44
2-4-2) Les ligands et leurs similaires.....	44
2-5-Analyse visuelle des interactions.....	44
2-6-Filtrage ADME (règle de Lipinsky « 1997 »).....	45

Chapitre 5 : Résultats et discussion

1- Analyse visuelle de l'enzyme.....	46
2- Tests de fiabilité du programme de docking.....	48
2-1) Le test RMSD.....	48
2-2) Visualisation des molécules superposées.....	50
2-3) Le coefficient de corrélation (r).....	51
3- Etude et proposition de nouveaux inhibiteurs.....	53
4-1) Etude d'interaction du composé N° 01.....	56
4-2) Etude d'interaction du composé N° 02.....	57
4-3) Etude d'interaction du composé N° 03.....	59
4-4) Etude d'interaction du composé N° 04.....	59
4-5) Etude d'interaction du composé N° 05.....	61
4- Application de la règle LIPINSKI (filtrage ADME).....	62
Conclusion.....	64
Les références bibliographiques.....	66

Annexes

Résumés

INTRODUCTION

Introduction :

Le processus de découverte d'un médicament est long et onéreux. Entre 12 et 15 ans et près d'un milliard de dollars sont nécessaires à la mise sur le marché d'un médicament.

Actuellement les méthodes virtuelles capables de prédire l'affinité de produits sont de plus en plus utilisées. En effet, un certain nombre de médicaments mis sur le marché proviennent d'une conception rationnelle basée sur des stratégies de criblage virtuel. Citons à titre d'exemple :

- Les inhibiteurs de la COX-2 jouent un rôle dans la réduction des risques de cancer du pancréas, car ils peuvent induire l'apoptose (Célécoxib « CELEBREX »)[1].

L'avantage majeur de ces méthodes est d'aider à la prédiction de molécules en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser les composés (lorsque ceux-ci proviennent de chimio-thèques commerciales). Le criblage virtuel s'apparente à une succession de techniques dont le point de départ est le pré-filtrage des chimio-thèques à cribler. Souvent, la sélection des composés avant le criblage virtuel suit des règles spécifiques aux médicaments déjà connus et mis sur le marché.

Le docking moléculaire est l'outil par excellence pour réaliser un criblage virtuel. Dans notre travail nous tenterons d'appliquer cette méthode à l'étude de la lipoxigenase5 (5-LOX), car beaucoup de travaux ont montré que les métabolites provenant de cette voie sont impliqués dans la progression de différents types de cancer, notamment le cancer de la prostate. Dans ce cas la 5-LOX est surexprimée, et son inhibition peut diminuer la prolifération et induire l'apoptose dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer de la prostate est parmi les maladies les plus fréquentes en Algérie. Le cancer de la prostate est donc un véritable problème de santé publique auquel nous tentons de pallier en apportant notre modeste contribution par une étude théorique de l'inhibition de la 5-LOX en recherchant des molécules biologiquement plus actives par les méthodes de simulation par « **docking moléculaire** ».

Dans le présent travail, le premier chapitre sera consacré à l'étude bibliographique de l'utilisation de l'outil du docking moléculaire, qui représente un moyen moderne pour détecter in silico des inhibiteurs de cibles d'intérêt thérapeutiques. Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude bibliographique de l'enzyme 5-LOX (structure, rôle, localisation, différents interactions avec d'autre structures ...), et son implication dans le cancer de la prostate. Dans

le troisième chapitre seront citées les différentes classes des inhibiteurs de la 5-LOX, et notamment les inhibiteurs compétitifs. Dans le quatrième chapitre, on retrouvera la partie matériels et méthodes permettant d'évaluer le score d'affinité des molécules sélectionnées dans ce travail et d'élucider les mécanismes d'interaction mis en jeu entre un ligand et son récepteur. Enfin le cinquième chapitre sera consacré aux résultats et discussion.

CHAPITRE I

LE DOCKING MOLÉCULAIRE

1. Définition :

Le docking est une méthode qui prédit l'orientation d'une petite molécule par rapport à une macromolécule pour former le complexe le plus stable. Il est fréquemment utilisé dans la reproduction des médicaments pour réduire les essais expérimentaux.

2. Généralités :

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir de molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une des méthodes expérimentales. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée [2].

3. Les approches du docking :

3-1) L'approche combinatoire :

Cette approche est basée sur des grilles de valeurs pour chaque degré de liberté, et chacune de ces grilles est explorée de manière combinatoire au cours de la recherche. En raison de l'effet combinatoire, le nombre d'évaluations augmente bien plus rapidement que le nombre de degrés de liberté. Pour cela, des critères de fin sont imposés pour éviter à l'algorithme de parcourir des portions de l'espace qui ne mèneraient qu'à de mauvaises solutions [3].

Un échantillonnage exhaustif est irréalisable, mais plusieurs heuristiques utilisent une approche exhaustive combinée avec des techniques de filtrage ou avec une reconstruction incrémentale du ligand. Le principe général consiste à couper le ligand en fragments rigides et flexibles : un ou plusieurs fragments rigides sont positionnés à la surface de la protéine à partir desquels le ligand est ensuite reconstruit [2].

3-2) L'approche stochastique :

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand. Habituellement il s'agit de modifier un degré de liberté à chaque fois. L'un des points faibles de cette méthode est l'incertitude de convergence. Pour l'éviter, il faut multiplier les calculs, indépendamment les uns des autres [3]. Les principaux

algorithmes stochastiques sont ; la méthode de Monte Carlo, algorithme évolutionnaire (AE) et recherche taboue [2].

3-3) L'approche déterministe :

Ces méthodes basées sur les techniques de simulations par mécanique moléculaire (dynamique moléculaire et minimisation) sont séduisantes au regard des principes physiques sous-jacents. Cependant, elles sont coûteuses et leur capacité à franchir des barrières d'énergie libre élevées dans des temps de calcul réalistes est très limitée. Néanmoins, l'échantillonnage peut être amélioré en abaissant ces barrières, via une réduction des composantes répulsives des interactions électrostatique et de van der Waals [2].

L'exemple le plus répandu est la simulation de dynamique moléculaire. Cette méthode est très rarement employée en Docking du fait des moyens qu'elle demande et de son biais pour les minima locaux.

Pour simuler les interactions protéines-ligands, nous avons choisi un programme de docking. Il s'agit d'un programme parmi les plus répandus Surflex, qui utilise une méthode incrémentielle [3].

4. L'obtention des structures :

La majorité des structures protéiques sont disponibles via la «Protein Data Bank ». Ces structures pouvant être étudiées par la cristallographie aux rayons X ou la résonance magnétique nucléaire (RMN). Un grand nombre de structures d'une même molécule avec ou sans ligand permet d'avoir une information pertinente. Quand la méthode expérimentale n'est pas possible ou n'a pas été encore réalisée, la solution à envisager en premier est une approche par modélisation comparative [3].

5. Les applications :

5-1. Le criblage virtuel :

Les nombres grandissants de cibles génomiques d'intérêt thérapeutique et de macromolécules (protéines, acides nucléiques) pour lesquelles une structure tridimensionnelle (3-D) est disponible rendent les techniques de criblage virtuel de plus en plus attractives pour des projets d'identification de molécules bioactives [4,5,6]. Par criblage virtuel, on entend tout procédé de recherche électronique dans des banques de données moléculaires permettant la sélection de molécules. La requête peut être effectuée sous différents types de contraintes

CHAPITRE I : Le docking moléculaire

(descripteurs physicochimiques, pharmacophore, topologie d'un site actif) et doit aboutir à la sélection d'un faible pourcentage (1-2%) de molécules présentes dans la chimiothèque (banque de données de ligands) de départ.

Les principes actifs (PA) sont généralement de petites molécules organiques de moins de 30 atomes. L'espace chimique des ligands correspondant est estimé à environ 10^{60} molécules [3]. En plus de ce critère de taille, quatre autres règles permettent de caractériser la plupart des PA : ils doivent avoir moins de 5 donneurs et 10 accepteurs de liaison hydrogène, un poids moléculaire inférieur à 500 g/mol, et un ClogP inférieur à 5 (LogP est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau. $\text{LogP} = \text{Log}(\text{Coct}/\text{Ceau})$) [2]. Tout criblage virtuel se décompose en trois étapes d'égale importance:

- La mise au point de la chimio-thèque de départ.
- Le criblage proprement dit.
- La sélection d'une liste de touches virtuelles.

Il est à noter que toute erreur à chacune de ces trois étapes aura des conséquences importantes se traduisant généralement par une augmentation du taux de faux positifs et de faux négatifs. Il convient donc d'être très attentif à chacune d'entre elles.

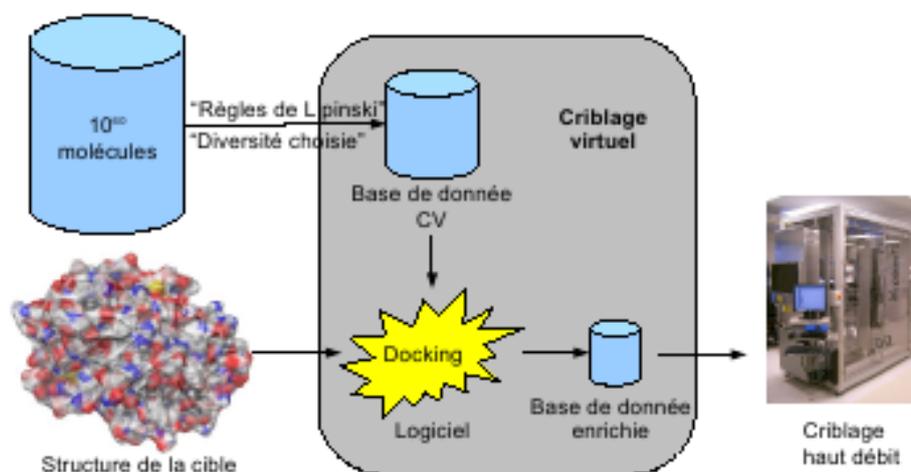


Figure 1 : Aperçu du criblage virtuel

5-2. Conception de médicament basée sur le docking de fragments :

Les performances très variables du criblage virtuel sont très probablement dues aux contraintes sur les vitesses de calculs, qui doivent rester compatibles avec le criblage de larges bases de données, et qui se répercutent dans les implémentations sous forme d'approximations délétères. Il est possible de prendre ce problème autrement, en partant de l'observation suivante : la plupart des principes actifs (PA) sont faits de régions relativement rigides, reliées entre elles par des connexions (**Figure 1**), les uns et les autres étant des fragments de molécules. Il est possible de positionner ces fragments à la surface de la cible, puis de les optimiser, de les connecter entre eux, de les agrandir ou de les relier, afin d'obtenir un hit, et dans le cas idéal, un nouveau PA [2].

6. Les programmes utilisés dans le docking moléculaire :

Le docking (ou ancrage) à haut débit consiste à prédire à la fois la conformation active et l'orientation relative de chacune des molécules de la chimiothèque sélectionnée par rapport à la cible d'intérêt. Très généralement, la recherche se focalise sur le site actif tel qu'il aura pu être déterminé expérimentalement (par mutagenèse dirigée par exemple). Il est important de prendre en compte à ce stade la notion de débit que l'on veut atteindre. Il faudra en effet considérer le meilleur compromis entre rapidité et précision. En général, le docking à haut débit nécessite une rapidité voisine de 1-2 minute/ligand. Actuellement de nombreux programmes de docking sont disponibles [7] dont certains sont distribués gratuitement (ex : **Autodock**) et d'autres sont payants (ex : **Gold**) voir **tableau 1**.

Ces méthodes utilisent soit le principe de complémentarité stérique (Dock, Fred) ou d'interactions moléculaires (AutoDock, FlexX, Glide, Gold, ICM, LigandFit, Surflex) afin de placer un ligand dans le site actif d'une cible. Généralement, la protéine est considérée comme rigide alors que la flexibilité du ligand est prise en compte relativement bien jusqu'à une quinzaine de rotules.

Dans le présent travail on va utiliser « Surflex » comme logiciel pour réaliser un docking sur une cible thérapeutique qui est la 5-lipoxygénase (5-LOX). Cette dernière est impliquée chez l'humain dans plusieurs maladies, certainement dont le cancer de la prostate qui nous intéresse ici.

Tableau 1 : Différents logiciel de docking moléculaire

Nom	Editeur	Site internet
Autodock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/Dock
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
flexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/Fred OpenEyes
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

7. Surflex :

Chaque bloc de commandes et d'options a un titre de section indiquant l'usage. Le bloc supérieur de commandes, par exemple, en relation avec la préparation du protocole. Les options de contrôle d'accueil et le dernier bloc de commandes ont beaucoup en commun à Surflex sim. Toutes les commandes doivent être dactylographiées en minuscules. Le format de fichier d'entrée préféré est Sybyl mol2. La sortie moléculaire est généralement dans le format Sybyl mol2 ainsi. MDL mol ou fichier sd (pour les ligands) et PDB (pour les protéines) sont également acceptables, bien que les fichiers PDB peuvent générer des erreurs ou des résultats inattendus, car le format est souvent variable. Toutes les molécules d'entrée doivent être protonées comme prévu à un pH physiologique, y compris hydrogènes apolaires. L'état de la protonation peut fortement affecter l'amarrage [8].

7-1. La génération du protomol :

Le docker utilise une cible pseudomolecule sur lequel il va aligner les ligands putatifs d'un site de liaison de la protéine. Il existe deux méthodes pour générer le protomol : « **ligandbased** » et « **residuebased** », Si un ligand existe, il est aligné avec le site actif de la protéine, ce dernier couvre également l'étendue de la poche de liaison souhaitée [8].

CHAPITRE II

LA 5-LOX ET LE CANCER

DE LA PROSTATE

1) Généralités :

Notre étude est sur 5-lipoxygénase (5-LOX) qui est un enzyme de la famille lipoxygénases que nous donnent après catalyser les acides gras des métabolites qui induisent plusieurs processus pathologique (inflammation, cancer, athérogènes, ostéoporose...) [9].

Les lipoxygénases dans les tissus des animaux sont des métalloenzymes. Un fer non hémique unique est présent dans chaque enzyme et il existe dans deux états d'oxydation Fe (II) et Fe (III). D'après le mécanisme de fonctionnement actuel, l'enzyme native est inactive dans la forme de Fe (II). Lorsqu'elle est traitée avec une quantité équimolaire du produit, le fer est oxydé sous la forme de Fe (III), conduisant à une enzyme active [10].

Les lipoxygénases (LOX) forment une famille hétérogène d'enzymes qui catalysent la peroxydation des lipides dioxygénation d'acides gras poly-insaturés (AGPI) en leurs dérivés correspondants hydroperoxydés. Dans les tissus animaux, le substrat le plus courant rencontré est l'acide arachidonique (C20: 4) [10].

Jusqu'à présent, trois principales isoenzymes ont été observés chez les êtres humains, classés en fonction de leur spécificité de position de l'oxygénation de l'acide arachidonique (AA) : la 5-, 12- et 15-LOX insérer O₂ au C-5, -12 et -15 positions des AA, respectivement, et produire le 5-, 12- et 15-HPETE (acide hydroperoxyeicosatetraenoic) [11]. Ces enzymes omniprésents jouent un rôle crucial dans certaines pathologies humaines telles que l'inflammation, les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et les troubles cancéreux [12].

2) La 5-lipoxygénase :

La lipoxygénase-5 (5-LOX) nécessite le Ca²⁺ et l'ATP [13]. C'est une classe de dioxygénases contenant du fer, qui catalyse l'hydroperoxydation des lipides, contenant une structure cis, cis-1,4-pentadiène. Les principaux produits sont des acides gras hydroperoxydés, qui sont habituellement rapidement réduits à des dérivés hydroxylés. La 5-LOX a un rôle central dans la biosynthèse des leukotriènes (LT) [14] (figure 4). La 5-lipoxygénase a été isolée à partir de leucocytes humains et porcins, les mastocytes murins et des cellules de leucémie basophiles de rat [15]. La 5-LOX faire les navettes entre le cytoplasme et le noyau. La 5-LOX est trouvé exclusivement dans le noyau, lorsqu'elle est phosphorylée sur la Ser-271. La fixation du calcium favorise la translocation du cytosol et la matrice nucléaire vers l'enveloppe nucléaire et l'association avec la membrane [14].

Les connaissances sur les rôles biologiques des 12- et 15-LOX sont limitées, En revanche, la 5-LOX, a été largement étudiée et pourrait être biologiquement la plus importante car est impliquée dans la biosynthèse des médiateurs inflammatoires puissants (LTs), qui est la seconde voie métabolique majeure de l'acide arachidonique (AA) [11].

2-1) Le gène de la 5-LOX :

Le grand gène humain 5-LOX (71,9 kpb) est situé sur le chromosome 10 et est divisé en 14 exons. Un gène de lipoxygénase ancestrale commune est suggéré par l'identique organisation intron-exon humain 5-, 12- et 15-LOX. Plusieurs sites d'initiation de transcription ont été décrits dans le gène de 5-LOX : le principal (position 0) est situé à 65 nucléotides en amont de l'ATG. Des éléments régulateurs dans le promoteur, et dans la partie distale du gène, sont indiqués. Le promoteur est riche en GC, indiqué par les multiples sites SP1 contraignant. Abréviations: TGFRE, élément TGF- β -sensibles (**Figure 2**) [14].

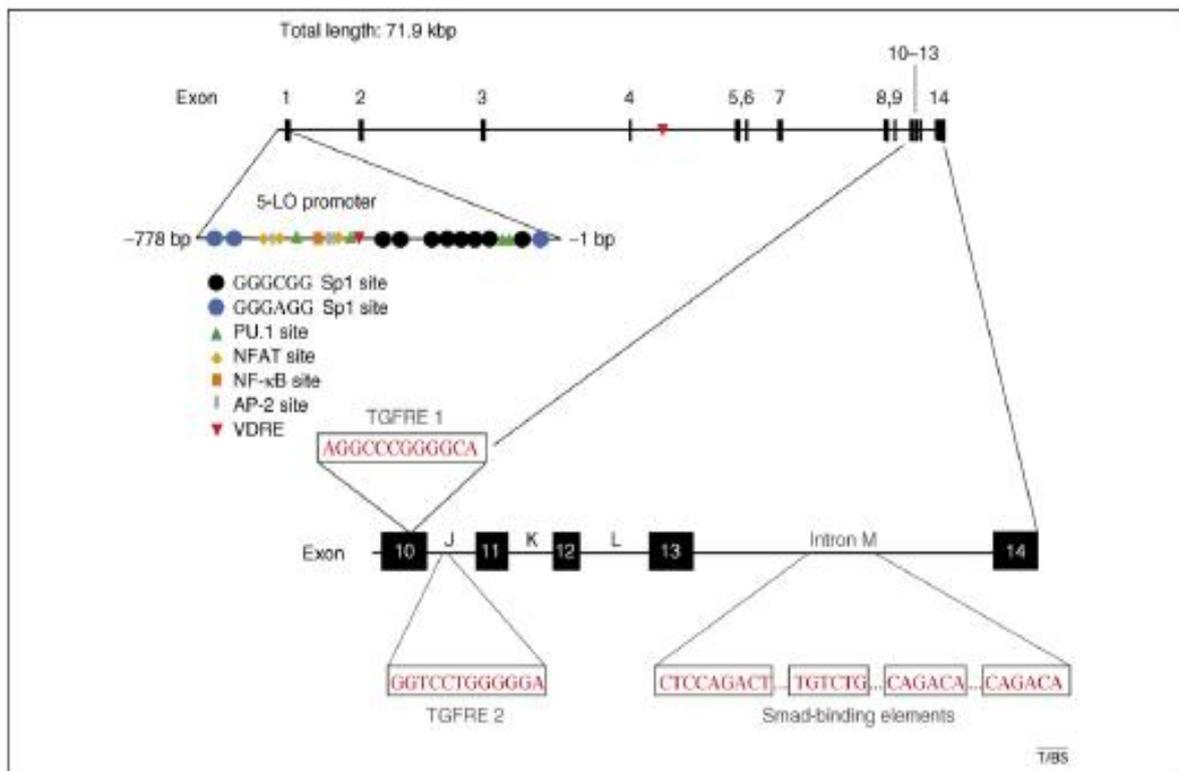


Figure 2 : Le gène de la 5-LOX

2-2) La nomenclature internationale de l'enzyme 5-LOX :

EC 1.13.11.34

EC 1 - Oxydoréductases.

EC 1.13 - Agissant sur les donateurs individuels avec incorporation de l'oxygène moléculaire (des oxygénases). L'oxygène ne doit pas être intégré dérivé de l'O₂.

EC 1.13.11 - Avec l'incorporation de deux atomes d'oxygène.

EC 1.13.11.34 - Arachidonate 5-lipoxygénase.

Nom accepté : arachidonate 5-lipoxygénase.

Autres noms : 5 Δ -lipoxygénase, Δ^5 -lipoxygénase, C-5-lipoxygénase, LTA synthase, arachidonic 5-lipoxygénase, arachidonic acid 5-lipoxygénase, leucotriène A₄ synthase leukotriene-A₄ synthase.

Nom systématique : arachidonate : oxygène 5-oxidoreductase [16].

Dans la nomenclature de la lipoxygénase le nombre se réfère au carbone de l'acide arachidonique à laquelle l'oxygène est ajouté [14].

La 5-LOX catalyse la conversion de l'acide arachidonique (AA) en acide 5 (S) - hydroperoxy-6-trans-cis-8,11,14-eicosatétraénoïque (5-HPETE), puis en LTA₄ allylique époxyde [14]. L'hydrolyse enzymatique du LTA₄ par la LTA₄ hydrolase conduit à un acide di-hydroxylé le LTB₄ alors que sa conjugaison avec le glutathion conduit au LTC₄ (Figure 3).

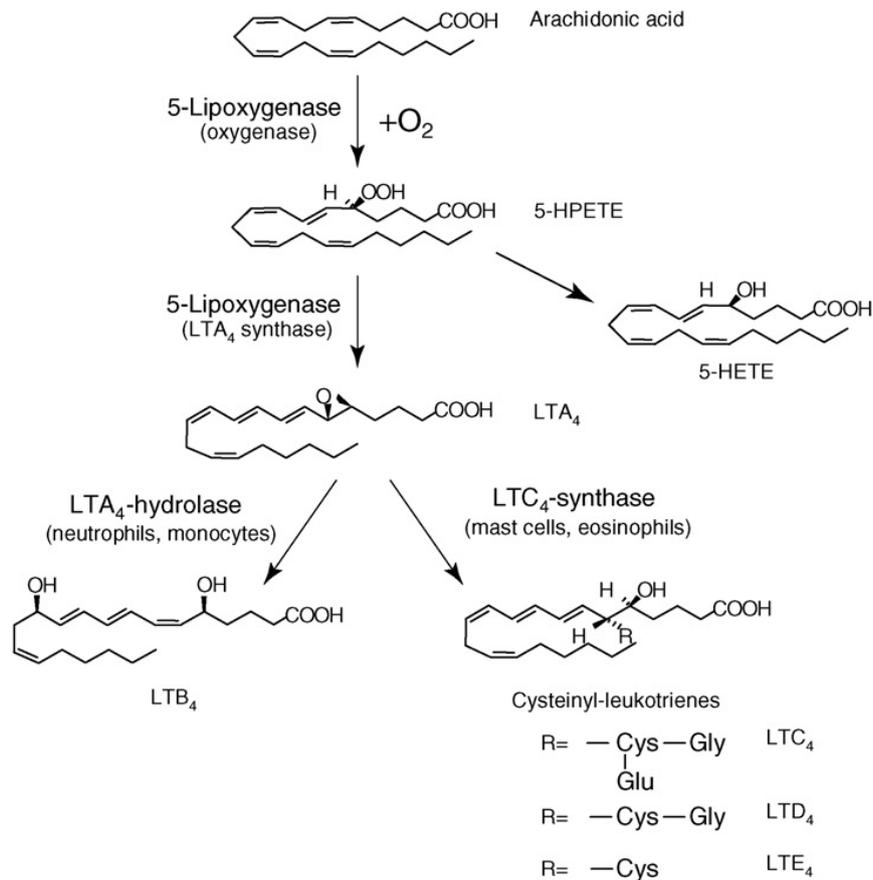


Figure 3 : Conversion de l'acide arachidonique en leucotriènes (LT)

2-3) La structure général de la 5-LOX :

Les études de la séquence des acides aminés des protéines ont pour but de mieux comprendre la corrélation entre leurs caractéristiques structurales et leurs activités biologiques.

La 5-LOX mature est constituée de 673 acides aminés et son poids moléculaire est de 77839 da. La séquence des 17 premiers acides aminés est identique à celle déterminée par dégradation d'Edman de la 5-LOX de la cellule leucémie de basophile du rat [13].

2-4) Les structures secondaires de 5-LOX :

La 5-LOX portant le code **3V99** dans la base PDB contient plusieurs structures secondaires (**hélice α** et **feuilles β**) dans les deux chaînes (A et B) de l'enzyme. Ces structures sont résumées dans le **tableau 2** suivant :

Tableau 2: Structures secondaires des chaînes A et B de la 5-LOX

Hélice α		Feuille β	
Chaîne A	Chaîne B	Chaîne A	Chaîne B
LEU118 au ASP122	LEU118 au ASP122	VAL050 au VAL055	VAL050 au VAL055
ILE124 au TYR142	ILE124 au TYR142	TYR006 au THR012	TYR006 au THR012
CYS159 au LEU163	CYS159 au LEU163	TRP080 au LYS088	TRP080 au LYS088
PRO164 au GLN168	PRO164 au GLN168	TYR094 au ILE103	TYR094 au ILE103
ASP176 au LEU188	ASP176 au LEU188	HIS038 au LEU039	GLY033 au CYS034
ILE190 au MET194	ILE190 au MET194	TYR023 au GLY030	TYR023 au GLY030
ASP203 au VAL212	ASP203 au VAL212	ILE064 au ARG072	HIS038 au ASP041
ASN216 au TRP226	ASN216 au TRP226	VAL109 au ARG112	GLY033 au CYS034
GLU228 au GLY239	GLU228 au GLY239	TRP144 au MET145	TYR023 au GLY030
THR258 au GLU263	THR258 au GLU263	SER154 au ILE155	ILE064 au ARG072
SER271 au GLN278	SER271 au GLY279	ARG246 au ARG247	VAL109 au ARG112
GLU287 au ASP290	GLU287 au ASP290	ILE281 au ASP285	TRP144 au MET145
ALA343 au ILE365	ALA343 au ILE365	ILE309 au LYS314	SER154 au ILE155
THR371 au LEU386	THR371 au LEU386	ILE320 au GLN326	ARG246 au ARG247
HIS390 au VAL397	HIS390 au VAL397	ILE337 au PHE338	ILE281 au ASP285
ALA398 au VAL400	ALA398 au VAL400		ILE309 au LYS314
PHE402 au LEU414	PHE402 au LEU414		ILE320 au GLN326
GLY419 au LYS423	GLY419 au LYS423		ILE337 au PHE338
GLY430 au LYS441	GLY430 au LYS441		
TYR445 au LEU448	TYR445 au LEU448		
CYS449 au ARG457	CYS449 au ARG457		
TYR468 au TYR493	TYR468 au TYR493		
GLY495 au GLU501	GLY495 au ASP502		
ASP502 au TYR515	ASP502 au TYR515		
ARG520 au GLY524	ARG520 au GLY524		
SER531 au SER547	SER531 au SER547		
SER547 au PHE555	SER547 au PHE555		
GLY556 au SER562	GLY556 au SER562		
TRP563 au ALA567	TRP563 au ALA567		
THR583 au LEU591	THR583 au LEU591		
ASP593 au SER608	ASP593 au SER608		
GLU627 au GLU653	GLU627 au GLU653		
ASP663 au ILE667	ASP663 au ILE667		

- Les séquences indiquées en rouge sont les séquences non identiques entre les deux chaînes.
- La séquence en vert est répétée deux fois dans la chaîne B.
- La séquence en bleu est répétée deux fois dans la chaîne B et n'existe pas dans la chaîne A.

2-5) Les domaines structuraux de la 5-LOX :

La structure des protéines LOXs est formée d'un domaine β -barrel N-terminale et d'un domaine catalytique C-terminal [9]. Chez les mammifères, le domaine β -barrel est composé d'environ 110-120 acides aminés, avec une hélice aléatoire d'environ 10 acides aminés entre le domaine β -barrel et le domaine catalytique [11]. L'acide aminé Asp121 constitue le point

de départ du domaine catalytique de la 5-LOX. Le domaine β -barrel est le site de liaison du calcium et la médiation de l'association avec la membrane. Le domaine carboxy-terminal contient le fer qui est essentiel pour l'activité de la lipoxygénase et donc du domaine catalytique [9]. Ce domaine est constitué de l'ensemble des hélices α (voir figure 4). Des études antérieures ont identifié des résidus dans le domaine catalytique qui sont essentiels pour la liaison du fer, le positionnement du substrat et l'import nucléaire de la 5-LOX. La 15-LOX du lapin présente une similitude globale intéressante caractéristique primaire et secondaire de la 5-LOX humain [17]. De plus, le domaine N-terminal de la 5-LOX est important pour la translocation vers la membrane nucléaire et l'augmente l'hydrophobicité de cette enzyme pour augmenter l'affinité avec la membrane [18].

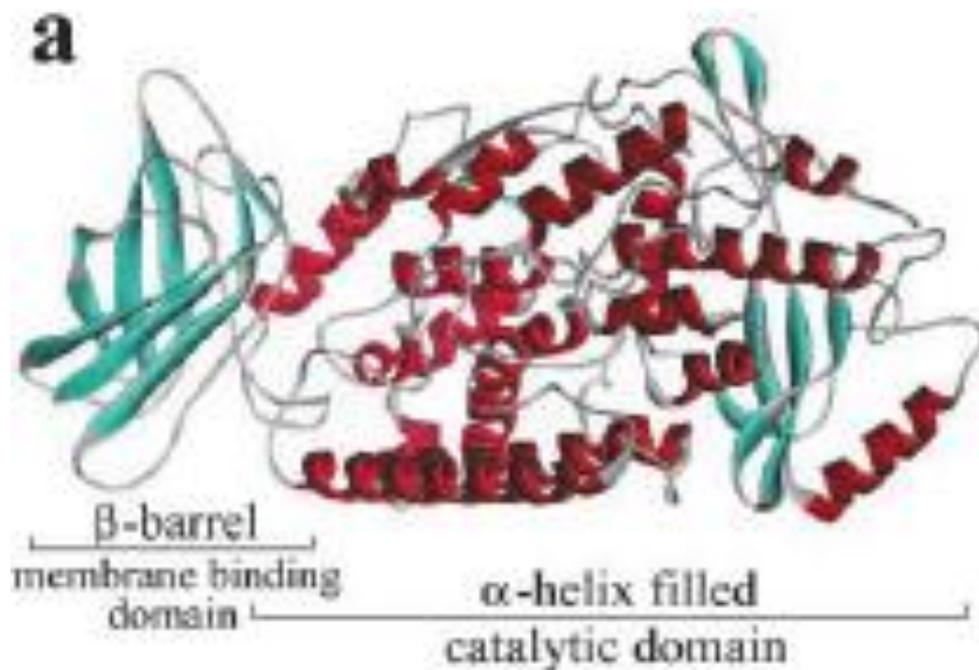


Figure 4 : Les domaines de la 5-LOX

2-6) Les sites présentés par la 5-LOX :

La 5-LOX contient plusieurs sites essentiels pour la liaison avec les différents ligands, les sites sont utilisés soit pour l'activation ou l'inactivation de cette enzyme :

2-6-1) Le site de la phosphorylation du MAPKAP2 :

La phosphorylation du motif de la 5-LOX par la MAPKAP2 kinase a été précédemment identifiée selon la similarité de séquences dans deux autres protéines ; protéine de choc thermique 27 et la protéine1 spécifique de lymphocyte. Les protéines partagent le motif LxRxxS, avec la phosphorylation sur le terminal S. Cependant, ce motif, conservée à travers le 5-LOs, n'a pas été examiné dans d'autres LOs. L'utilisation de Clustalw, a montré que ce motif est commun uniquement pour tous les 5-LOXs, résultant d'une insertion de quatre acides aminés dans la séquence LOX hautement conservée. Cette insertion survient au milieu d'une séquence qui forme une hélice α chez la 15-LOX du lapin. La structure prévue dans 5-LO n'est pas une hélice α , comme dans 15-LO. Au lieu de cela, le clé hydrophobe Leu266 projette ce résidu vers l'intérieur et la cible de phosphorylation putative, Ser271, est présentée à l'extérieur. L'Arg268 basique est positionné entre deux résidus acides, Glu263 et Glu275, un positionnement qui pourrait être prévu pour stabiliser cette structure et maintenir la Ser271 dans une orientation vers l'extérieur [17].

2-6-2) Le domaine de liaison SH3 :

En outre, le domaine putatif d'association « SH3 » est identifié et est caractérisé par Fitzpatrick et ses collègues a été examiné pour les caractéristiques structurales. Les caractéristiques structurales primaires essentiels des domaines de liaison SH3 comprend un motif de Pro-X-X-Pro, chaque Pro est précédée par un résidu aliphatique (Ala, Ile, Leu ou Val), et un non-Pro supplémentaires, habituellement Arg, faisant partie du noyau de liaison en contact avec le domaine SH3. Toutes ces caractéristiques ont été trouvés et entourer le noyau Pro-Asn-Ala-Pro du 5-LOX. La séquence primaire a été extrêmement bien conservée dans la 5-LOX. Les caractéristiques de la structure secondaire des domaines de liaison SH3 impliquent la formation d'une main gauche poly-Pro d'hélice de type II. La structure prédite de la 5LOX ne contenait pas cette structure. L'affinité d'un peptide de liaison de SH3 pour son domaine SH3 peut être améliorée par des éléments contextuels. La structure prédite de la 5LOX placé la séquence centrale Pro-Asn-Ala-Pro près des hélices 7a, 17 et 18 [17].

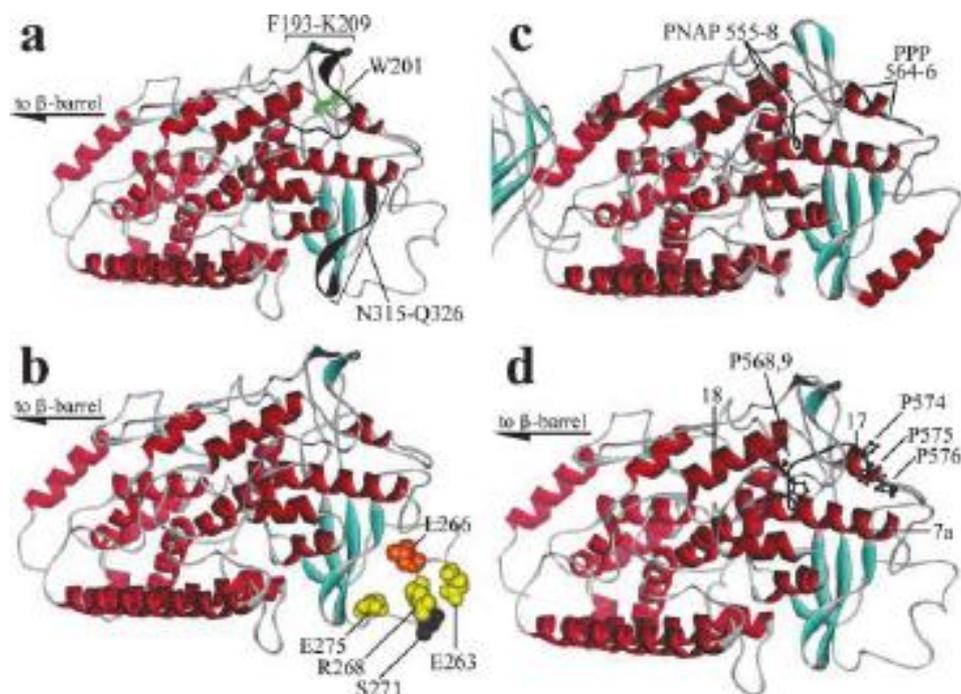


Figure 5 : La localisation des éléments fonctionnels du domaine catalytique

- b) Le site de la phosphorylation MAPKAP 2.
- c) La région, dans la 15-LOX du lapin, ce qui correspond au domaine SH3 de liaison de 5-LOX.
- d) Le domaine SH3 contraignant sur le domaine catalytique de 5-LOX.

2-6-3) Le site actif :

Le site actif de la 5-LOX est une cavité allongée, où les Leucines 368, 373, 414, 607 et l'Ile406 sont conservés dans toutes les lipoxygénases métabolisant l'acide arachidonique. Ces acides aminés grâce à leurs chaînes latérales hydrophobes forment la région où le pentadiène doit être placé pour la catalyse (Figure 7, A et B). Dans les séquences de la 5-LOX on retrouve également les résidus Tyr181, Ala603, Ala606, His600, Thr364, sont spécifiques à des séquences 5-LOX, et les petites chaînes latérales de Ala603 et Ala606 semblent être nécessaires pour la conformation de Tyr181, qui, avec Phe177, "bouchons" de la cavité à la fin. Tyr181 est en contact avec une liaison Van der Waals avec Ala603, et les petites chaînes latérales des deux 603 et 606 permettent la fois des composés aromatiques volumineux (Phe177 et Tyr181) pour pointer dans la cavité où ils peuvent être protégés du solvant (Figure 8C). Un acide aminé spécifique supplémentaire pour la 5-LOX, Trp599, semble étayer le

bouchon FY d'un côté. Les acides aminés Asn407 et His432 aident également à définir le site actif [19].

Le site actif de la 5-LOX contient une ion Fe^{+2} non-hème établissant des liaisons de coordination avec trois histidines polaires His372, His550 et His367, le groupe carbonyle de Asn554, le groupe carboxylique de C-terminal du résidu Ile673, et une molécule d'eau [20].

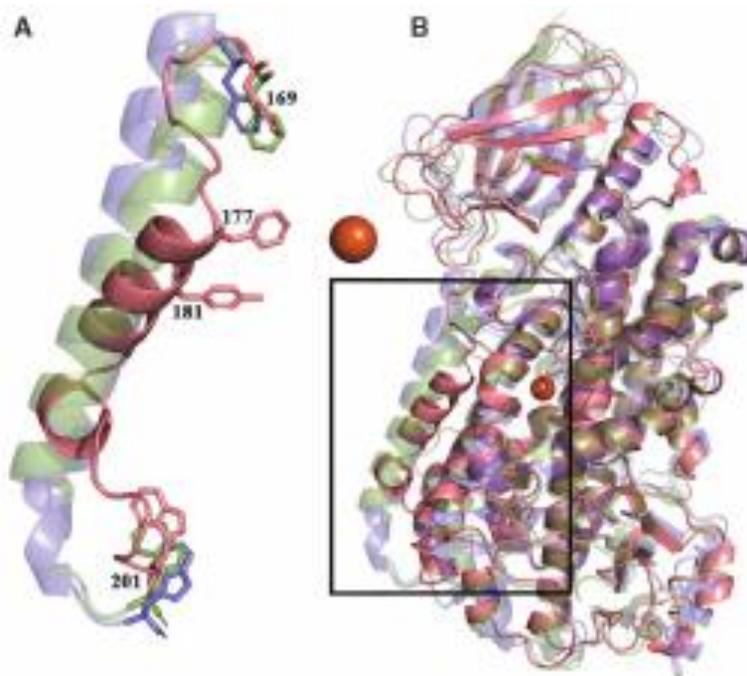


Figure 6 : Le positionnement de l'hélice $\alpha 2$ dans la 5-LOX

Le positionnement de l'hélice $\alpha 2$ est unique en 5-LOX. (A) bande dessinée A5-LOX est rendu en rose. Les acides aminés aromatiques Conservés (Phe169 et Trp201) qui flanquent la région sont en stick rendu. Phe177 et Tyr181, qui constituent le liège qui aide à définir le site actif, sont en bâton. Le fer catalytique est une sphère orange. (B) une recouvrement complète des trois structures dans lesquelles il est évident que, à l'exception de $\alpha 2$, les éléments de structure secondaire dans les enzymes sont conservées.

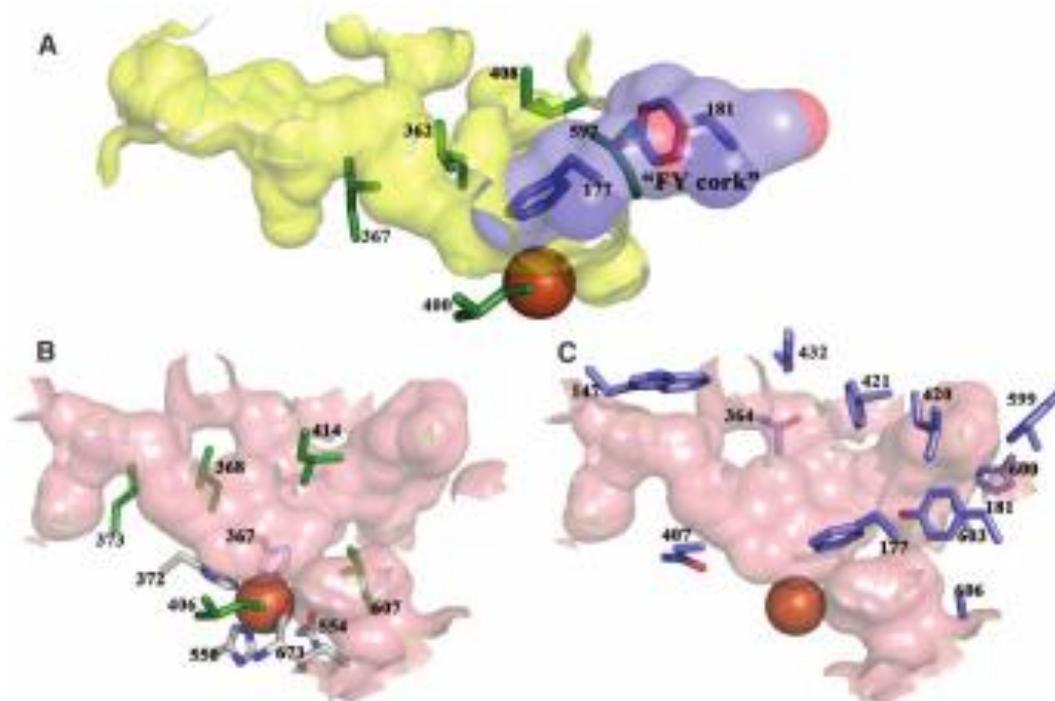


Figure 7 : Le site actif de la 5-LOX et la

Le site actif 5-LOX. Cavités internes calculées avec CastP (32A). Invariant chaînes latérales Leu et Ile sont en vert bâton rendu. (B) L'orientation équivalente de la cavité du site actif de Stable-5-LOX en rose; invariants Leu et Ile de la chaînes latérales en bâtonnets verts. La coordination du fer sphère avec les acides aminés (C, blanc) sont en stick rendu, et le fer une sphère orange. Les acides aminés (C) 5-LOX qui contribuent à la cavité du site actif. L'entrée dans cette cavité nécessite un changement de conformation.

2-7) Les facteurs stimulant l'activité de la 5-LOX :

2-7-1) Le Ca^{2+} :

La Ca^{2+} stimule l'activité des oxygénases et de la 5LOX [13,14]. L' EC_{50} du Ca^{2+} pour l'activation de 5LOX purifiée est assez faible (1-2 μM), l'activation complète est atteinte à 4-10 μM . La 5-LOX se lie au Ca^{2+} de façon réversible. En outre Mg^{2+} , à des concentrations qui existent dans les cellules, peut activer 5LOX in vitro, apparemment via le même site que pour Ca^{2+} [15]. D'autres cations bivalents qui activent la 5-LOX in vitro sont Ba^{2+} , Sr^{2+} et Mn^{2+} , tandis que Zn^{2+} , Cu^{2+} et Co^{2+} sont des inhibiteurs. Le Ca^{2+} conduit à un K_m inférieur de la 5-LOX pour l'acide arachidonique et aussi pour l'inhibition du substrat. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que 5-LOX (comme d'autres lipoxygénases) peut avoir deux sites de liaison aux acides gras, un site catalyseur et un autre régulateur [21,22].

2-7-2. La phosphatidylcholine :

Au cours de la purification initiale de 5-LOX à partir de leucocytes humains, on a observé que l'activité enzymatique dépend de la membrane microsomale [22]. La Phosphatidylcholine (PC) a été utilisée comme additif stabilisant dans la purification de la 5-LOX, et les vésicules de PC synthétique pourraient remplacer la fraction de la membrane cellulaire en tant que facteur de stimulation [23]. Cet effet stimulateur de la PC a été validé par plusieurs groupes. En outre, le traitement avec le Ca^{2+} a provoqué l'association de la 5-LOX avec des liposomes synthétisant le PC, et l'opinion générale est que le Ca^{2+} active la 5-LOX par la promotion de l'association de la membrane. Peut-être, une meilleure association avec la membrane explique pourquoi le Ca^{2+} diminue le K_m apparent de la 5-LOX pour l'acide arachidonique [14,22]. Dans les essais in vitro la plupart de l'acide arachidonique ajouté est incorporé dans des vésicules PC. Le Ca^{2+} induit l'association de la 5-LOX avec les vésicules, ce qui devrait rendre le substrat vésiculaire lié plus accessible aux 5-LOX et favorise la formation du produit [22].

2-7-3) L'ATP :

L'ATP a été d'abord montrée pour la stimulation de la 5-LOX brut [14,22,24]. L'ATP stimule également la 5-LOX lorsque Ca^{2+} a été très faible ou nulle, indiquant que l'effet de l'ATP sur 5-LOX ne dépend pas de Ca^{2+} . 0,1 mM l'ATP a donné une activation maximale. Dans la cellule, la majeure partie de l'ATP se lie avec Mg^{2+} , et il est apparu qu'un complexe MgATP^{2-} pourrait remplacer l'ATP en tant que facteur d'activation de la 5-LOX. Des études avec la 5-LOX immobilisés sur une colonne d'agarose-ATP ont indiqué que l'acide arachidonique et des inhibiteurs de 5-LOX du type indole thiopyranne ont concouru pour le même site de liaison, à proximité du site de l'affinité pour l'ATP [21,22,24].

2-7-3) Les lipides hydroperoxyde :

Pour l'effet catalytique de la lipoxygénase, le fer ferreux de la forme de repos de l'enzyme doit être oxydé en ferrique, par lipide hydroperoxyde. [21,22].

2-8) La phosphorylation de la 5-LOX :

Une première indication que les kinases pourraient influencer l'activité de 5-LOX cellulaire, celle-là a été obtenue de la comparaison des activités de PKC dans les macrophages alvéolaires et péritonéaux, les résultats indiquent que la PKC pourrait augmenter la voie 5-

LOX. Cinq années plus tard, la 5-LOX phosphorylée a été immunoprécipitée à partir d'une fraction subcellulaire contenant les protéines nucléaires associées, obtenu à partir de cellules HL-60 marquées avec ^{32}P -ortho-phosphate, puis stimulées avec l'ionophore A23187. L'activité kinase était importante pour l'activité de la 5-LOX cellulaire et de l'association de la membrane, comme indiqué par l'effet des inhibiteurs pour les tyrosines kinases et une « mitogen-activated protein kinase » (MKK) dans les neutrophiles et les cellules HL-60. La 5-LOX peut se lier au domaine SH3 de la protéine récepteur du facteur de croissance² (Grb2), et il a été suggéré que l'état phosphorylé de la 5-LOX pourrait influencer son partenariat avec d'autres protéines [14,22].

Par la suite, nous avons trouvé que la 5-LOX est un substrat pour mitogen-activated protein kinase activée par la protéine kinase 2 (MAPKAP kinase 2), et très probablement aussi pour la MAPKAP kinase 3, un motif MAPKAP kinase est présent dans la 5-LOX conduisant à la phosphorylation au niveau de Ser-271 [14]. Ces MAPKAP kinases sont phosphorylée et activée par la « p38 mitogen-activated protein kinase » (MAP-kinase p38) qui existe sous plusieurs isoformes, et qui sont généralement activées par le stress cellulaire ou le traitement des cellules avec des cytokines pro-inflammatoires. Pour les cellules inflammatoires, il a été décrit que deux voies distinctes activent la p38 α : (1) via MKK4, régulée par Rac/CDC42, qui ne peut être pas activé par le TNF α ; (2) par MKK3/6, activée par le TNF α . L'identification de la 5-LOX comme substrat pour des kinases MAPKAP a été réalisée en utilisant un dosage en gel kinase, et il a été démontré que les 5-LOX kinases actives (apparemment MAPKAP kinase 2 et 3) étaient présents dans les cellules Mono Mac 6 stimulées et PMNL, mais pas les cellules non stimulées. L'arsénite de sodium comme inducteur de stress cellulaire était stimulus de la MAPKAP le plus efficace en PMLN humaine, et cet agent qui augment (trois à quatre fois) l'activité de la 5-LOX en PMNL également reçu l'acide arachidonique et le facteur d'activation des plaquettes. Plus récemment, d'autres stimuli de stress (stress osmotique, choc thermique) ont été trouvés que des activateurs pour la p38 MAPK et stimuler l'activité de la 5-LOX en PMLN humaine, et le plus intéressant que l'arsénite de sodium et le stress osmotique sont efficaces aussi après la chélation de Ca^{2+} , à la fois dans le milieu (EDTA) et à l'intérieur des cellules (BAPTA/AM). Cela implique que la phosphorylation peut conduire à l'activation de 5-LOX en PMLN, en l'absence d'une augmentation de Ca^{2+} . Pour tous les stimuli de stress, il a été nécessaire d'ajouter de l'acide arachidonique exogène, apparemment activation des voies p38 MAPK dans PMLN ne conduisent pas à l'activation de la phospholipase A2 cytosolique (sPLA2)

cellulaire est toujours en complexe avec la CLP et, lorsqu'ils sont activés par Ca^{2+} , CLP peut participer à l'assemblage de protéine au niveau de la membrane nucléaire. Les séquences d'importation nucléaire (NIS) dans la séquence 5-LOX déterminent l'importation dans le noyau. La Stimuli de la biosynthèse des LT conduisent à une augmentation de Ca^{2+} et/ou la mitogène-activating protéine kinases (MAP). Lors de l'activation de la 5-LOX, le fer est oxydé en hydroperoxyde de lipide, de Fe^{2+} en Fe^{3+} . Dans la 5-LOX, Ser271 est phosphorylée par MAPKAPK-2/3 (MK-2/3) en aval de p38 MAPK. Extracellulaires-signal-regulated kinase (ERK) phosphoryle la 5-LOX sur Ser663. Une augmentation des taux d'AMPc active la protéine kinase A (PKA), qui réprime l'activité de la 5-LOX par la phosphorylation sur Ser523 [15].

2-9) Autres protéines reliées à la 5-LOX :

2-9-1) 5-LOX-activating protein (FLAP) :

Le médicament MK-886 a inhibé 5-LOX dans les leucocytes humains intacts, mais pas dans les cellules rompues. En outre, le MK-886 a bloqué l'association membranaire de la 5-LOX dans les leucocytes humains. L'analogue radio-marqué MK-886 a été utilisé pour marquer une protéine de 18 kDa dans les neutrophiles (FLAP) qui pourrait ensuite être purifié. L'ADNc prédit trois régions transmembranaires et enjambant deux boucles hydrophiles. Lorsque les cellules d'ostéosarcome humain ont été transfectées avec l'ADNc de la 5-LOX et/ou FLAP, les deux protéines sont nécessaires pour la production de leucotriènes induisez par l'ionophore A23187 (pas d'acide arachidonique exogène présent). La co-fonction de la 5-LOX et FLAP a été fondée, mais il a également été constaté que FLAP n'était pas indispensable pour la liaison de la 5-LOX avec la membrane. Dans les cellules d'ostéosarcome transfectées par la 5-LOX mais pas par FLAP, l'ionophore induite l'association de la 5-LOX avec la membrane par rapport à celui qui n'a pas été affecté par la MK-886 .La majeure partie du FLAP est associé à la membrane nucléaire, mais aussi avec la réticulum endoplasmique [22].

2-9-2) Facteur de croissance lié au protéine récepteur 2 (Grb2) « l'actine et α -actinine » :

La 5-LOX contient une motif du Src homologie 3 (SH3-binding), qui permet la 5-LOX de se lier au domaine SH3 du facteur de croissance lié au protéine récepteur 2 (Grb2). Un peptide concurrent contenant le motif SH3-binding de la 5-LOX qui inhibe la liaison à

Grb2, et aussi interfère avec la translocation de la 5-LOX du cytosol vers la membrane dans les neutrophiles humains intacts. Il semble donc possible que les translocations de la 5-LOX peuvent impliquer le motif SH3. L'interaction entre 5-LOX et Grb2 a également été démontré par la méthode de « enzyme-linked immunosorbant ». Dans des conditions physiologiques, l'actine globulaire monomère (G-actine) est en équilibre avec l'actine filamenteuse (F-actine) qui forme le cytosquelette d'actine, cruciale pour la forme des cellules et de la motilité, la phagocytose et la cytokinèse. La 5-LOX associée à l'actine Sepharose in vitro, cette association a été réduite par le peptide compétiteur contenant le motif SH3-binding de la 5-LOX. La 5-LOX également lié à α -actinin-Sepharose (α -actinin Est une protéine actine filament de réticulation) et faiblement à myosine-Sepharose. L'association entre la 5-LOX et de l'actine in vitro, et la mobilité de 5-LOX dans les cellules indiquent une association de la 5-LOX avec des structures cytosquelettiques. En outre, les acides monohydroxy dont 5-HETE (produit de la 5-LOX), peuvent se lier à l'actine cytosolique [22].

2-9-3) Coactosin-like protein (CLP) :

Les activités du cytosquelette de l'actine sont organisées par de nombreuses actin-binding protéins. CLP (142 acides aminés, 16 kDa [22]) est similaire à la coactosin trouvé dans *Dictyostelium discoideum* [14], un membre du groupe ADF/Cofilin de actin-binding protéins [22]. La Coactosin neutralisé la coiffage des filaments de l'actine, favorisant ainsi la polymérisation de l'actine. Le gène CLP humain a été trouvé comme une séquence similaire à coactosin, flanquant une délétion sur le chromosome humain 17 caractérisant le syndrome de Smith-Magenis. Dans la levure à deux systèmes-hybrides, le CLP a interagi avec la 5-LOX. La reliure entre 5-LOX et les protéines CLP a été confirmée, l'épitope étiqueté la 5-LOX et la CLP co-immunoprécipitation à partir de les cellules HEK293. L'association a été Ca^{2+} -indépendante, avec stoechiométrie 1: 1 [14,22], et la lysine 131 du CLP était importante pour la liaison avec la 5-LOX. La CLP est exprimé dans les cellules myéloïdes, et dans les cellules des mammifères transfectées la CLP co-localisée avec des fibres de stress d'actine. La CLP lié aux filaments d'actine dans une stoechiométrie de 1: 2 sous-unités d'actine, mais pourrait être réticulé à une seule sous-unité d'actine, et la Lys-75 du CLP était crucial pour la l'association avec l'actine. Pas de complexe trimère F-actine-CLP-5-LOX serait observée. Au lieu de cela, la 5-LOX en compétition avec la F-actine pour l'association avec la CLP. Il a été également constaté que la 5-LOX brouillé la polymérisation de l'actine, ce qui suggère un rôle modulateur pour la 5-LOX dans la dynamique de l'actine. Curieusement, un rapport récent a

affirmé que la translocation d'un autre lipoxygénase (12/15 LOX) à la membrane plasmique améliorée la polymérisation de l'actine [22].

2-9-4) TGF β receptor-I-associated protein-1 (TRAP-1):

La TRAP-1 contient 860 acides aminés, se lie uniquement à la forme activée du TGF β receptor-I (T β R-I). Dans la levure à deux systèmes-hybrides, 5-LOX interagit avec le coté C-terminale de la TRAP-1. Précédemment, nous avons constaté que le traitement des cellules HL-60 ou les cellules Mono Mac 6 avec le TGF β (Conjointement avec la vitamine D3) conduit à une augmentation de l'expression et l'activité de la 5-LOX [25]. Au moins le coté C-terminale de la protéine TRAP-1 semble associer à la fois au TGF β récepteur-I et la 5-LOX. Il peut être supposé que ces associations pourraient constituer la base d'un mécanisme de feed-back, concernant les effets du TNF β sur 5-LOX [22,25].

2-10) La localisation subcellulaire de 5-LOX :

Dans la cellule, la 5-LOX est une enzyme mobile. Les premières études ont démontré que la 5-LOX cytosolique est devenir lié aux membranes cellulaires. [22].

La translocation de la 5-LOX dans la cellule est plus complexe que la simple association à la membrane. À un certain stade de la durée de vie de la cellule au phase inflammatoire, la 5-LOX peut être importé dans le noyau. Différents modèles ont été observés, en particulier pour les leucocytes du sang périphérique par rapport aux macrophages alvéolaires. Dans les (PMLN) du sang, la 5-LOX réside dans le cytosol jusqu'à ce que la cellule soit activée pour produire les LT, ensuite la 5-LOX se lié à la membrane nucléaire. Au cours de cette activation, on ne sait pas exactement si la 5-LOX migre d'abord dans le noyau (par l'intermédiaire d'une machinerie d'importation nucléaire) et se lie à la membrane périnucléaire de l'intérieur, ou si elle peut également se lier à la membrane nucléaire de l'extérieur. Dans les macrophages alvéolaires, une grande partie de la 5-LOX était soluble dans le noyau déjà lorsque les cellules ont été isolées, en quelque sorte un emplacement associé à euchromatin. Lors de l'activation pour produire les LT, la réserve intranucléaire de la 5-LOX (mais moins de la réserve cytosolique de la 5-LOX) est lié à la membrane nucléaire (Figure 8) [22].

Une étude intéressante concernant glycogène-induite des neutrophiles péritonéaux du lapin a montré que l'import nucléaire de la 5-LOX peut être dispartate de la biosynthèse des LT. La procédure de déclenchement conduit à l'importation de la 5-LOX, du cytosol vers le

compartiment soluble nucléaire. La stimulation ultérieure avec l'ionophore A23187 a donné l'association de la 5-LOX à l'enveloppe nucléaire et alors la biosynthèse des LT. L'import nucléaire de la 5-LOX a été également observé après l'adhérence des PMNs humains à une surface de verre. Il a été souligné que les macrophages alvéolaires et les PMNs inductés ont suscitées à augmenter les capacités de la biosynthèse des LT, mais aussi des seuils relativement élevés d'activation (pour A23187). Eventuellement, ceci est lié à la localisation intranucléaire de la 5-LOX, et il se peut donc que les macrophages alvéolaires ont effectivement été induits in vivo, avant l'isolement du tissu. Quand les macrophages alvéolaires ont été isolés et maintenus en culture pendant 3 jours, la localisation de la 5-LOX est revenue du noyau vers le cytosol. Une étude récente indique que l'adhérence des PMNL ne sera pas toujours augmentée la capacité de la biosynthèse des LT. Les Sulphatides (ligands de sélectine présents sur de nombreuses surfaces cellulaires) ont déclenché PMNL étalé sur les surfaces de la collagène-coated, cet abaissement subséquent de la translocation de la 5-LOX à l'enveloppe nucléaire et l'activité de la 5-LOX est induisée par l'ionophore A23187 [22].

3- La prostate :

La prostate est une glande de l'appareil génital masculin, qui joue un rôle dans la production du sperme. Elle est située sous la vessie en avant du rectum et entoure le début de l'urètre, canal qui permet d'éliminer l'urine de la vessie. La prostate a la forme d'une châtaigne d'environ 3 centimètres de hauteur et 4 centimètres de large, et est entourée d'une capsule. La prostate est composée d'une zone centrale autour de l'urètre et d'une zone périphérique, proche du rectum. Tout autour de l'urètre, un ensemble de fibres musculaires regroupées sous la prostate forment le sphincter urinaire qui contrôle le passage de l'urine en se contractant ou se relâchant, permettant ainsi la continence. La prostate produit une partie du liquide séminal. La majeure partie du liquide séminal est produite par les vésicules séminales. Ce liquide se mélange aux spermatozoïdes, qui viennent des testicules par les canaux déférents, dans une partie de l'urètre (urètre prostatique) au moment de l'éjaculation [26].

3-1) Le cancer de la prostate :

Le mot «cancer» est un terme générique qui désigne l'ensemble des tumeurs malignes. Une tumeur est une excroissance pathologique due à une prolifération de cellules. On

distingue les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes. Les premières se développent sur place, alors que les secondes envahissent les tissus voisins; elles peuvent aussi se disséminer à distance par le biais de la circulation lymphatique ou sanguine et former des foyers cancéreux secondaires dans d'autres organes: les métastases [27].

Le cancer de la prostate est le cancer le plus souvent diagnostiqué chez les hommes âgés, tuant des milliers chaque année. Le cancer de la prostate métastatique répond initialement à la thérapie de sevrage aux androgènes, mais la résistance à l'hormone se développe toujours. Les agents chimio-thérapeutiques actuellement disponibles ont peu ou pas d'impact sur la survie des patients atteints de cancer de la prostate réfractaire aux hormones. Pour cette raison, le cancer de la prostate métastatique a presque toujours une issue fatale. Bien que l'incidence de la forme latente localisée du cancer de la prostate est le même dans le monde indépendamment de l'origine ethnique, il existe une variation significative dans la survenue de la maladie métastatique entre les pays occidentaux et les pays de l'Est, suggère l'implication des facteurs environnementaux dans la progression métastatique. Le mécanisme moléculaire sous-jacent associé à la phase de la progression de la maladie est une zone active de la recherche actuelle [28].

3-2) L'implication de la 5-LOX dans le cancer de la prostate :

La relation fonctionnelle entre le métabolisme des acides gras poly-insaturé, et la carcinogénèse a été largement étudié dans de nombreuses études moléculaires. Trois types d'enzymes; les cyclooxygénases (COX), les epoxygénases (cytochrome P450) et les lipoxygénases (LOX) peuvent métaboliser l'acide arachidonique en eicosanoïdes biologiquement actifs. Plusieurs études impliquent la participation des lipoxygénases dans la différenciation et la progression tumorale. Parmi les lipoxygénase la 5-LOX est généralement considérée comme un procarcinogénique [28]. Les divers peroxydes lipidiques et les lipides bioactifs générés par ce métabolisme peut réguler la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation et la sénescence [29]. Afin de mieux identifier les produits 5-lipoxygénase spécifiques capables de soutenir la prolifération de cellules cancéreuses de la prostate, les examens de la recherche lequel entre de ces eicosanoïdes étaient capables de stimuler la croissance des cellules PC3 (type de cellule constituant la prostate) dans des conditions sériques réduites [30,31]. Les résultats sont représentés dans le **tableau 3** et montrent que le 5-HPETE et le 5-HETE et de ses métabolites, mais pas les leucotriènes, sont capables de soutenir la prolifération des cellules PC3 suggérant que les métabolites actifs de

la 5-LOX dans ces cellules sont eicosatétraénoïque [30]. La suppression de l'activité de la LOX-5 réduit l'activité de la prolifération cellulaire et induit également la voie intrinsèque de l'apoptose mitochondriale, soit de manière p53-dépendante ou indépendante [31].

Plusieurs éléments de preuve ont démontré le rôle crucial des lipoxygénases dans le cancer. Dans les cellules cancéreuses de la prostate humaine, la surexpression de la 5-LOX a été observée, ce qui est un élément déclencheur pour l'angiogenèse et la croissance tumorale. L'expression accrue de la 5-LOX et les récepteurs de LTB4 ont été observés dans le cancer de la prostate [32]. En outre, les niveaux d'expression de la 5-LOX ont été proposés comme indicateur de lésions néoplasiques précoces. Le LTB4 est un stimulateur potentiel de croissance des cellules cancéreuses et joue également un rôle dans la formation de ROS (radicaux super oxyde) en réponse à l'hypoxie. Il a également été montré que le métabolite LTB4 de la 5-LOX est capable d'activer le facteur de la transcription « NF-kB » (**figure 10**) dans les cellules cancéreuses, ce qui suggère un rôle favorisant la tumeur par cette voie. Pour l'activité de la 5-LOX et de la 15-LOX est liée à l'activité de NF-kB, alors qu'une telle connexion n'a pas été décrite pour les autres lipoxygénases. Compte tenu de ces observations, tous ces éléments de preuve ensemble, les lipoxygénases peuvent être considérées comme un groupe émergent de cibles thérapeutique contre le cancer de la prostate [33].

Le mécanisme par lequel les métabolites de la 5-LOX contrôlent la survie des cellules cancéreuses de la prostate est un problème intéressant. Récemment, un certain nombre de rapports ont suggérés que le MPT, la libération de cytochrome C et le facteur initiant l'apoptose sont les événements moléculaires critiques pour l'initiation de la cascade apoptotique. La Cytochrome C et le facteur initiant l'apoptose ont coopéraient pour activer une cascade de caspases impliquées dans la phase d'exécution finale de l'apoptose. Dans les cellules cancéreuses de la prostate, on a observé que le MPT est un événement précoce (survenant à moins de 1h) dans l'apoptose induite par MK886 (inhibiteur de la protéine « Flap »), indiquant que le MPT est un événement essentiel dans le cancer de la prostate, la mort cellulaire induite par l'inhibition de la 5-LOX [28].

Tableau 3 : L'activité mitogène des produits du métabolisme de l'acide arachidonique par la 5-LOX

Les métabolites	la stimulation de la croissance maximale (%)	La concentration
Acide Arachidonic acid	140	10 μ M
5-HpETE	50	5 μ M
5-HETE	50	10 μ M
5-HETE lactone	90	10 μ M
5-oxoETE	110	10 μ M
LTB4	0	10 μ M
LTC4	0	10 μ M
LTD4	0	10 μ M

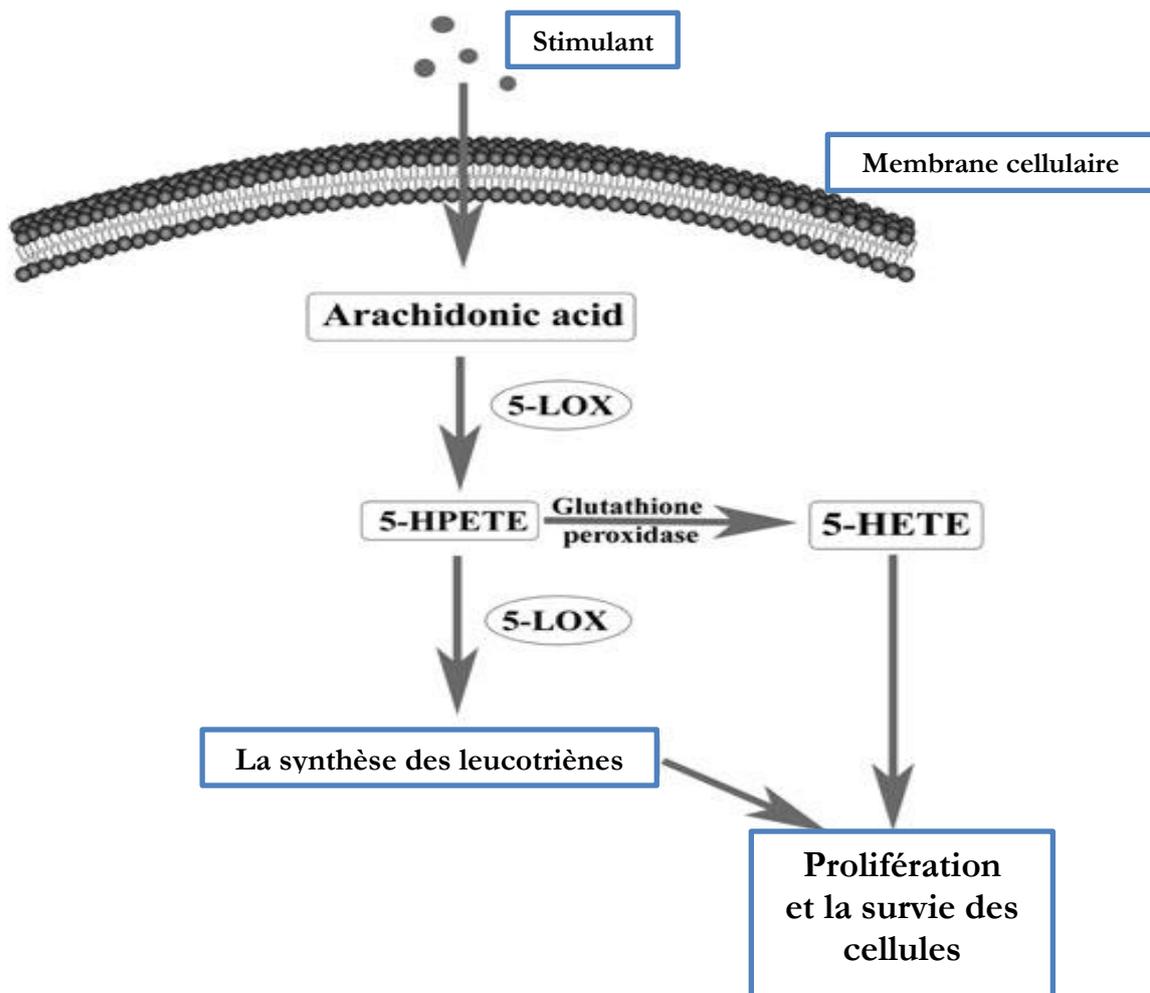


Figure 9 : Les effets intracellulaire des métabolites de la 5-LOX

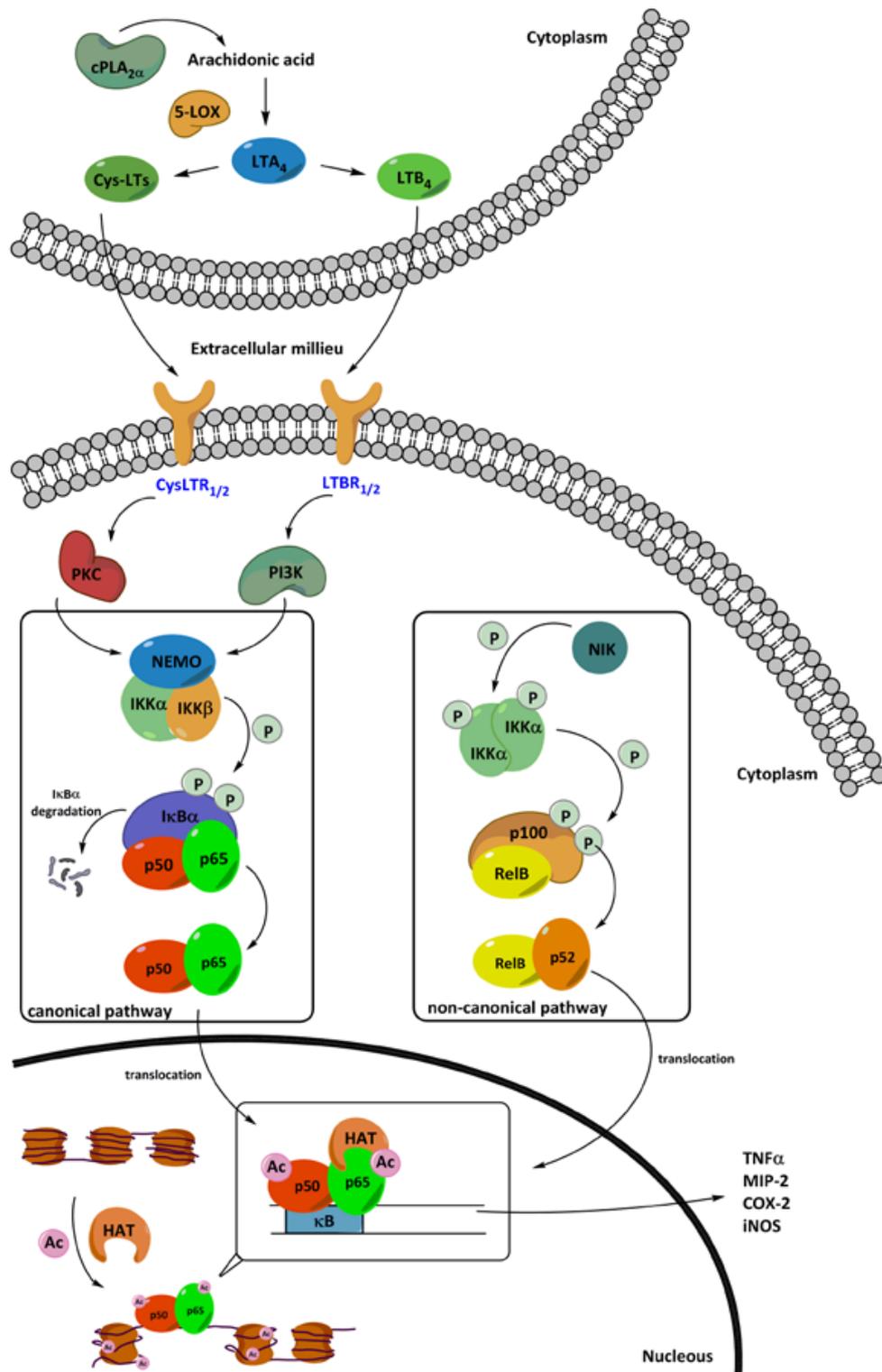


Figure 10 : La connexion entre l'activité de la 5-LOX et l'activité de NF-κB dans le cancer de la prostate

3-3) Les traitements du cancer de la prostate :

Les traitements utilisés dans le cancer de la prostate sont nombreux. Les différentes interventions chirurgicales en cas de prostatectomie, la chimiothérapie, la radiothérapie, La curiethérapie, L'hormonothérapie [26,27,34], Les α -bloqueurs (tamsulosine, alfuzosine, et silodosine), les inhibiteurs de le 5- α -réductase ayant effet de réduire le volume de la prostate [34]. Les inhibiteurs des cyclooxygénases (COX-2) et de la 5-LOX représentent la meilleure chimiothérapie jouent un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses et sans effets sur les cellules saines. C'est dans ce même contexte que nous allons orienter notre travail dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de la 5-LOX par la méthode de modélisation par docking moléculaire [32].

CHAPITRE III

LES INHIBITEURS DE LA 5-LOX

1) Les classes des inhibiteurs de la 5-LOX :

L'inhibition de la 5-LOX est la méthode la plus complète de la suppression des composants LT et lipoxine de la cellule ou les systèmes animal. Contrairement à diverses stratégies antagonistes, l'inhibition complète de la conversion du substrat par la 5-LOX bloque l'action de l'ensemble des médiateurs puissants obtenus à partir le LTA4. Un certain nombre de classes d'inhibiteurs ont été inventés qui inhibent l'enzyme. Ceux-ci peuvent être largement tenir représenter par trois catégories [35].

1-1 Les inhibiteurs non spécifiques :

Les inhibiteurs de cette classe inhibe la 5-LOX par une interaction sur d'autre domaine que le site actif, exemple le domaine C2-LIKE pour bloquer la stimulation par l'ionophore A23187 (voir chapitre 1), et les meilleurs représentants de cette classe sont l'Hyperforine (Figure 11) [36]. Alors ce sont des inhibiteurs Ca-indépendant.

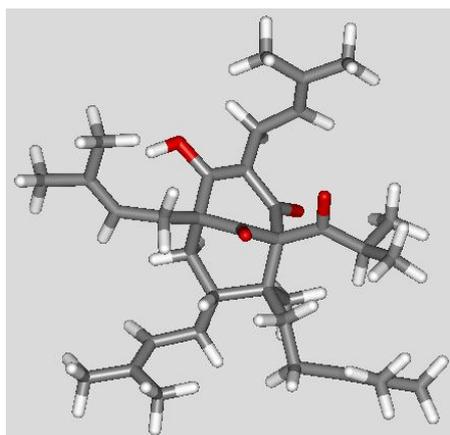


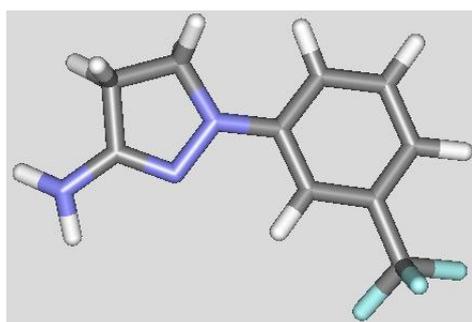
Figure 11 : l'Hyperforine

2-1-1) Les inhibiteurs spécifiques (Compétitifs):

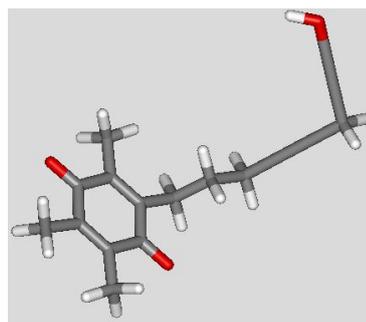
Les inhibiteurs pharmacologiques de la 5-LOX peuvent être classés en trois groupes: (1) les composés redox-actifs qui réduisent le Fer du site actif , (2) les chélateurs de Fer, et (3) les inhibiteurs du type non-redox qui interfèrent probablement avec les sites putatifs liant les acides gras [36]. Les derniers agissent directement sur le site actif de la 5-LOX, après la stimulation par l'ionophore A23187 qui augmente l'hydrophobicité du site actif pour mieux réceptionner le substrat (AA), ou ces inhibiteurs qui montrent une certaine lipophilie.

II-2-1. L'inhibition redox :

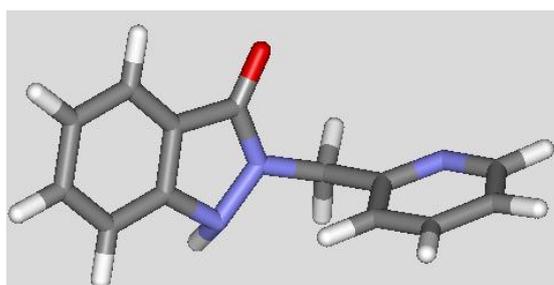
Ces inhibiteurs interagissent avec la fonction pseudo-péroxydase dans la 5-LOX et réduisent le Fer du site actif de l'enzyme sous la forme ferreux (Fe^{2+}) et maintiennent l'enzyme à son état inactif [31], bloquant ainsi la formation de produits par l'intermédiaire des mécanismes anti-oxydant. Des exemples de ce type d'inhibiteur comprennent, BW 755C (1), Docebenone (AA-861) (2), ICI-207968 (3), et A-53162 (4). Deux BW755c et A-53612 inhibent la formation de LT *in vitro* et *in vivo*, mais ont une toxicité inacceptable liée à leur faible potentiel d'oxydation. Jusqu'à présent, les composés de cette classe ont été jugés inacceptable pour le développement clinique [35]. On retrouve également dans cette classe le 11-kéto acide boswelique (5) [31]. Le Phenidone (6), et le Lonapalene (RS-43179) (7). Cette classe de médicaments n'a pas été développée, à l'exception de certains composés, tels que le Lonapalène et le Donebynone, car ils présentent une efficacité clinique contre le psoriasis et l'arthrite (Figure 12) [11].



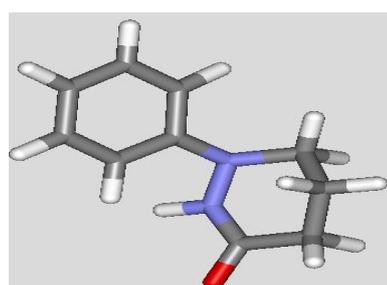
(1)



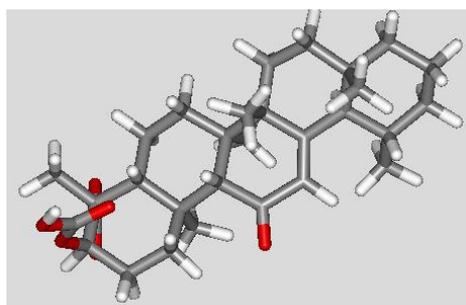
(2)



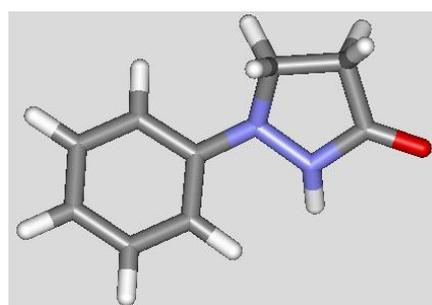
(3)



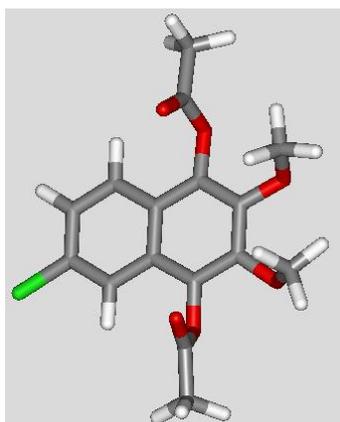
(4)



(5)



(6)



(7)

Figure 12 : les inhibiteurs redox de la 5-LOX

II-2-2. L'inhibition par l'interaction avec le Fer de la 5-LOX :

On les appelle aussi les chélateurs du Fer non-hémique. Des exemples de cette classe sont zileuton, ABT-761 [11,35] et BW-A4C. Ces composés sont des inhibiteurs compétitifs puissants de la formation des leucotriènes chez les animaux et chez les humains. À la fois le zileuton et l'ABT-761 se sont révélés être efficaces dans l'asthme [11,33].

1) Zileuton :

Ou Z, N-(1-benzo(b)thien-2-ylethyl)-N-hydroxyurea le premier inhibiteur approuvé de la 5-LOX avec un $IC_{50}=0.74 \mu M$ [35]. Le composé présente une toxicité hépatique (peut-être due à une alkylation et une inhibition irréversible de la glutathion S-transférase M1 [GSTM1]) et a un profil pharmacocinétique favorable avec une courte demi-vie [9]. Zileuton pourrait effectivement inhiber la progression du cancer de la prostate (Figure 13-(1)) [37].

2) BW-A4C :

BW A4C est un inhibiteur de la 5-LOX sélectif et peut induire l'apoptose dans le lymphome. BW AC4 est l'inhibiteur le plus efficace, ce qui diminue significativement la vitesse de croissance et le volume tumoral après 8-13 jours de traitement (Figure 13-(2)) [37].

3) Dérivé de l'indométhacine :

Ce groupe acide carboxylique de l'indométhacine, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) classique a été remplacé par la N-hydroxyurée, capable de chélater le fer non hémique

de la 5-LOX. Cela a conduit à un dérivés, qui inhibe non seulement 5-LOX, mais aussi de manière préférentielle l'isoforme inductible de la COX-2 (**Figure 13-(3)**) [11].

4) Tepoxaline et ses dérivées :

Le tépoxaline (**Figure 13-(4)**) est un inhibiteur sélectif de la 5-LOX, qui affiche le motif tricyclique d'un inhibiteur sélectif de la COX-2, est un acide hydroxamique contenant le noyau pyrazole, capable de chélater l'atome de fer non hémique de 5-LOX. Il a subi une évaluation clinique pour le psoriasis et la polyarthrite rhumatoïde. Afin d'accroître la stabilité métabolique de la fonction hydroxamate, les caractéristiques structurales de l'Atreleuton, l'inhibiteur actif *in vivo* de la 5-LOX, ont été incorporés à tépoxaline, conduisant à deux séries hybrides chimiques (**5 et 6**) des inhibiteurs doubles puissants. Malheureusement, aucune amélioration de la durée de l'activité inhibitrice 5-LOX [11].

5) BW B70C :

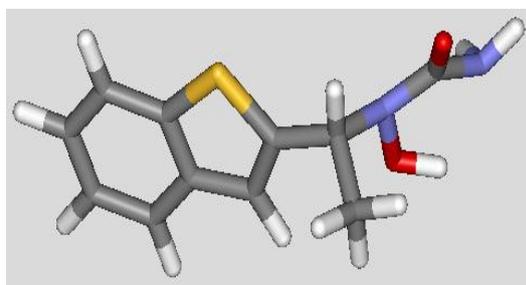
BW B70C $IC_{50}=5 \mu M$ (**Figure 13-(7)**), curcumine (**8**) et le lycopodine (**9**) peuvent modifier le métabolisme LOX en inhibant 5-LOX, 12-LOX, et 15-LOX; sinon ils peuvent également inhiber le récepteur de FLAP et d'autres protéines de voies liées. Ces effets, d'autre part, induisent l'apoptose de différents types de cancer *in vitro* et *in vivo* [37].

6) NDGA :

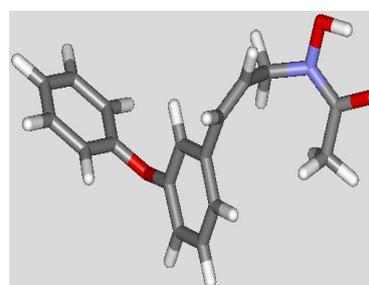
NDGA (acide nordihydroguaiarétique, $IC_{50}=1.5 \mu M$) (**Figure 13-(10)**) [38].

7) 1-(benzyloxy)-2-heptyn-4-ol et 1-[(4methylbenzyl)-oxy]-2-heptyn-4-ol :

1-(benzyloxy)-2-heptyn-4-ol (**Figure 15-(11)**), et 1-[(4methylbenzyl)-oxy]-2-heptyn-4-ol (**Figure 13-(12)**).

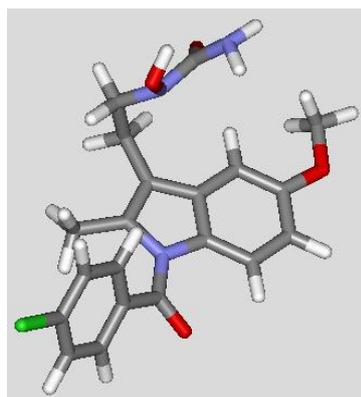


(1)

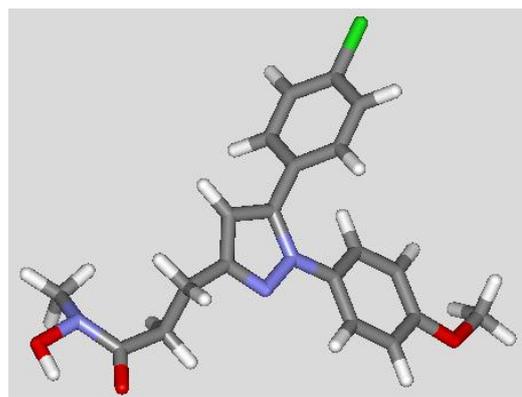


(2)

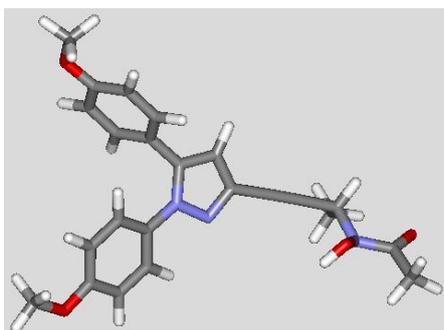
Figure 13 : Les chélateurs du Fer non hémique



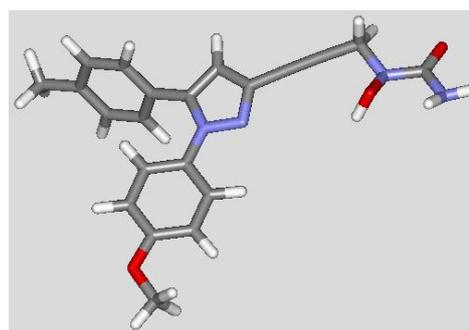
(3)



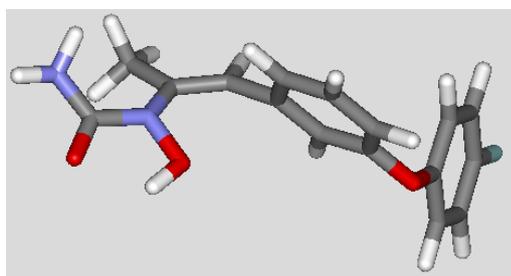
(4)



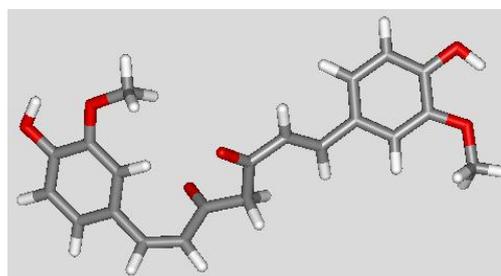
(5)



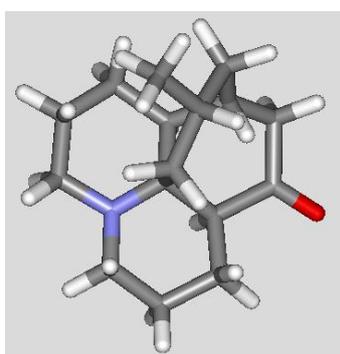
(6)



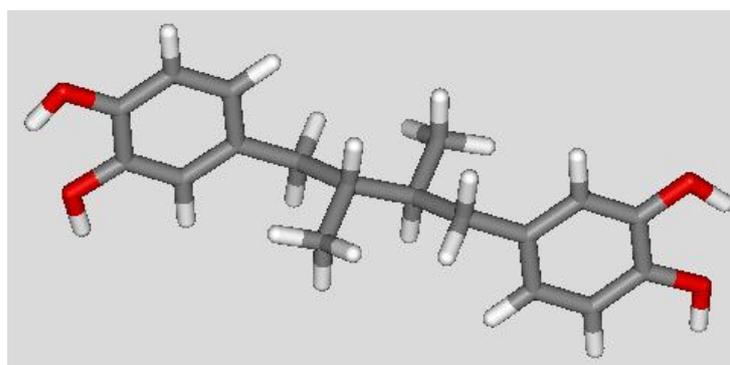
(7)



(8)



(9)



(10)

Figure 13 : Les chélateurs du Fer non hémique (suite1)

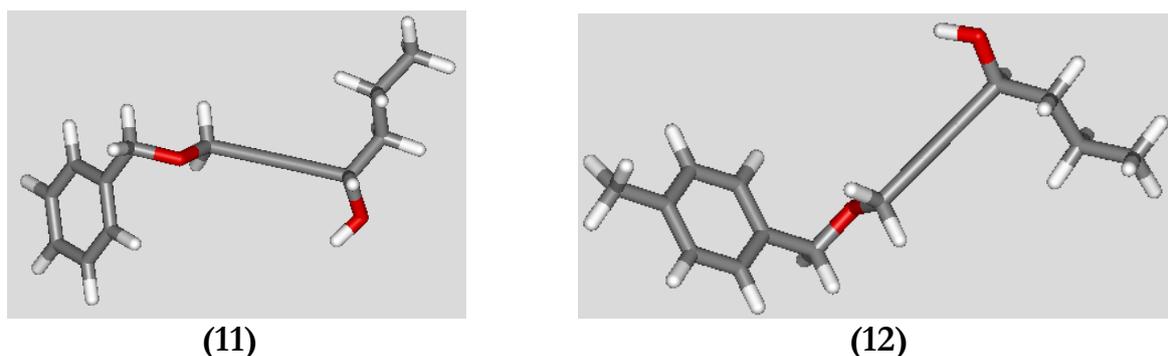


Figure 13 : Les chélateurs du Fer non hémique (suite2)

8) Les dérivés de 1,5 diarylpyrazol :

Pour l'activité inhibitrice 5-LOX de ces composés titrés dans le **tableau 4**, le modèle dérivé a suggéré que le rôle du contenu électronique et de van der Waals des volumes dans l'optimisation de l'activité [39].

Tableau 4 : Les dérivés de 1,5diarylpyrazol

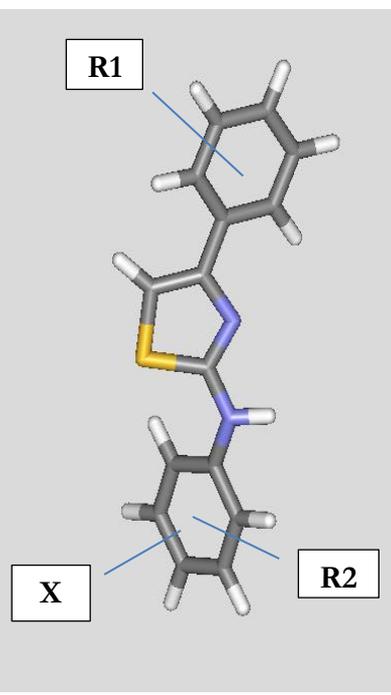
N°	Composé de base	R1	R2	R3	IC ₅₀
01		4-CH ₃ SO ₂	H		pIC ₅₀ = 6.52 M
02		H	H		pIC ₅₀ = 6.24 M
03		4-F	H		pIC ₅₀ = 6.32 M
04		4-Cl	H		pIC ₅₀ = 6.08 M
05		4-CH ₃	H		pIC ₅₀ = 6.14 M
06		4-CH ₃ O	H		pIC ₅₀ = 6.11 M
07		3-CF ₃ O	H		pIC ₅₀ = 6.07 M
08		4-NH ₂ SO ₂	H		pIC ₅₀ = 6.13 M
09		4,5-diCH ₃	H		pIC ₅₀ = 6.12 M
10		4,5-diCl	H		pIC ₅₀ = 6.10 M

9) Les dérivés aminothiozol :

L'évaluation biologique des dérivés de N-aryl-4-aryl-1,3-thiazole-2-amine a été examinée pour l'activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*. Les composés thiazole ont montré une inhibition directe de la 5-LOX qui est une enzyme clé de la synthèse des leucotriènes et est impliquée dans les maladies inflammatoires et les cancers. Afin d'optimiser l'activité biologique, des travaux précédents ont fait la synthèse des dérivés du 1,3-thiazole-2-

amine ont été synthétisés et étudiés sur le plan de la relation structure-activité, en particulier (Tableau 5), le N- (3,5-diméthylphényl) -4- (4-chlorophényl) -1,3-thiazole-2-amine a été montré une activité anti-inflammatoire en tant qu'inhibiteur de la 5-LOX [40].

Tableau 5 : Les dérivés de l'aminothiazol

N°	Molécule de base	R1	R2	X	IC ₅₀
01		H	4-OH	H	0,110 µM
02		4-F	4-OH	H	0,099 µM
03		4-Br	4-OH	H	0,082 µM
04		4-Cl	4-OH	H	0,035 µM
05		4-NO ₂	4-OH	H	0,025 µM
06		2-F	4-OH	H	0,081 µM
07		3-F	4-OH	H	0,065 µM
08		4-Cl	2-OH	H	0,140 µM
09		2,5-diCl	4-OH	H	0,092 µM
10		2,4-diF	4-OH	H	0,085 µM
11		4-Cl	4-OH	3,5-diCl	0,146 µM
12		4-Cl	4-OH	3,5-diCH ₃	0,127 µM
13		4-F	4-OH	3-Cl-5-CH ₃	0,063 µM
14		4-F	4-OH	3,5-diCl	0,093 µM
15		4-F	4-OH	3,5-diCH ₃	0,104 µM
16		4-F	4-OH	2,3,5-triCH ₃	0,224 µM
17		H	4-NH ₂	H	0,120 µM
18		4-F	4-NH ₂	H	0,105 µM
19		4-Br	4-NH ₂	H	0,201 µM
20		4-Cl	4-NH ₂	H	0,160 µM
21		4-NO ₂	4-NH ₂	H	0,092 µM
22		4-Cl	2-NH ₂	H	0,421 µM
23		2,5-diCl	4-NH ₂	H	0,060 µM
24		2,5-diF	4-NH ₂	H	0,070 µM

II-2-3. L'inhibition non-redox :

1. ZD-2138 et L697198 :

Des inhibiteurs compétitifs comprennent ZD-2138 (Figure 14-(1)) et L-697198 (2). Jusqu'à présent, le seul composé de cette classe à être utilisé chez l'homme est ZD-2138 avec IC₅₀=0.09 µM [17,30,33]. La ZM230487 (3) avec IC₅₀ = 7,4 µM [36].

2. Isoimperatorin :

Isoimpérateurin ou la (4-[(3-Méthyl-2-butenyl)oxy]-7H-furo[3,2-g][1]benzopyran-7-one) présente une activité inhibitrice sélective pour la 5-LOX avec un valeur d'IC₅₀=5,7 µM, alors il peut servir comme composé de base pour les nouveaux médicaments anti-inflammatoires (**Figure14-(4)**) [41].

3. ER-34122 :

ER-34122 ou 5-[[1,5-bis (4-méthoxyphényl)pyrazol-3-yl]diméthoxyméthyl]-2-chlorobenzamide, à de nouveaux dérivés pyrazoliques, inhibe l'activité de la LOX avec un IC₅₀ = 0,15 µM (**Figure14-(5)**) [42].

4. PF-4191834 :

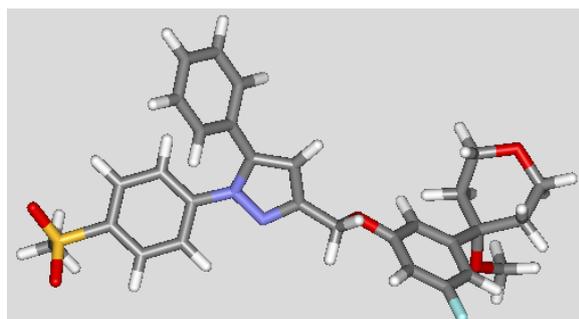
PF-4191834, ou 4-(3-(4-(1-méthyl-1H-pyrazol-5-yl)phénylthio) phényl)-tétrahydro-2H-pyranne-4-carboxamide (**Figure 14-(6)**), est un inhibiteur non-chélateur du fer, non redox de la 5-LOX avec un IC₅₀=0.3 µM. Le composé a complètement inhibé la synthèse des produits de 5-LOX (oxoETE, LTB4 et LTE4). Ces données démontrent que les inhibiteurs non redox PF sont 6-10 fois plus puissants que le zileuton [43].

5. C₂₉H₂₉FN₂O₅S

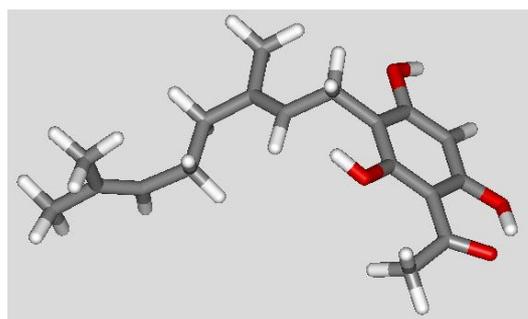
Ou 3-[[3-fluoro-5-(tétrahydro-4-méthoxy-2H-pyran-4-yl)phénoxy]méthyl]-1-[4-méthylsulfonyl]phényl]-5-phényl-1H-pyrazole (**Figure 16-(7)**), est un bon inhibiteur de la croissance des lignées cellulaires du cancer de la prostate [37]. Il inhibe la 5-LOX avec un IC₅₀=3 nM [44].

6. Les analogues de 2,4,6-Trihydroxy-3-Geranylacetophenone (tHGA) :

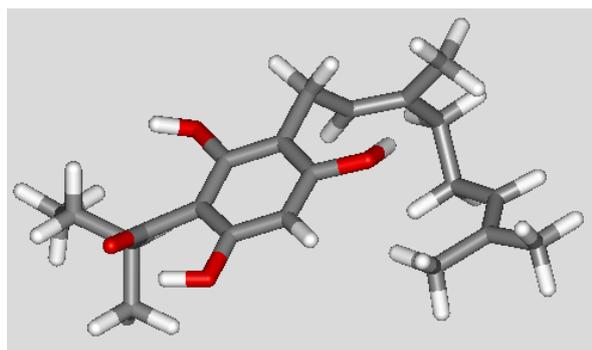
Cette classe de composés est basée sur un cycle aromatique présentant une fonction céto-énol. L'échafaudage est le phloroglucinol substitué par simple à des chaînes latérales d'isoprène complexes et un groupe acyle simple (**Figure 14-(8)**). À savoir deux acylphloroglucinols 3-géranyl-1- (2'-méthylpropanoyl) phloroglucinol (**9**) (IC₅₀ = 2,2 µM) et du 3-géranyl-1- (2'-méthylbutanoyl) phloroglucinol (**10**) (valeur IC₅₀ = 5,8 µM), qui ont été isolées à partir de la plante *Hypericum empetrifolia* présentant une forte activité inhibitrice contre la 5-LOX [12].



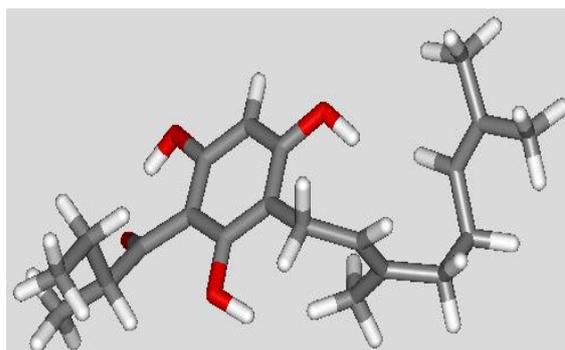
(7)



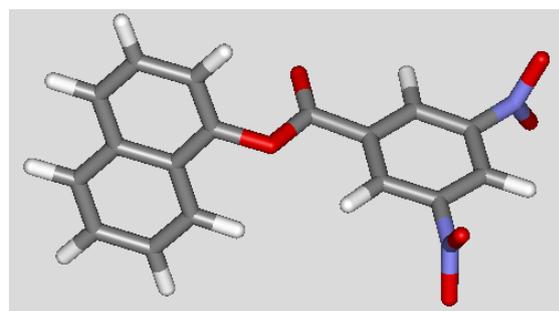
(8)



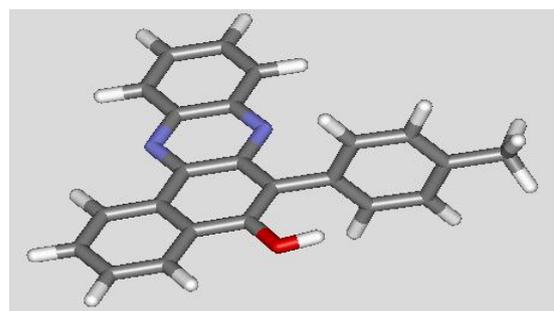
(9)



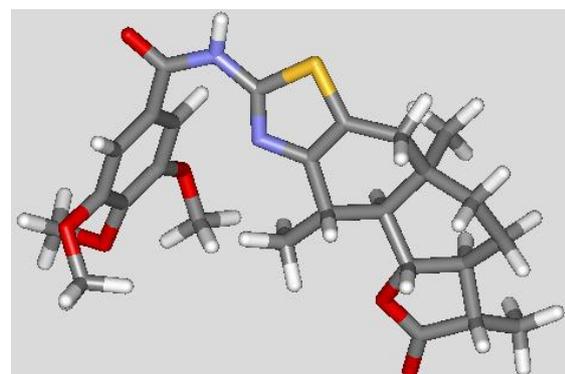
(10)



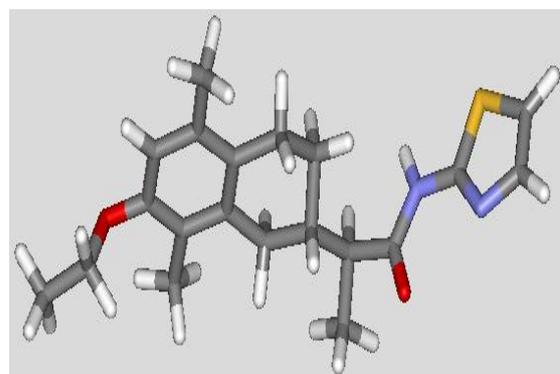
(11)



(12)

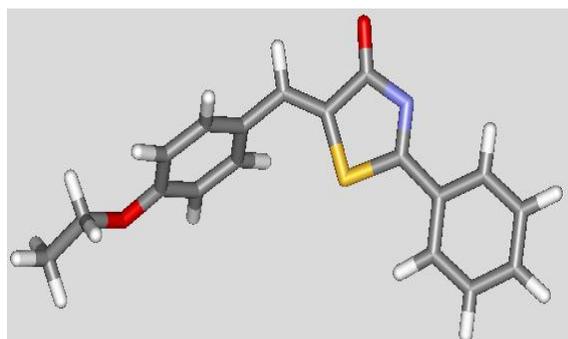


(13)

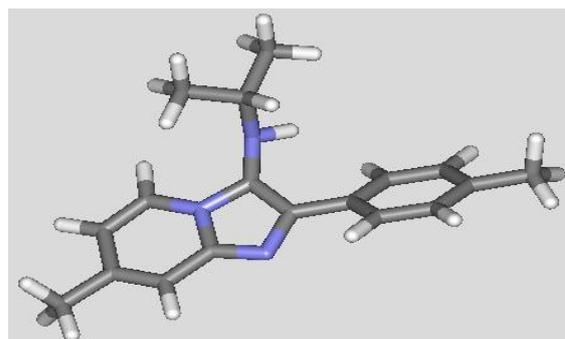


(14)

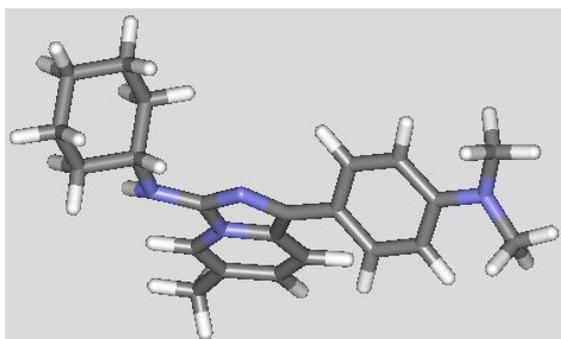
Figure 14 : Les inhibiteurs non-redox de la 5-LOX (suite1)



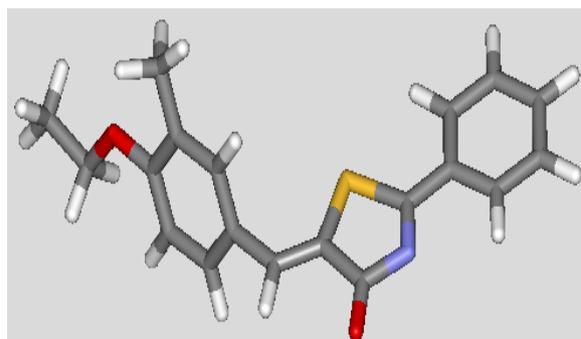
(15)



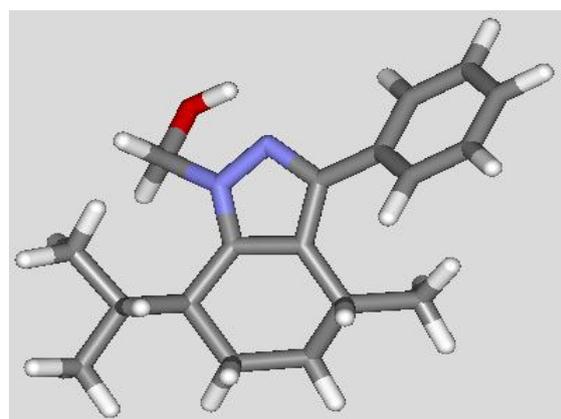
(16)



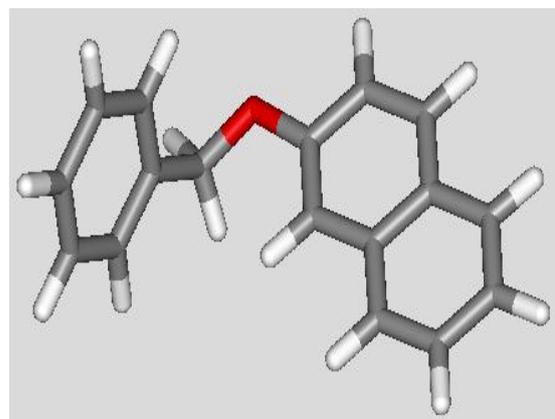
(17)



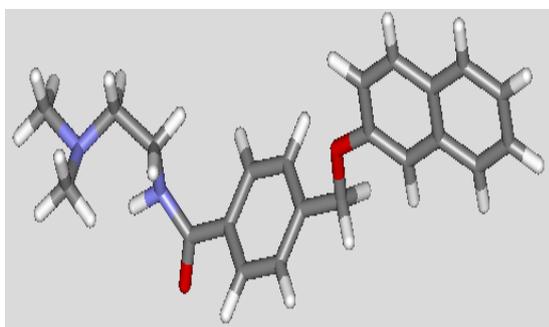
(18)



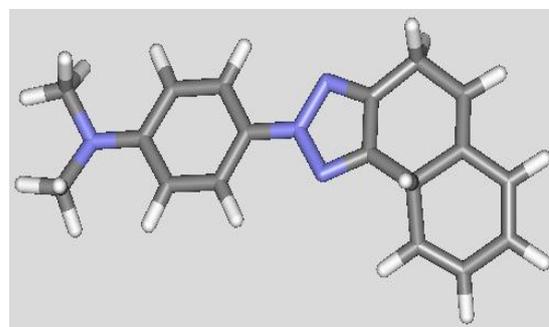
(19)



(20)

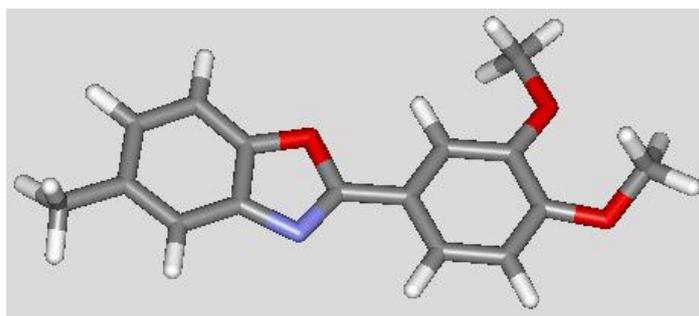


(21)



(22)

Figure 14 : Les inhibiteurs non-redox de la 5-LOX (suite2)



(23)

Figure 14 : Les inhibiteurs non-redox de la 5-LOX (suite3)

NB:

Ces trois classes d'inhibiteurs ont été caractérisées dans un certain nombre de cellule et systèmes animal. En général, les inhibiteurs cellulaires les plus puissants sont la classe non-redox. Cependant, comme inhibiteurs directs de l'enzyme N-hydroxyurée/classe d'hydroxamate est le plus puissant. Les inhibiteurs redox ont tendance à être moins puissant soit dans des essais enzymatiques ou des essais cellulaires. *In vivo*, les composés de la seconde classe, tels que l'ABT-761, sont équivalentes ou supérieures à celles des plus puissants de la troisième classe, ZD-2138 [35]. Compte tenu des toxicités et de multiples difficultés rencontrées dans la conception d'inhibiteurs redox et les chélateurs du Fer, la recherche des inhibiteurs directe du site actif de la 5-LOX a été considérée comme une nouvelle stratégie [11].

CHAPITRE IV
MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Matériel :

1-1) Microordinateur :

Nous avons utilisé dans le présent travail un micro-ordinateur puissant avec une mémoire vive de 4 GO sous Windows version 8.1.

1-2) Les programmes :

Pour les calculs de docking moléculaire, nous avons utilisé la version la plus ancienne du programme **Surflex** version (1.3, 2005). Le deuxième programme utilisé dans cette étude est « Titan ». Il permet la construction moléculaire en 3D (tridimensionnelle) des ligands issus de la littérature avec minimisation de leur énergie intramoléculaire. Nous avons également utilisé le programme **VMD** (Dynamique moléculaire visuelle) **version 1.9.1** pour la visualisation et afin de sauvegarder les fichiers de ligands et de l'enzyme et la des acides aminés de la cavité du site actif en format **.pdb**, **.mol2** pour les deux derniers respectivement, requis pour le succès des calculs de docking moléculaire avec Surflex.

L'interface graphique **ViewerLite 4.2** a été utilisée afin de visualiser les interactions 5-LOX-Ligands simulées par Surflex. **OpenBabel (2.0.2)** est un autre logiciel utilisé dans cette étude. C'est un programme libre visant à faciliter l'inter conversion des données chimiques d'un format à un autre de fichiers de divers types (.pdb, .mol, .mol2...etc.).

2) Méthodes :

Le docking moléculaire consiste à rechercher le mode d'interaction le plus favorable d'une petite molécule ou ligand avec une cible d'intérêt thérapeutique, la 5-LOX dans notre cas.

2-1- Préparation de la cible thérapeutique (5-LOX) :

Il existe 4 structures cristallographiques la 5-LOX humaine dans la « Protein Data Bank » (PDB) avec une résolution comprise entre 2 et 3 Å. Dans notre étude nous avons choisi le complexe **3V99** représentant la cible thérapeutique 5-LOX en complexe avec un ligand, l'acide arachidonique. En l'occurrence la cible protéique est préparée de la manière suivante :

- Le complexe protéine-ligand est téléchargé dans le format (**.pdb**) à partir de la banque de données en introduisant son code ID (**3V99**).
- Le ligand ainsi que les éléments qui ne sont pas de nature protéique (Fer, H₂O, et l'acide arachidonique) sont éliminés à l'aide du logiciel VMD

- Surfex exige le format (**.mol2**) pour les protéines, le format de la 5-LOX (.pdb) est alors converti en (.mol2), aussi pour le fichier de la liste des résidus constituant la cavité du site actif est converti de (.pdb) en (.dat), en utilisant le logiciel **Openbabel** version 2.0.2.

2-2- Préparation des inhibiteurs :

Les inhibiteurs obtenus à partir de la littérature (voir annexe3) sont reproduits par le logiciel « **TITAN** » **version 1.0.0.1**. La géométrie des molécules dessinées par TITAN est optimisée en minimisant leur énergie avec le même logiciel puis enregistrée sous le format **.pdb**.

2-3- Test d'évaluation de Surfex :

Les performances d'un programme de docking peuvent être jugées au moyen de deux critères : le RMSD (root mean square deviation) et le coefficient de corrélation linéaire (**r**).

2-3-1. RMSD :

Le RMSD correspond à la moyenne de la déviation de chacun des atomes du ligand (ligand de calcul) par rapport à ceux de la molécule d'origine (le ligand de référence). Les performances d'un programme de docking sont évaluées en termes de capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Le mieux possible signifie que la valeur du RMSD entre la pose du ligand calculée par le logiciel et la conformation dans le complexe expérimental est la plus petite possible. Le positionnement, c'est-à-dire l'identification correcte du site de liaison sur la protéine, l'orientation et la conformation du ligand influent sur la valeur du RMSD. La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms.

Ce test a été réalisé sur 100 complexes protéines-inhibiteur tirés de la PDB d'une façon aléatoire (voir annexe 1). Chaque complexe téléchargé est enregistré au format .pdb dans un répertoire spécifique où le ligand est ensuite séparé de la protéine, et enregistré au format **.pdb**. Pour son utilisation par Surfex, le fichier de l'enzyme est converti au format **.mol2** par **Openbabel**.

Le test RMSD a été réalisé par le logiciel **Surfex**, en utilisant pour chaque complexe les commandes suivantes :

- surfex-dock -proto_thresh 0.5 -proto_bloat 2 resproto list_cavite_3v99.dat
3v99prot.mol2 pl

- (Permet de générer le protomol qui sera enregistrée au format **.mol2** dans le répertoire correspondant)
- surflex-dock dock inhibiteur.pdb pl-protomol.mol2 protein.mol2
(Permet de réaliser le docking ou interaction du ligand avec le récepteur)
surflex-dock oprms final-0.mol2 inhibiteur.pdb
- (Permet d'optimiser la position du ligand dans le site actif)

2-3-2. Le coefficient de corrélation :

Les structures ayant permis le calcul du coefficient de corrélation sont représentées dans l'annexe 3.

Le coefficient de corrélation linéaire (r) est obtenu en traçant la droite de régression linéaire donnant la corrélation entre l'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme calculée par Surflex et la valeur expérimentale de son IC_{50} [45]. Ce dernier est converti en pIC_{50} ($-\log IC_{50}$) par le site web suivant : www.sanjeevslab.org/tools.html
L'équation de régression linéaire est calculée par le logiciel « **EXCEL2010** ».

2-4- Les essais de modélisation :

- **Les substitutions :**

Ces substitutions ont été réalisées dans le but de rechercher de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de la 5-LOX. Nous avons pris comme structure de base le meilleur inhibiteur, c'est à dire le composé N° 23 dans le **tableau 5** (voir chapitre 3), sur lequel nous avons effectué différentes substitutions.

NB :

Il y a d'autres méthodes pour rechercher des nouveaux inhibiteurs plus puissants, qu'on a pas utilisé dans cette étude, tels que les similaires fournis par des banques de données comme « Pub chem ».

2-5- Analyse visuelle des interactions :

Cette étape est réalisée par le logiciel **Viewerlite** pour révéler les acides aminés du site actif qui interagissent avec l'inhibiteur.

Pour cela il est nécessaire d'utiliser les commandes suivantes :

- Ouvrir le fichier du site actif de l'enzyme.
- Ouvrir le fichier du final-0 correspondant au meilleur résultat de l'affinité pour un ligand donné.

- Sélectionner le ligand → Edit → Copy → Allez vers le fichier du site actif → Paste.
- Sélectionner le ligand → Tools → Monitors → HBond.

Ceci permet d'observer 2 types d'interactions :

- Les interactions hydrophobes.
- Les liaisons « H ».

Pour le 1^{er} type d'interaction, le logiciel ne permet pas de calculer la distance entre les atomes du ligand et ceux du site actif. Les contacts hydrophobes sont définis en tenant compte des acides aminés du site actif les plus proches de l'inhibiteur. En revanche, le logiciel permet de visualiser les liaisons « H » et de calculer leur distance. Pour cela, il faut actionner les commandes suivantes :

- Sélectionner les deux atomes faisant la liaison hydrogène ligand → Tools → Monitors → Distance.

2-6- Filtrage ADME (règle de lipinski « 1997 ») :

En 1997, **Lipinski** a défini un ensemble de propriétés physico-chimiques permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure 2D. Selon cette règle, un composé possède toutes les chances d'être biodisponible oralement s'il respecte au moins 3 des 5 critères suivants :

- Ne possède pas plus de **5 donneurs** de ponts hydrogène (OH et NH).
- Ne possède pas plus de **10 accepteurs** de ponts hydrogène (O et N).
- Possède une masse moléculaire (**PM**) inférieure à 500 da ($< 83 \times 10^{-23}$ g).
- Possède un coefficient de partition octanol/eau (**log P**) ou une lipophile entre -2 et 5.
- Possède un nombre de **liaisons rotatives** inférieur à 15 [46].

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur **Molinspiration** se trouvant en réalisant les étapes suivantes sur le site web :

<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>

- Conversion du format du fichier de nos inhibiteurs de **.pdb** en format **.sim** (SMILES) par l'utilisation de logiciel **Openbabel** ou désigner l'inhibiteur dans la case de dessin.
- Ouverture du site web indiqué au-dessus.
- Entrer l'inhibiteur dans la case « **Enter SMILES** ».
- Click sur le bouton « **calculate properties** ».

CHAPITRE V

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1- Analyse visuelle de l'enzyme :

L'enzyme 5-LOX est constituée de 2 chaînes A et B (voir figure 15). Dans notre étude, seule la chaîne A a été prise en compte car renfermant dans son site actif un ligand qui est l'acide arachidonique (voir figure 16). Le site actif est constitué de 19 acides aminés dont 10 sont hydrophobes, conférant à la cavité sa haute hydrophobicité (voir figure 17). On retrouve également un atome de Fer lié à 3 histidines. Ces observations visuelle nous montrent la conformation bien détaillée du site actif de la 5-LOX.

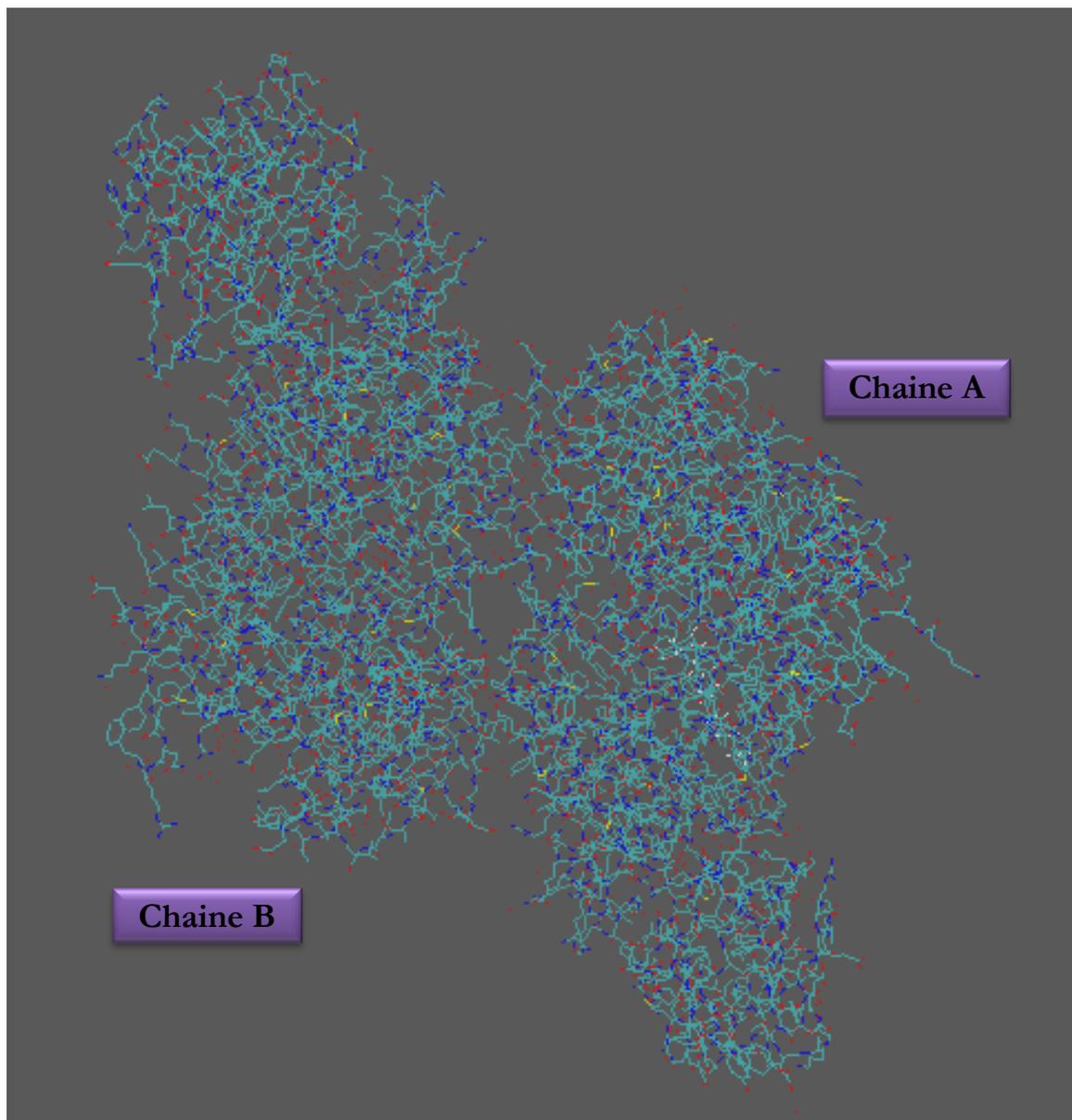


Figure 15 : la cible thérapeutique (5-LOX)

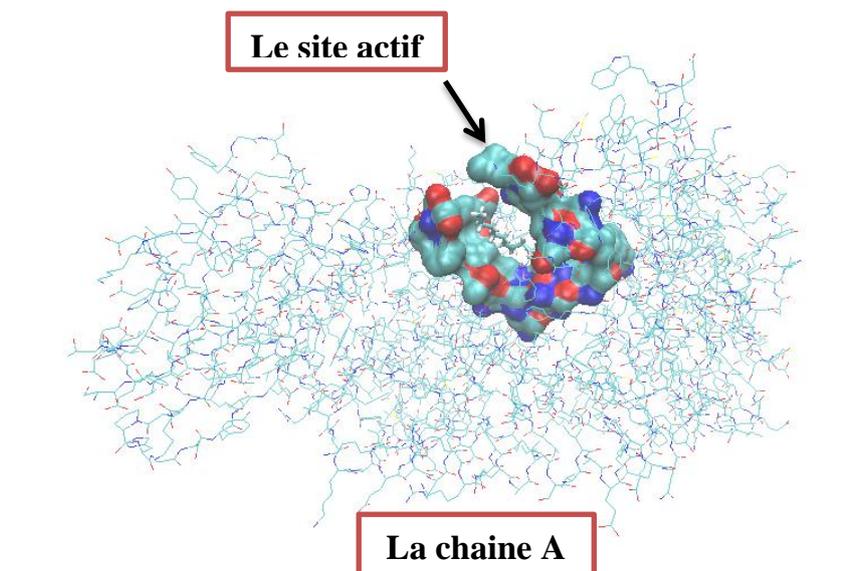


Figure 16: Le positionnement du site actif dans la chaîne A de la 5-LOX

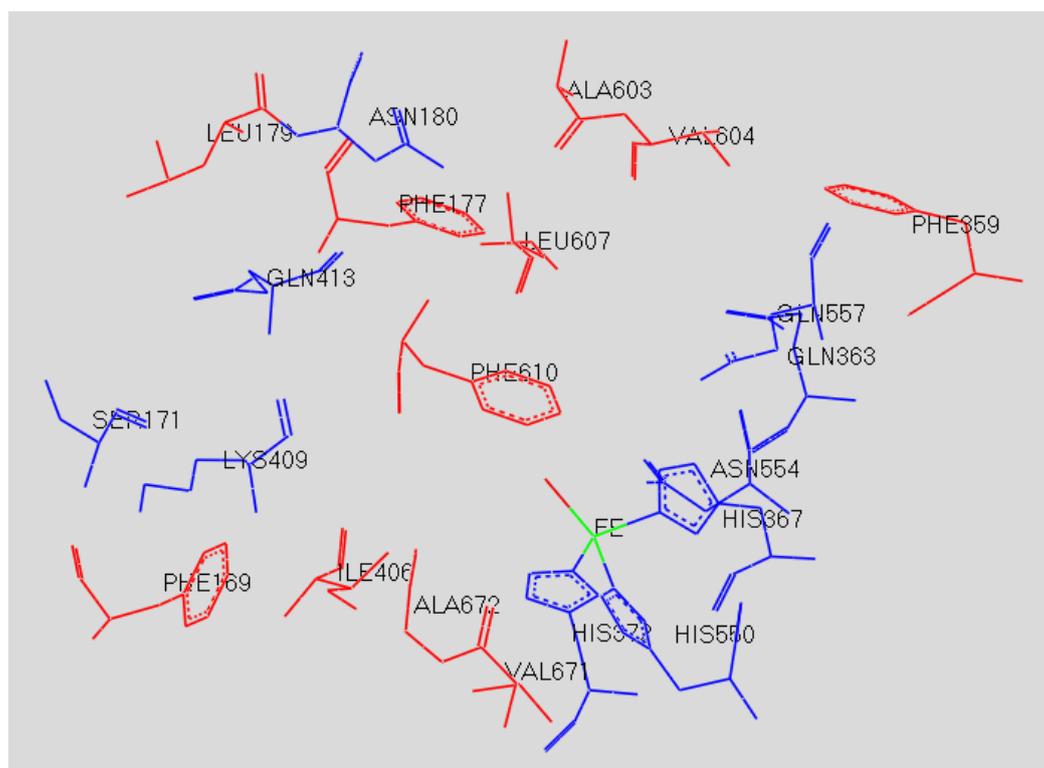


Figure 17: les acides aminés constituant le site actif de la 5-LOX

- Les acides aminés polaires en bleu.
- Les acides aminés apolaires en rouge.

2- Tests de fiabilité du programme de docking :

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la 5-LOX par diverses molécules, par la méthode du docking moléculaire il était important d'évaluer d'abord la performance du programme Surflex en faisant appel à trois tests différents :

- L'écart quadratique moyen ou le RMSD (Root mean square deviation).
- L'analyse visuelle.
- Le coefficient de corrélation linéaire (r).

2-1 Le test 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 écart de la déviation quadratique moyenne « **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 est inférieure à 2Å. La performance du logiciel Surflex a été évaluée sur 100 complexes protéines-ligands tirés de façon aléatoire de la PDB.

Les écarts quadratiques moyens entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles du ligand amarré par Surflex, ont été calculés.

Les résultats de RMSD obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 6: Résultats obtenue de RMSD des complexes protéines-ligands

N°	CODE	RMSD (Å)	N°	CODE	RMSD (Å)	N°	CODE	RMSD (Å)
01	1P0M	0,660	34	4YXI	1,241	67	4ZWZ	1,422
02	1P0P	2,008	35	5FYM	0,687	68	4ZX0	1,647
03	1XLU	0,132	36	4OTJ	2,005	69	5BNL	0,988
04	1XLV	0,955	37	4OTY	1,390	70	5H DU	0,912
05	1XLW	0,581	38	4PH9	0,653	71	5FYH	1,207
06	2WID	1,125	39	4RH2	1,646	72	5H DV	0,908
07	2WIG	0,078	40	4RJ3	1,515	73	3WV2	1,536
08	2WIJ	1,189	41	4BYI	1,265	74	5H DZ	0,100
09	2WIK	0,990	42	4RSO	1,462	75	5HE4	0,088
10	5EAF	2,185	43	5CLU	0,282	76	5HE5	0,191
11	2XMD	0,180	44	5CYI	1,693	77	5HE7	1,942
12	4YH4	0,227	45	5DOR	0,669	78	5HX8	1,293
13	4YX4	0,084	46	5D1J	2,065	79	5EAH	1,536
14	4ZI3	2,444	47	5E2K	0,957	80	5E58	1,770
15	5FKJ	1,678	48	5E2R	0,396	81	1JNQ	0,051
16	3DJY	1,201	49	5E2S	0,742	82	1N8Q	0,657
17	3DKK	1,390	50	5E28	0,677	83	1OCE	1,437
18	3LN1	2,105	51	5EH5	1,039	84	1UT6	2,066
19	3Q7D	1,064	52	5F1A	0,928	85	2JEY	1,288
20	3RR3	0,093	53	5F19	0,794	86	2JEZ	0,937
21	3V99	1,053	54	5FY7	0,548	87	2WHR	0,976
22	3BDL	2,353	55	5FY8	0,892	88	4RVK	0,691
23	4AXB	0,769	56	5FXV	0,057	89	4RVL	2,234
24	4B0O	0,057	57	4ZX1	2,005	90	4RVM	1,571
25	4BD5	1,576	58	5FXX	0,997	91	4XWZ	1,210
26	4BZD	1,250	59	5FXZ	1,112	92	4YU1	2,499
27	4D1X	0,262	60	5FY0	1,220	93	5EAB	1,232
28	4D1Z	0,084	61	5FYT	0,969	94	5EAC	1,427
29	4FM5	2,722	62	4YYT	0,552	95	5EAD	1,577
30	4KD1	1,508	63	4Z0L	1,445	96	5EAE	0,149
31	4LYN	1,878	64	4ZWI	1,960	97	5EAG	1,012
32	4M10	1,718	65	4ZWX	1,838	98	5ETW	1,017
33	5FYI	1,500	66	4ZWY	1,768	99	5FUP	0,953
						100	5FV3	0,436

La représentation graphique de ces résultats en pourcentage (%) à 2 intervalles de RMSD ($>2\text{\AA}$ et $<2\text{\AA}$) est donnée par la figure 18 suivante :

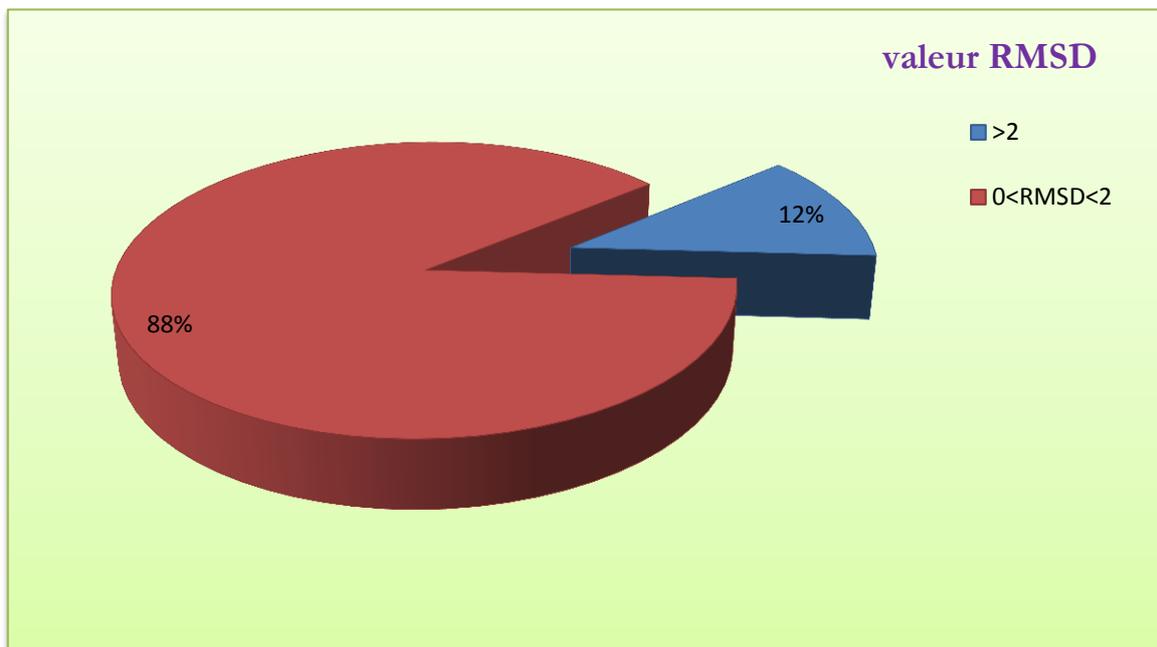


Figure 18 : Résultats en pourcentage obtenus par Surfex à deux intervalles du RMSD (\AA)

Ce graphe montre que 88% des valeurs sont inférieures ou égales à 2\AA alors que 12% seulement sont supérieures à 2\AA . De tels résultats apportent la preuve que le programme Surfex reproduit bien les données expérimentales et peut être utilisé en toute confiance pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

Le résultat est très proche de celui obtenu par CHIKHI A. (2007) [2] (88,4%).

2-2 Visualisation des molécules superposées :

L'analyse visuelle par **VMD** ou **Viewerlite** est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD.

Pour cela, il suffit de comparer, par simple superposition la conformation du même ligand, calculée par Surfex (final-0 en rouge) à celle obtenue expérimentalement que l'on (en bleu) retrouve dans la PDB (**voir figure 20**) :

- Le mauvais : N° **81** dans le tableau 6, **figure 19 (a)**
- L'intermédiaire : N° **75** dans le tableau 6, **figure 19 (b)**
- Le meilleur : N° **29** dans le tableau 6, **figure 19 (c)**

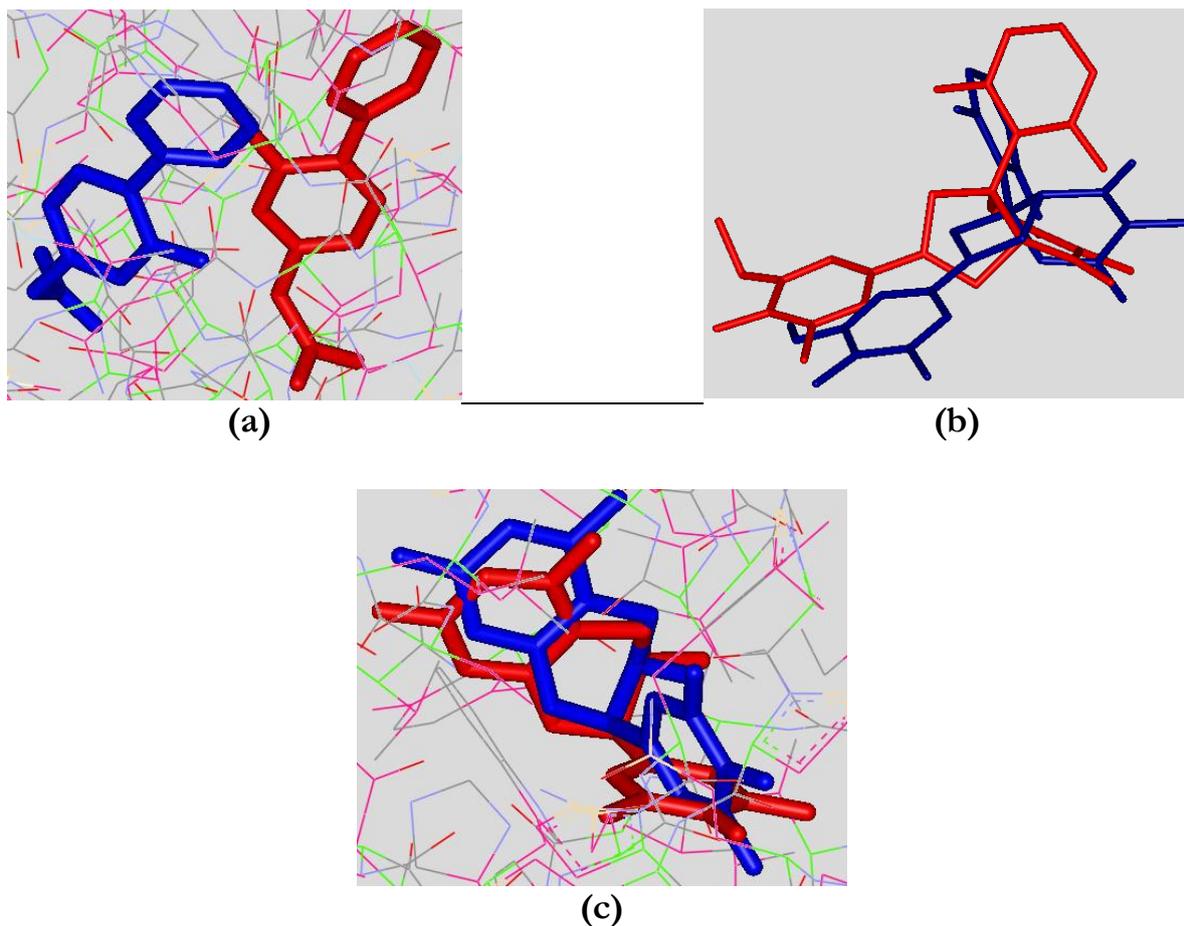


Figure 19: La visualisation des différents résultats RMSD

2-3 Le coefficient de corrélation (r) :

L'affinité calculée par Surfex de soixante-deux (62) inhibiteurs de la 5-LOX est analysée par régression linéaire avec les valeurs de leurs IC_{50} issues de la littérature des travaux précédents (**voir chapitre 3**). Ces résultats sont indiqués en valeurs décroissantes du score obtenu par Surfex dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7: Résultats de l'analyse par régression linéaire

N°	Score	IC ₅₀ (µM)	pIC ₅₀	N°	Score	IC ₅₀ (µM)	pIC ₅₀
01	4,27	0,06	7,22	32	2,59	1	5,65
02	3,88	0,025	7,6	33	2,59	2,2	6,39
03	3,86	0,16	7,03	34	2,58	1,7	6,12
04	3,77	0,224	6,92	35	2,58	0,75	5,69
05	3,62	0,085	7,07	36	2,56	2	5,56
06	3,62	0,105	6,69	37	2,55	2,7	6,07
07	3,61	0,092	7,03	38	2,47	0,85	5,76
08	3,58	0,201	6,79	39	2,46	0,11	6,44
09	3,53	0,1	7	40	2,41	0,36	6,37
10	3,52	0,065	7,18	41	2,38	0,42	7,03
11	3,5	0,12	6,97	42	2,35	0,063	7
12	3,38	0,081	7,09	43	2,35	0,099	6,01
13	3,23	0,08	7,09	44	2,34	0,96	6,19
14	3,19	0,07	7,15	45	2,32	0,64	6,14
15	3,09	2,2	5,65	46	2,23	0,72	6,89
16	3,04	0,7	6,15	47	2,21	0,127	6,37
17	3	0,4	6,39	48	2,14	0,092	6,82
18	2,97	0,11	6,95	49	2,1	0,15	6,45
19	2,95	0,3	6,52	50	2,06	0,35	6,52
20	2,88	0,74	6,13	51	2,03	0,3	6,64
21	2,87	0,093	6,98	52	1,97	0,104	6,08
22	2,86	0,14	6,85	53	1,97	0,84	6,09
23	2,86	0,57	6,24	54	1,85	0,8	6,95
24	2,84	0,07	7,15	55	1,73	0,07	5,13
25	2,83	0,6	6,22	56	1,68	7,4	6,32
26	2,75	0,77	6,11	57	1,68	0,48	6,1
27	2,71	0,146	6,83	58	1,64	0,79	6,04
28	2,66	0,082	7,08	59	1,58	0,9	5,24
29	2,65	0,13	6,88	60	1,42	1	6
30	2,62	3	5,52	61	1,39	1,04	5,98
31	2,6	0,06	6	62	1,34	5,8	5,23

Les structures et les références des inhibiteurs du tableau 7 sont indiquées dans l'annexe 3.

L'analyse par régression linéaire a permis d'obtenir la courbe de corrélation suivante (Figure 21)

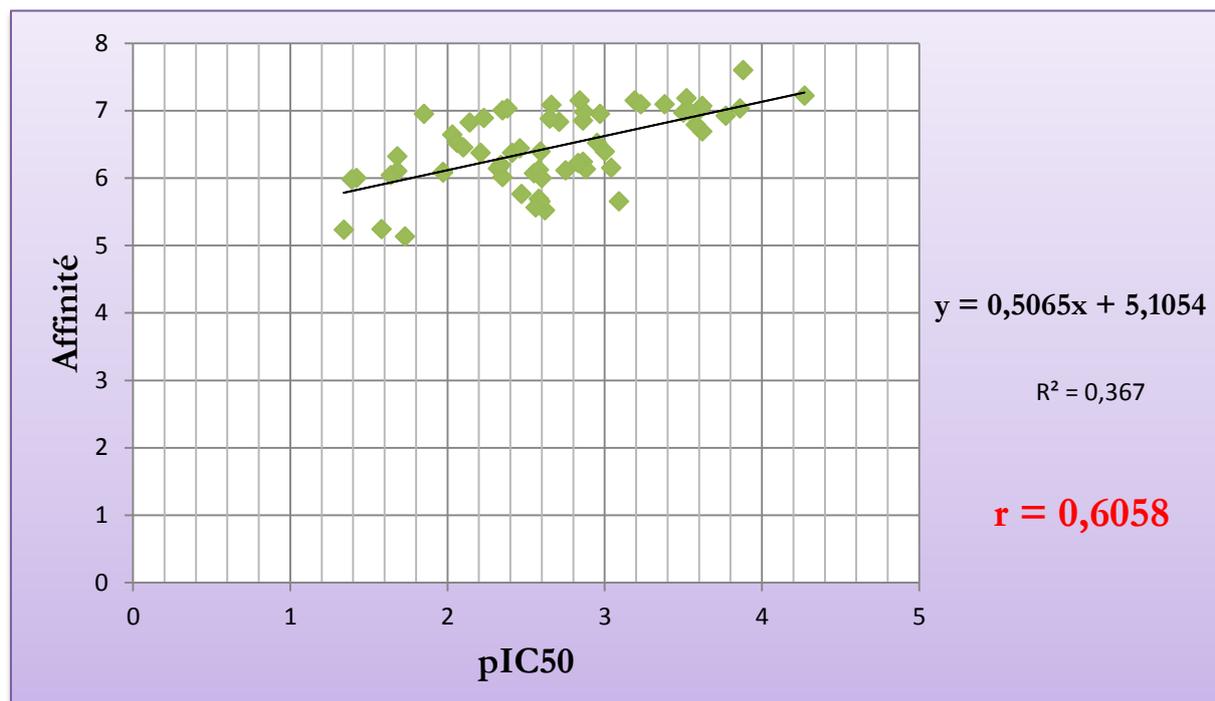


Figure 20 : Corrélation entre l'activité biologique (pIC₅₀) de différents inhibiteurs (62) et leur affinité calculée par SurfleX

Le programme de docking moléculaire est performant quand la valeur absolue du coefficient de corrélation linéaire dépasse 0.5. L'analyse par régression linéaire donne un coefficient de corrélation égale à 0,6058 montrant qu'il existe une bonne corrélation entre l'affinité et l'activité biologique expérimentale (pIC₅₀) des 62 inhibiteurs étudiés (voir figure 21).

A l'issue de cette analyse, nous pouvons conclure une nouvelle fois que SurfleX est un programme de docking performant.

3- Etude et proposition de nouveaux inhibiteurs :

Dans la perspective de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de La 5-LOX, il est primordial d'étudier, en premier lieu, les mécanismes mis en jeu dans l'inhibition de cette enzyme. Dans cette optique, nous avons choisi le composé 23 (N-(4-aminophenyl)-4-(2,5-dichlorophenyl)-1,3-thiazole-2-amine) qui est un dérivé de l'aminothiazol (voir chapitre 3) qui présente un pouvoir inhibiteur le plus élevé envers la 5-LOX. L'étude de l'affinité avec SurfleX a également donné le meilleur score égal à 4,27 avec une valeur d'IC₅₀ égale à 0,06

μM . On a pris en considération la valeur du score le plus élevé parce que notre étude se base sur un coté théorique par les logiciels du docking moléculaire.

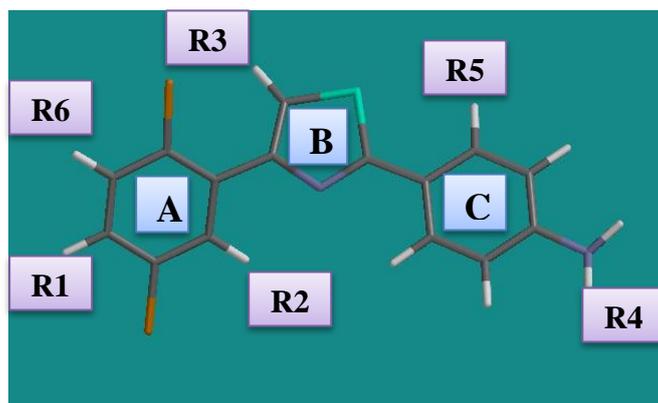


Figure 21 : le composé 23 (un dérivé de l'aminothiozol)

Ce score est parfaitement corrélé à l'activité inhibitrice du composé 23 avec un IC_{50} égale à $0,060 \mu\text{M}$. La **figure 22** montre que ce composé est bien placé dans la cavité hydrophobique plus proche du résidu hydrophobique: Leu607. De plus, ce composé forme trois liaisons hydrogènes (en vert) : deux distantes de $1,91 \text{ \AA}$ et $2,03 \text{ \AA}$ entre les hydrogènes de la fonction amine du cycle C de l'inhibiteur et la fonction α -carboxyle de Phe555 et l'azote- α de Tyr558, la troisième liaison est distante de $1,98 \text{ \AA}$ entre l'oxygène du radical de l'Asn554 et l'hydrogène de l'azote reliant les cycles B et C de l'inhibiteur (**Figure 23**).

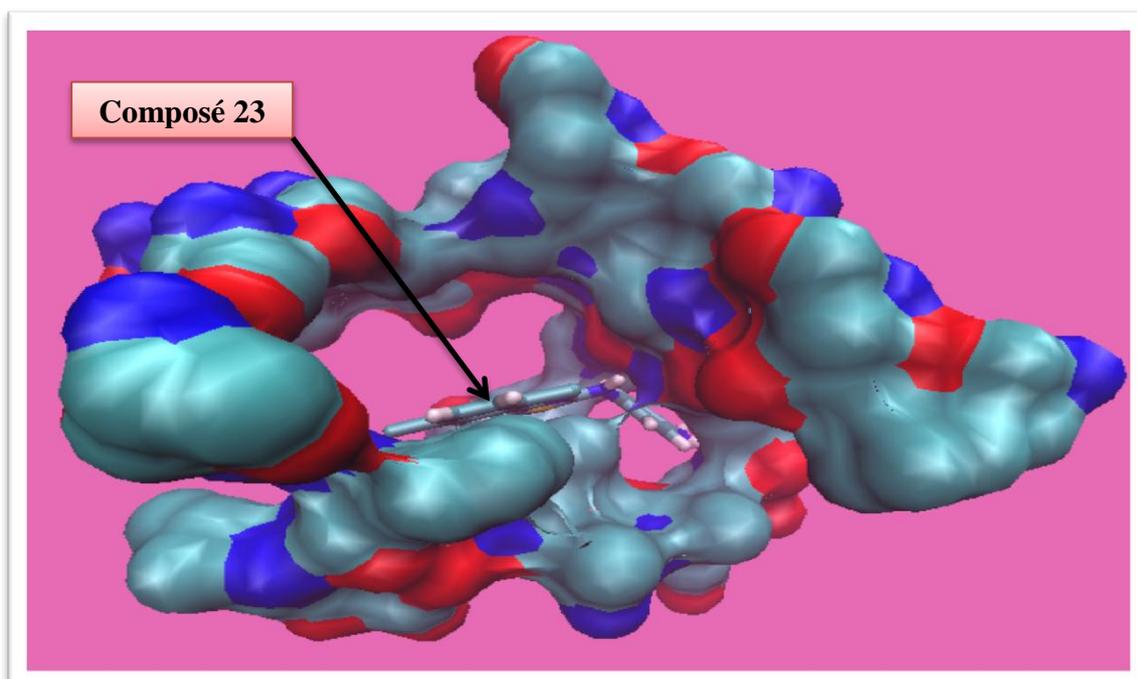


Figure 22 : L'emplacement du composé 23 dans la cavité du site actif de la 5-LOX

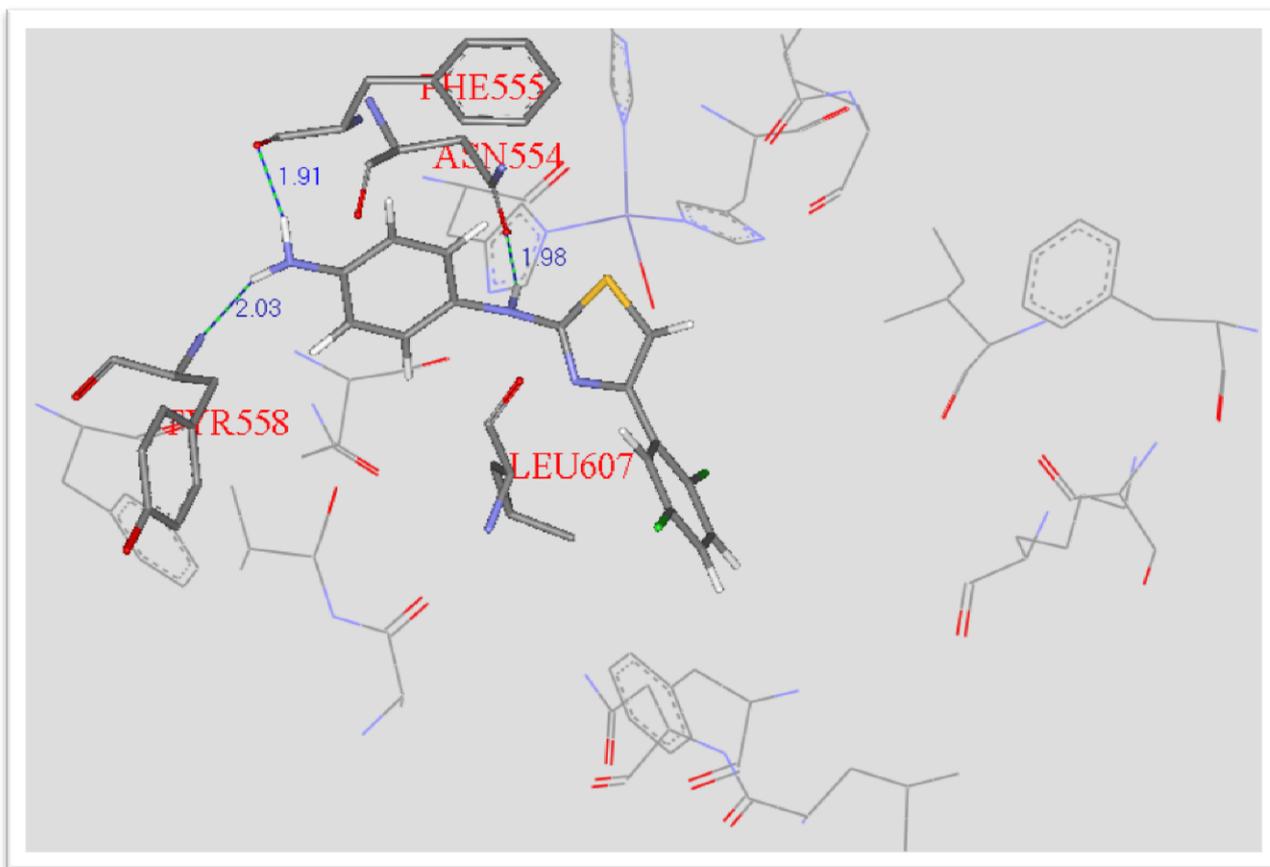


Figure 23 : Mode d'interaction du composé 23 dans le site actif de la 5-LOX

Dans le but d'améliorer l'activité du composé 23 nous avons réalisé plusieurs substitutions par différents groupements fonctionnels de type $(\text{OH}, \text{NH}_2, \text{COOH}, \text{HSO}_2,$ ou alkyles de type « CH_3 », « C_2H_5 » et « Phényle », ou enfin par des halogènes tels que « **F**, **Cl** et **Br**). Ces substitutions ont été introduites sur les atomes C4 et C6 du cycle A, C3 du cycle B et sur C6 et sur la fonction amine lié au C4 du cycle C de l'inhibiteur. Au total 153 composés ont été obtenus par différents types de substitution ; mono, di, tri et tétra-substitutions (voir **annexe 2**). Ces derniers sont évalués par Surflex dont 4 d'entre eux ont présenté une légère amélioration excepte le composé 5 qui montre une augmentation significative de leur score d'affinité envers la 5-LOX (voir **Tableau 8**).

Tableau 8: Valeurs des scores d'affinité d'interaction du composé 23 et ses nouveaux dérivés

N° du composé	Les substitutions				L'affinité (M ⁻¹)
	R1	R2	R3	R4	
Composé 23	H	H	H	H	4,27
01	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	H	4,41
02	CH ₂ -OH	CH ₂ -NH ₂	H	H	4,65
03	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	4,77
04	CH ₃ , R6 (Br)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	4,85
05	OH	CH ₃	CH ₂ -COOH	H et R5 (-CO-NH ₂)	5,92

Les résultats du tableau montrent que le meilleure score (5,92) a été obtenue par le composé sur lequel nous avons introduit une tétra-substitution par le groupement méthyle (-OH) en positions R1, CH₃ en R2, CH₂-COOH en R3 et CO-NH₂ en R5 (**Figure 21**).

4-1) Etude d'interaction du composé N° 01 :

Le composé 1 est stabilisé dans le site actif de la 5-LOX par trois liaisons (en rouge) deux distantes de 2,14 Å et 2,07 Å entre l'azote du cycle C de l'inhibiteur et la fonction α -carboxyle de Phe555 et l'azote- α de Tyr558, la troisième liaison est distante de 1,91 Å entre l'oxygène du radical de l'Asn554 et l'azote reliant les cycles B et C de l'inhibiteur. Le composé 1 forme aussi des interactions hydrophobes avec les résidus Phe177, Phe555, Val604, Leu607 et Phe610 (**Figure 24**).

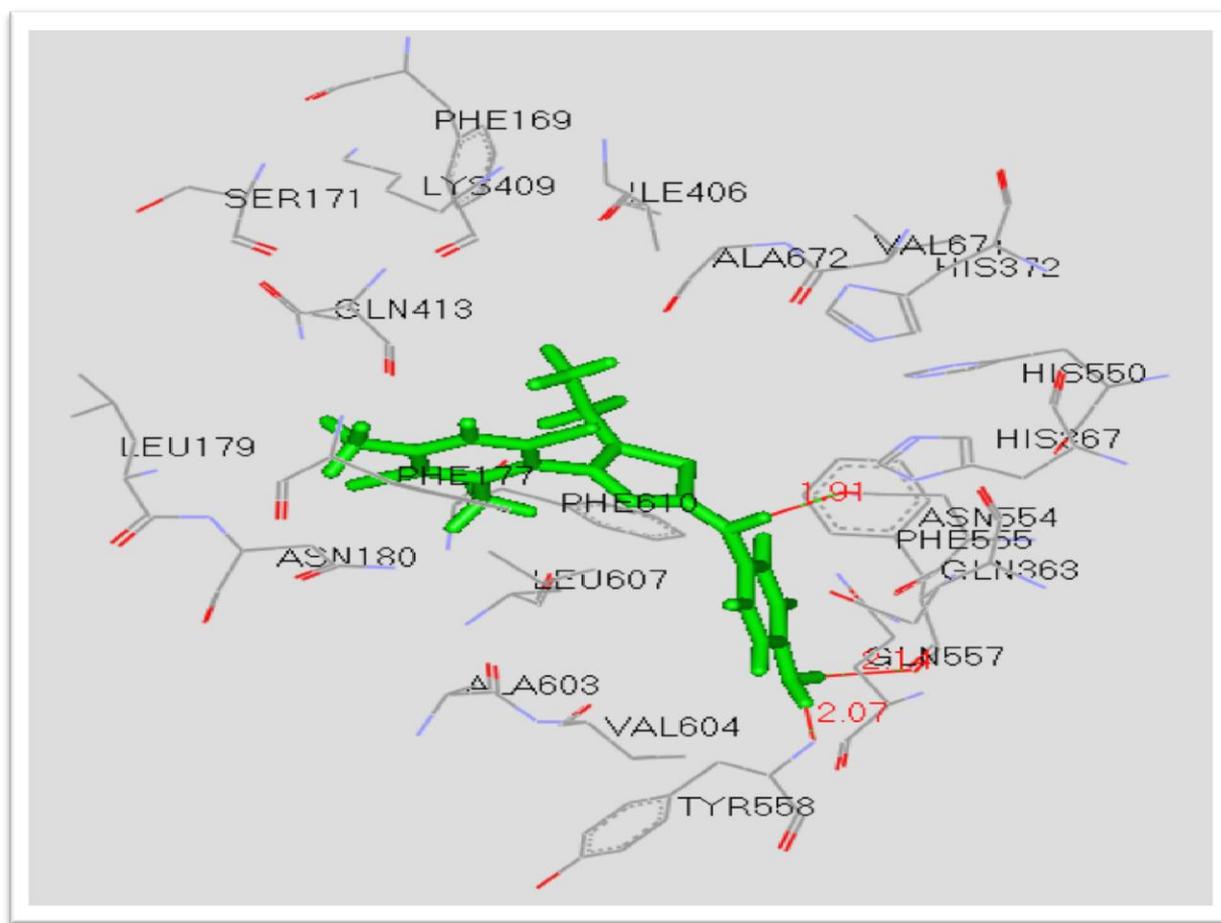


Figure 24 : Mode d'interaction du composé 1 dans le site actif de la 5-LOX

4-2) Etude d'interaction du composé N° 02 :

Le composé 2 est bien placé dans la cavité du site actif de la 5-LOX (**Figure 25**), est stabilisé par quatre liaisons (en rouge) dont deux distantes de 2,35 Å et 2,06 Å entre l'hydrogène de la fonction amine du cycle C de l'inhibiteur et l'hydrogène de la fonction α -carboxyle de Phe555 et l'hydrogène de l'azote- α de Tyr558 respectivement, la troisième liaison est distante de 2,06 Å entre l'oxygène du radical de l'Asn554 et l'hydrogène de l'azote reliant les cycles B et C de l'inhibiteur. Enfin la quatrième liaison hydrogène distante de 1,93 Å est située entre l'hydrogène de l'azote porté par le C6 du cycle (A) de l'inhibiteur et l'hydrogène de la fonction α -carboxyle de Gln609 qui n'est pas un résidu de notre site actif. Le composé 3 forme aussi avec quelque acide aminé du site actif des interactions hydrophobes (Leu607, Phe555 et Phe610) (**Figure 26**).

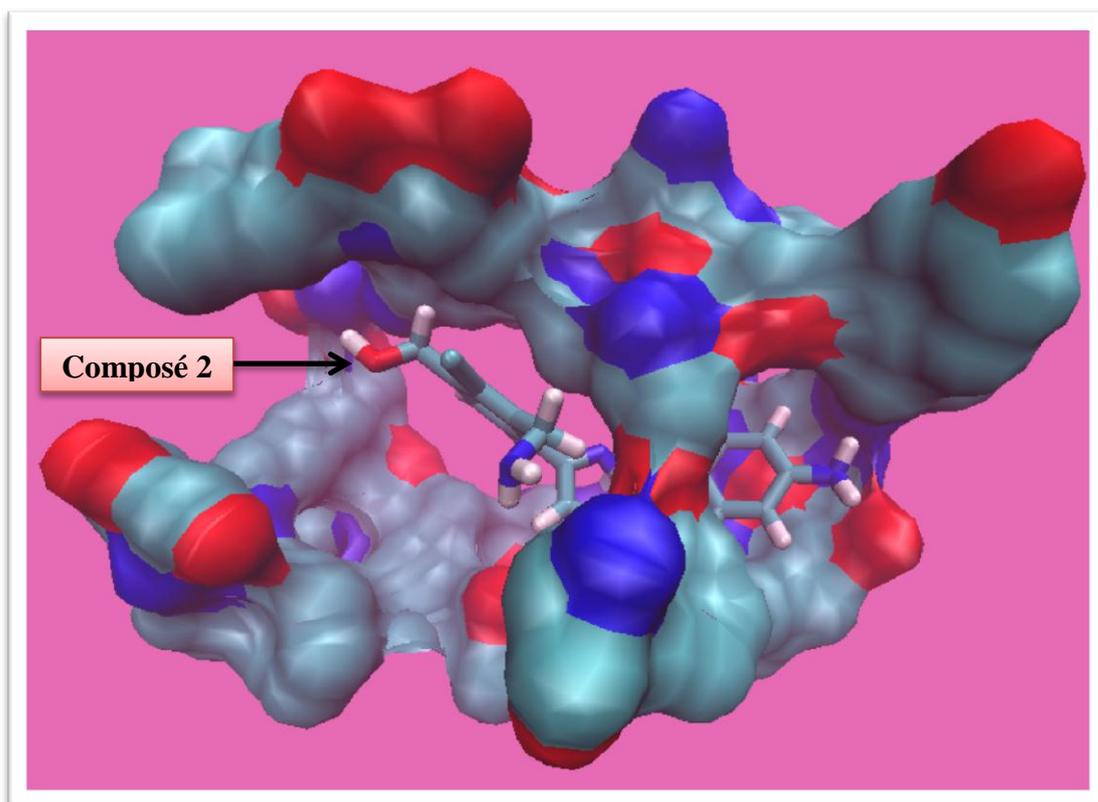


Figure 25 : L'emplacement du composé 2 dans le site actif de la 5-LOX

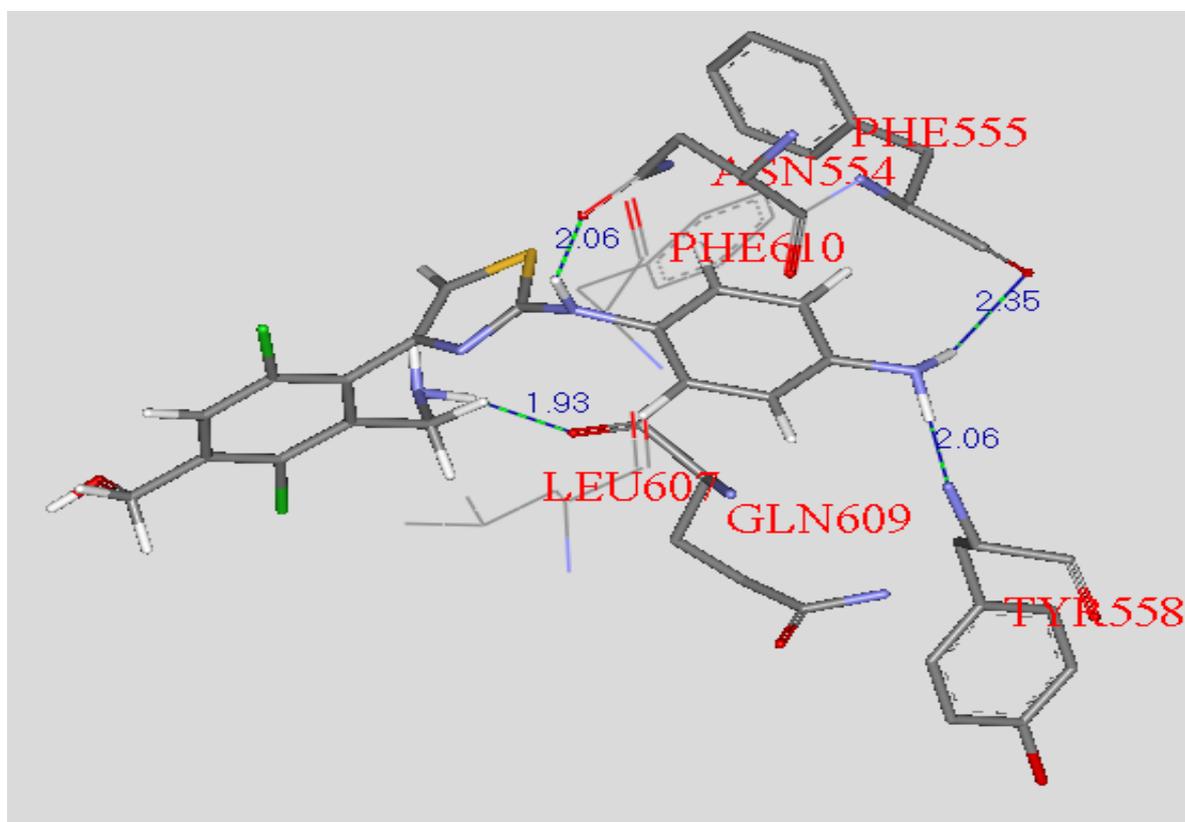


Figure 26 : Mode d'interaction du composé 2 dans le site actif de la 5-LOX

4-3) Etude d'interaction du composé N° 03 :

Le composé 3 est bien placé dans la cavité du site actif de la 5-LOX, est stabilisé par deux liaisons (en rouge) dont une distante de 2.03 Å et 1,97 Å entre l'azote du cycle C de l'inhibiteur et la fonction α -carboxyle de Phe555 et l'azote- α de Tyr558. Le composé 5 forme aussi avec quelque acide aminé du site actif des interactions hydrophobes (Phe177, Leu607 et Phe610) (**Figure 27**).

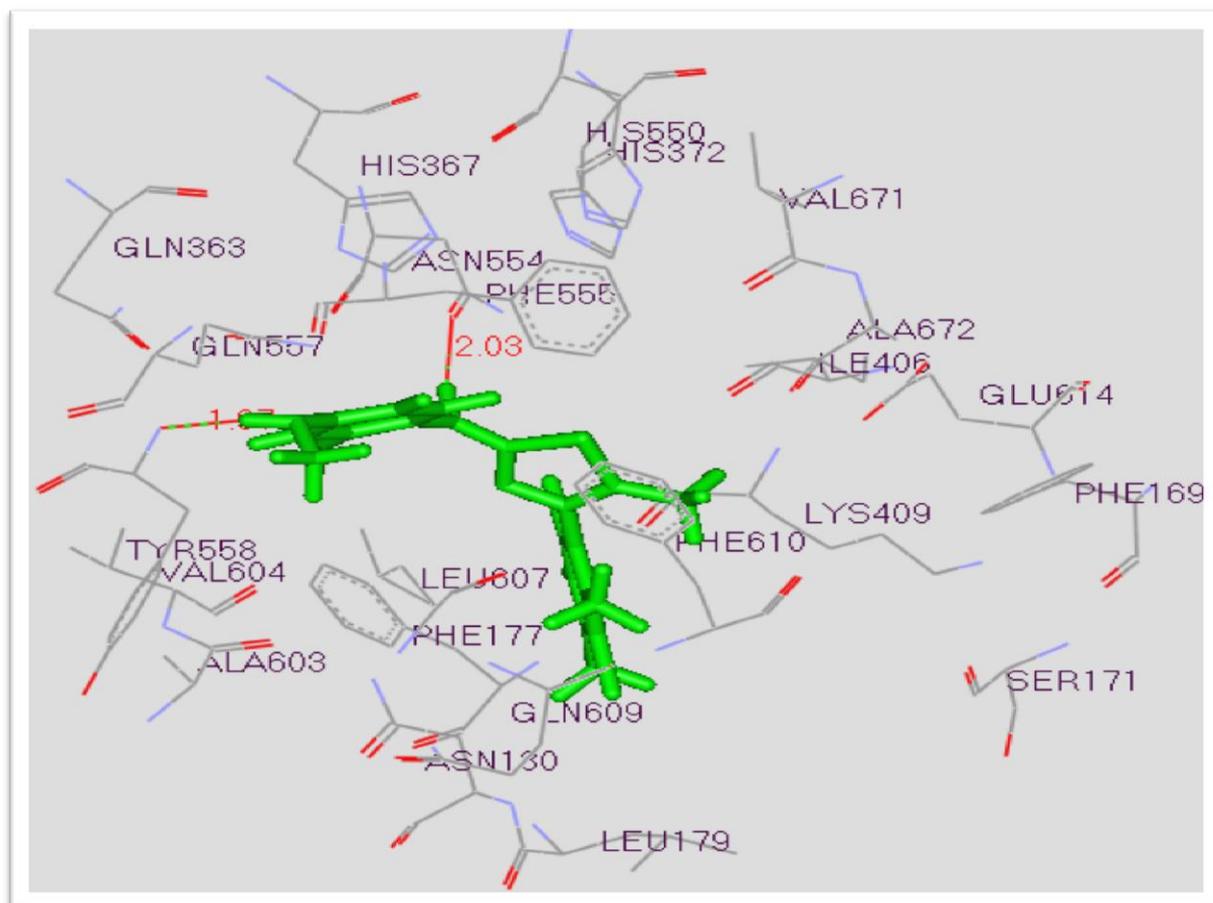


Figure 27: Mode d'interaction du composé 3 dans le site actif de la 5-LOX

4-4) Etude d'interaction du composé N° 04 :

Le composé 4 est bien placé dans la cavité du site actif de la 5-LOX (**Figure 28**), est stabilisé par deux liaisons (en bleu) dont une distante de 2.06 Å et 1,96 Å entre l'azote du cycle C de l'inhibiteur et la fonction α -carboxyle de Phe555 et l'azote- α de Tyr558. Le composé 5 forme aussi avec quelque acide aminé du site actif des interactions hydrophobes (Leu607 et Phe610) (**Figure 29**).

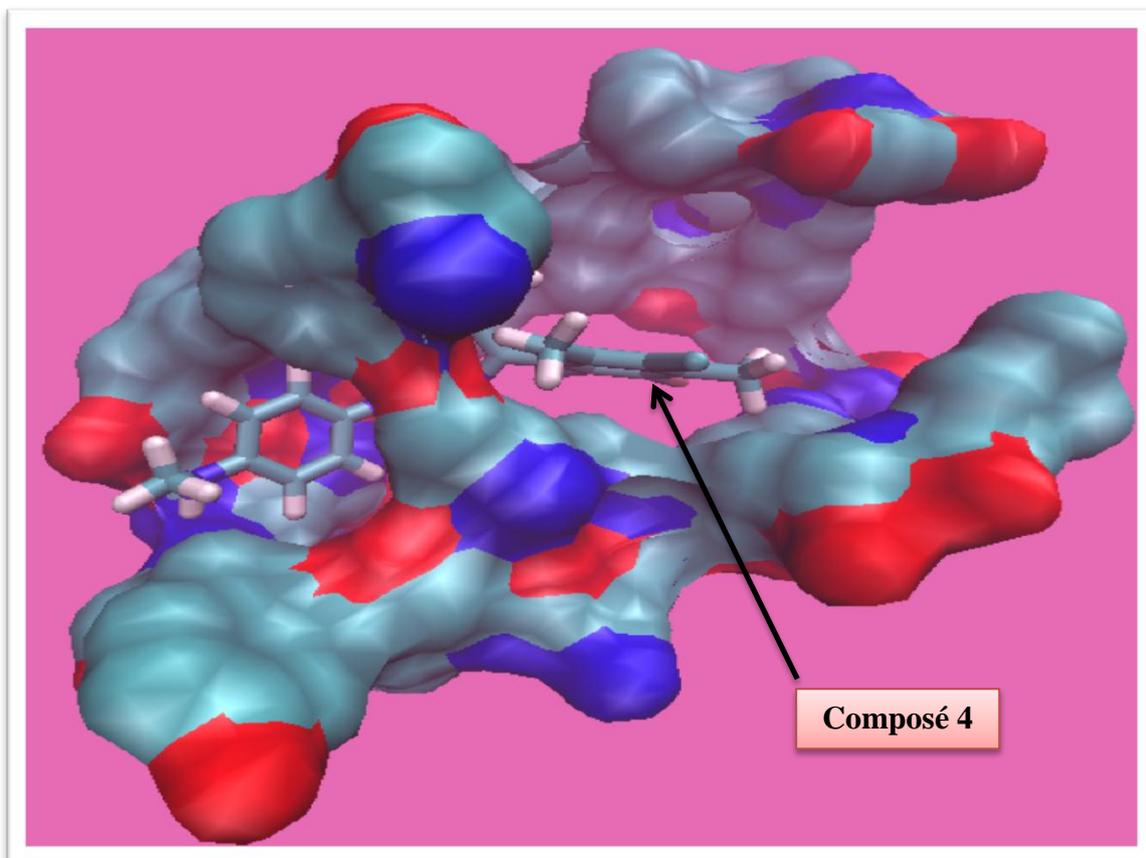


Figure 28: Mode d'interaction du composé 4 dans le site actif de la 5-LOX

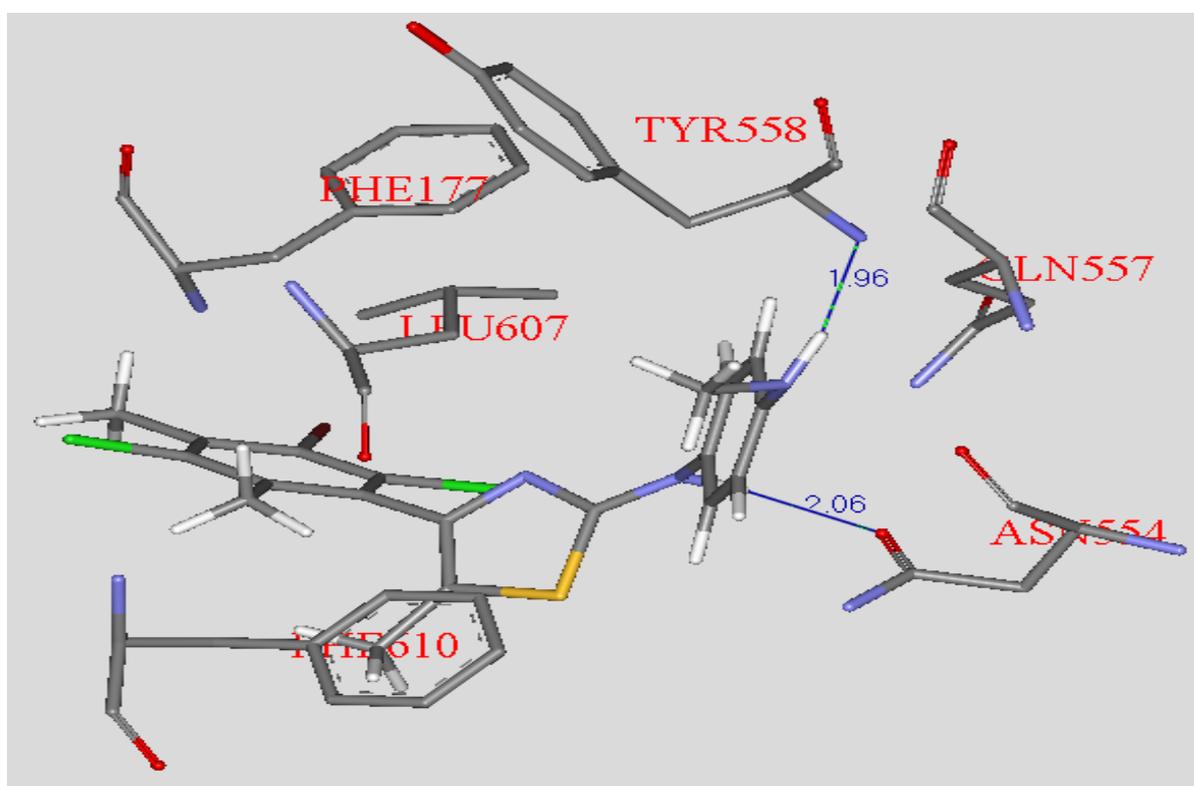


Figure 29: Mode d'interaction du composé 4 dans le site actif de la 5-LOX

4-5) Etude d'interaction du composé N° 05 :

Le composé 5 est bien placé dans le site actif de la 5-LOX (**Figure 30**), est stabilisé par cinq liaisons hydrogènes (en bleu) dont deux distantes de 2,24Å et 2,05Å entre l'azote porté par C4 du cycle C de l'inhibiteur et la fonction α -carboxyle de Phe555 et l'azote- α de Tyr558. La troisième liaison hydrogène distante de 2,14Å entre l'oxygène du α -carboxyle du Val604 et l'azote de la fonction amide porté sur le C6 du cycle C de l'inhibiteur. La quatrième liaison hydrogène distante de 2,19Å entre l'oxygène de la fonction amide du radical du Asn554 et l'azote reliant les cycles B et C de l'inhibiteur. La cinquième liaison hydrogène distante de 1,93Å entre la fonction carboxyle sur (CH₂) porté sur C3 du cycle B de l'inhibiteur et l'oxygène du α carboxyl de l'Ala672. Le composé 5 forme aussi avec quelque acide aminé du site actif des interactions hydrophobes avec les résidus (Phe555, Leu607 et Phe610) (**Figure 31**).

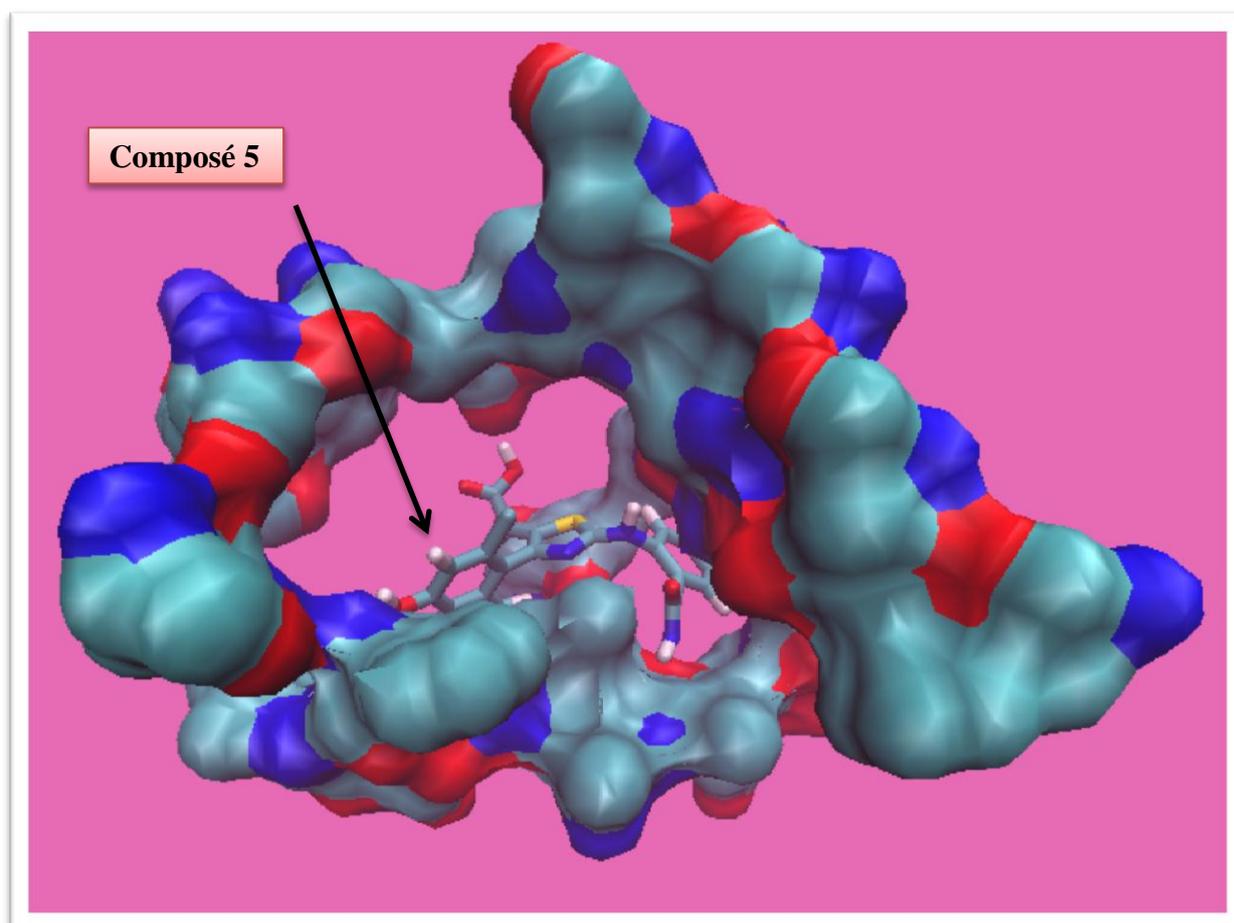


Figure 30: l'emplacement du composé 5 dans le site actif de la 5-LOX

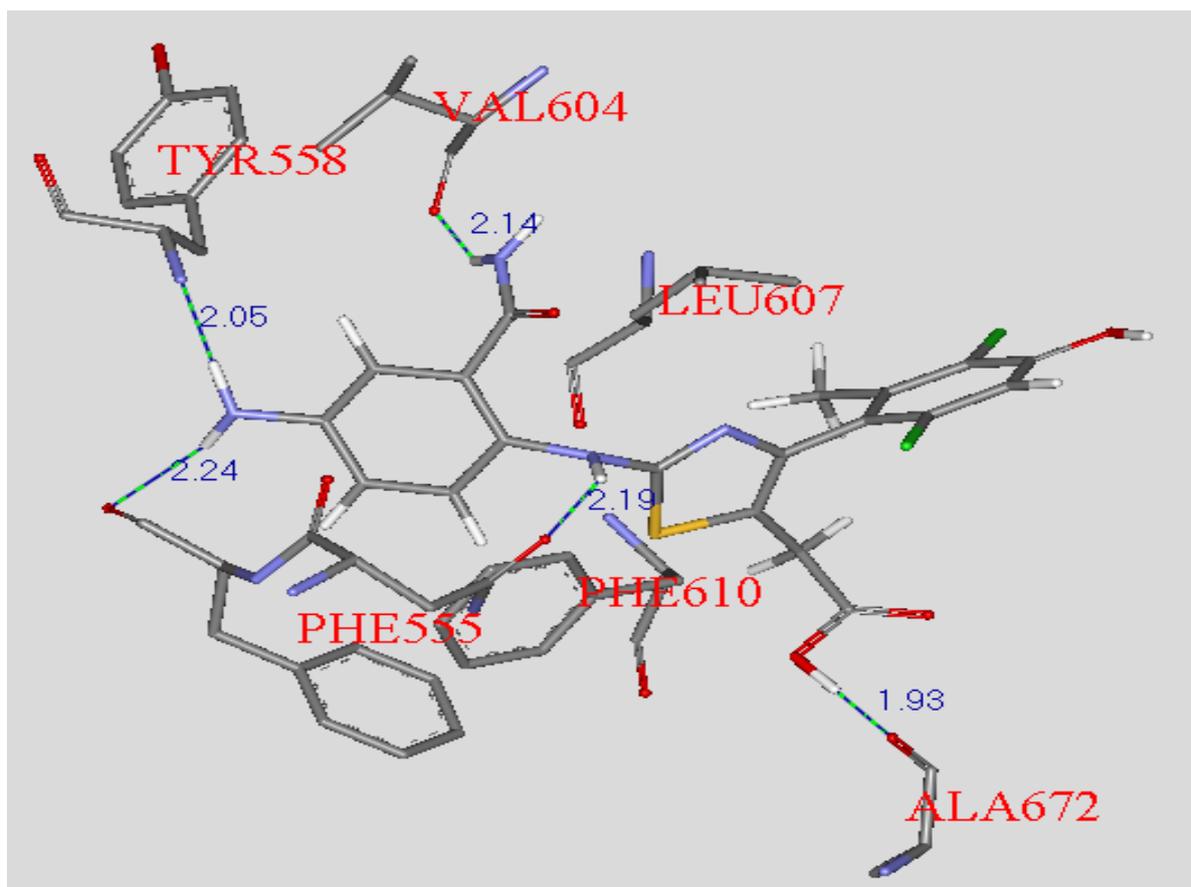


Figure 31 : Mode d'interaction du composé 5 dans le site actif de la 5-LOX (suite)

4- Application de la règle LIPINSKI (filtrage ADME) :

Les principales raisons de l'échec des molécules en cours de développement d'un médicament sont le manque d'efficacité chez l'homme et les problèmes de pharmacocinétique. En effet, les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion d'une molécule peuvent être estimées à partir de sa structure chimique, ce qui contribue à réduire les échecs dus à ces mauvaises propriétés d'ADME. Dans notre travail, il était très important de compléter cette étude par l'application de la méthode de filtre ADME qui est basée sur la règle de cinq de Lipinski afin de nous renseigner sur les propriétés pharmacocinétiques (ADME) des cinq composés étudiés précédemment. Les résultats sont présentés dans le **tableau 9**.

Tableau 9: Propriété pharmacocinétique du composé 23 et ses dérivés

	PM	Donneur de H	Accepteur de H	Liaisons rotatable	LogP
Composé 23	336.25	3	3	3	5.02
Composé 1	378.33	3	3	3	5.99
Composé 2	395.31	5	6	5	3.40
Composé 3	392.36	3	2	4	6.77
Composé 4	471.25	3	2	4	7,51
Composé 5	467.33	8	7	6	3.51

D'après les résultats du tableau, il ressort que les 5 composés étudiés sont en accord avec la règle de 5 (Lipinski). Selon Lipinski, tous les composés ne validant pas au moins trois de ces conditions sont susceptibles de poser des problèmes d'absorption par voie orale. En se référant particulièrement à leur coefficient de partage **eau/octanol**, parfaitement dans les normes, il apparaît que les composés 2 et 5 contrairement au composés 23, 1, 3 et 4 peuvent se dissoudre très facilement dans les phases aqueuses de l'organisme et traverser les membranes lipidiques pour parvenir jusqu'au leur lieu d'action (**voir tableau 9**).

CONCLUSION

Notre travail avait pour but de nous initier aux outils de la simulation informatique et de développer nos compétences en particulier en docking moléculaire par **Surflex** afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la 5-lipoxygénase (5-LOX) et traiter de manière plus efficace le cancer de la prostate. Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé plusieurs étapes :

- 1- La première étape : a permis de tester la fiabilité du programme **Surflex** par l'application de deux tests :
 - Test 1 : le calcul des valeurs du RMSD de 100 complexes protéines-ligands téléchargés aléatoirement de la PDB. Les résultats ont donné 88% valeurs inférieures à 2Å contre 12% supérieures à 2Å.
 - Test 2 : le calcul du coefficient de corrélation linéaire entre l'IC₅₀ et l'affinité calculée par Surflex de 62 inhibiteurs de la 5-LOX. L'estimation de régression linéaire a donné un coefficient « $r = 0,6058$ »

Ces différents tests nous apportent la preuve que le programme **Surflex** est hautement performant et de conclure qu'il peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions des inhibiteurs de la 5-LOX.

- 2- La deuxième étape : Cette étape consiste à comprendre les mécanismes d'interaction entre un ligand et son récepteur, en l'occurrence la 5-LOX et son inhibiteur. Le docking moléculaire avec **Surflex** nous a permis de constater que parmi les 62 inhibiteurs étudiés le composé 25 est le meilleur inhibiteur de la 5-LOX avec un IC₅₀ égale à 0.060 μM et un score égal à 4,27.
- 3- La troisième étape : Dans la perspective de développer de nouveaux inhibiteurs plus affins et plus sélectifs de la 5-LOX, nous nous sommes servis d'un des meilleurs inhibiteurs parmi les 62 étudiés, en prenant comme structure de départ l'inhibiteur 23 (**Tableau 5**) nous avons procédé à des substitutions sur sa structure de base. Nous avons introduit plusieurs groupements fonctionnels sur différentes positions, présentant la capacité d'établir des liaisons hydrogène ou sa stabilité avec le site actif tels que (les fonctions alcool (-OH), acide (-COOH), amine (-NH₂), alkyl (-CH₃ et -C₂H₅) et les halogènes (Cl, F et Br).

Les résultats des différentes substitutions montrent que 4 composés présentent des légères améliorations par rapport à la structure de base, au contraire le composé 5 présente une nette amélioration, notamment le score est passée de 4,27 à 5,92 pour ce composé.

Enfin, l'application de la règle de 5 de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME des 5 composés qui se présentent comme de nouveaux inhibiteurs théoriquement plus affines vis-à-vis de la 5-LOX. Pour l'avenir et comme perspectives, il conviendrait dans le prolongement de cette étude, de tester l'activité biologique des 5 inhibiteurs nouvellement proposés par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* pour confirmer les résultats théoriques réalisés *in silico*.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Les references bibliographiques

- [1]. Rajyalakshmi S. Gaddipati et col, Dual and selective lipid inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenase: a molecular docking study, *Med Chem Res* (2014) **23**: 3389–3402.
- [2]. Aurélien Grosdidier, Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives, 27 juin 2007 : 90.
- [3]. Chikhi Abdelouahab, Calculs et modélisations des des interactions peptide de formylase-substances antibactériennes à l'aide de technique « docking » (arrimage) moléculaire (2007) : 126.
- [4]. Helen M.Berman et col, The protein data bank, *nucléique acids research*, (2000), **28**: 235-242.
- [5]. Thomas Lengauer et col, Novel technologies for virtual Screening, *research focus*, (2004), **9**: 27-34.
- [6]. Ian J. Bruno et col, New software for searching the Cambridge Structural Database and visualizing crystal structures, *Structural Science*,(2002), **B58**: 389-397.
- [7].SURFLEX PLATFORM MANUAL Version 3.06, BioPharmics LLC (2015) 1- 8.
- [8]. Dieter Steinhilber et Bettina Hofmann, Recent Advances in the Search for Novel 5-Lipoxygenase Inhibitors, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, (2014), **114**: 70–77.
- [9]. Luca Zoia et col, Understanding the radical mechanism of lipoxygenases using 31P NMR spin trapping, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2011), **10**: 10-16.
- [10]. Caroline Charlier et Catherine Michaux, Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2003), **38**: 645-659.
- [11]. Chean Hui Ng et col, Synthesis and Docking Studies of 2,4,6-Trihydroxy-3-Geranyl acetophenone Analogs as Potential Lipoxygenase Inhibitor, *Molecules* (2014), **19**: 11645-11659.
- [12]. Takashi Matsumoto et col, Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase, *National Academy of Sciences* (1988), **85**: 26-30.
- [13]. Olof Radmark et col, 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity, *TRENDS in Biochemical Sciences*, (2007),**32**: 323-341.

- [14]. Carola. R. et Bengt S. Reversible calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5 –lipoxygenase, *Nati. Acad. Sci.* (1987), **84**: 7393-7397.
- [15]. D. Schamburg · D. Stephan (Eds.), *Enzyme Handbock (Class 1.13-1.97: Oxidoreductases)*, Springer-Verlag Berlin Haideiberg, 1994, **8**: 159-166.
- [16]. Jason Hemak · David Gale · Thomas G. Brock, Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme, *J Mol Model* (2002) **8**:102–112.
- [17]. Tove Hammarberg, Konda Veera Reddy, Bengt Persson et Olof Radmark, EICOSANOIDS AND OTHER BIOACTIVE LIPIDS IN CANCER, INFLAMMATION AND RADIATION INJURY 5, *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*, (2002), **507**: 117-121.
- [18]. Nathaniel C. Gilbert et col, The Structure of Human 5-Lipoxygenase, *Science*(2011) **331**: 217-219.
- [19]. V. R. Khayrullina et col, New Inhibitors of 5_Lipoxygenase Catalytic Activity Based on 2_(3_Methylphenyl)propionic Acid and 4_Substituted Morpholine Derivatives, *Biochemistry (Moscow)*,(2014), **79**: No. 4,376-384.
- [20]. P. Radmark, Novel inhibitors of leukotrienes (5-lipoxygenase), *Progress in inflammation research*, (1999), 1-22
- [21]. Olof Rådmark, Arachidonate 5-lipoxygenase, *Prostaglandins & other Lipid Mediators* (2002), **68-69**: 211–234.
- [22]. A. W. Ford-Hutchinson, M. Gresser, et R. N. Young, 5-LIPOXYGENASE, *Annu. Rev. Biochem.* (1994). **63**:383-417.
- [23]. Masato Noguchi*, Masashi Miyano 1, et Takashi Matsumoto, Physicochemical Characterization of ATP Binding to Human 5-Lipoxygenase, *Lipids*, (1996), **31**: no.4, 367-371.
- [24]. Damaris Hadel, Olof RadmartC, Bengt Samuelsson et Dieter Steinhilberl, Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Radiation Injury 4, *ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY*,(1999), **469**: 105-111.
- [25]. L'INSTITUT NATIONAL DU CANCER, Comprendre le cancer de la prostate (2005) 21, rue Leblanc, le Ponant B 75740 PARIS CEDEX 15.
- [26]. Andrew L. Hopkins and Colin R. Groom, The druggable genome, *NATURE*,(2002), **1**: 727-730.
- [27]. Le cancer de la prostate, Ligue suisse contre le cancer Effingerstrasse 40 case postale 8219 3001 BERN.

- [28]. Jagadananda Gosh et Charles E. Myers, Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1998), **95** : 13182-13187.
- [29]. Graham P. Pidgeon et col, Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival, *Cancer Metastasis Rev* (2007) **26**: 503-524.
- [30]. Jagadananda Ghosh and Charles E. Myers, Arachidonic Acid Stimulates Prostate Cancer Cell Growth: Critical Role of 5-Lipoxygenase, *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS* (1997), **235**: 418–423.
- [31]. Shima M. Elshazly & Dalia M. Abd El Motteleb & Noha N. Nassar, The selective 5-LOX inhibitor 11-keto- β -boswellic acid protects against myocardial ischemia reperfusion injury in rats: involvement of redox and inflammatory cascades, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2013) **386**:823–833.
- [32]. Xiaoxin Chen et col, Five-Lipoxygenase Pathway of Arachidonic Acid Metabolism in Carcinogenesis and Cancer Chemoprevention, *Current Cancer Drug Targets*, (2006), **6**: 613-622.
- [33]. Rosalina Wisastra et Frank J. Dekker, Inflammation, Cancer and Oxidative Lipoxygenase Activity are Intimately Linked, *Cancers* (2014), **6**: 1500-1521.
- [34]. René Sotelo, Juan Arriaga, Raed A. Azhar et Inderbir S. Gill, *Prostate Cancer A Patient's Guide*, Springer International Publishing Switzerland, (2015).
- [35]. Randy L. Bell* and Richard R. Harris, The Enzymology and Pharmacology of 5-Lipoxygenase and 5-Lipoxygenase Activating Protein, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, (1999), **17**: 91-109.
- [36]. Christian Feit et col, Hyperforin is a novel type of 5-lipoxygenase inhibitor with high efficacy in vivo, *Cell. Mol. Life Sci.* (2009) **66**: 2759–2771.
- [37]. Kausik Bishayee et Anisur Rahman Khuda-Bukhsh, 5-Lipoxygenase Antagonist therapy: a new approach towards targeted cancer chemotherapy, *Acta Biochim Biophys Sin* (2013), **45**: 709-719.
- [38]. P. Aparoy et col, Homology modeling of 5-lipoxygenase and hints for better inhibitor design, *J Comput Aided Mol Des* (2008) **22**: 611–619.
- [39]. B. K. SHARMA, P. PILANIA, & P. SINGH, Modeling of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitory activity of apoptosis-inducing agents potentially useful in prostate cancer chemotherapy: Derivatives of diarylpyrazole, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, (2009); **24(2)**: 607-615.

- [40]. Jeehee Suh et col, Synthesis and Biological Evaluation of N-aryl-4-aryl-1,3-Thiazole-2-Amine Derivatives as Direct 5-Lipoxygenase Inhibitors, *Chem Biol Drug Des* (2012), **80**: 90-99.
- [41]. Tae Chul Moon et col, The Effects of Isoimperatorin Isolated from *Angelicae dahuricae* on Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase in Mouse Bone Marrow-derived Mast Cells, *Arch Pharm Res*, (2008),**31(2)**: 210-215.
- [42]. T. Horizoe et col, Effects of ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor, on indices of early articular lesion in MRL/MpJ-lpr/lpr mice, *Inflamm. res.* (1999), **48**: 432-436.
- [43]. Karelina et col, Regulation of leukotriene and 5oxoETE synthesis and the effect of 5-lipoxygenase inhibitors: a mathematical modeling approach, *BMC Systems Biology* 2012, **6**:141-154.
- [44]. Richard Morphy, Corinne Kay and Zoran Rankovic, From magic bullets to designed multiple ligands, *DDT*, (2004), **9 (15)**: 641-651.
- [45]. Hansch. C. and T. Fujita, r-s-pAnalysis; method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 1964. 86(8): p.1616- 26.
- [46]. Christopher A. Lipinski and all, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings *Advanced Drug Delivery Reviews* (1997) **23**: 3-25.

ANNEXES

Annexe 01 : La liste des complexes protéines-ligands utilisés pour la calcul du RMSD :

1JNQ, 1N8Q, 1OCE, 1P0M, 1P0P, 1UT6, 1XLU, 1XLV, 1XLW, 2JEZ, 2JEY, 2WHR, 2WID, 2WIG, 2WIJ, 2WIK, 2XMD, 3BDL, 3DJY, 3DKK, 3LN1, 3Q7D, 3RR3, 3V99, 3WV2, 4AXB, 4B0O, 4BDS, 4BZD, 4BYI, 4D1X, 4D1Z, 4FM5, 4KD1, 4LYN, 4M10, 4OTJ, 4OTY, 4PH9, 4RH2, 4RJ3, 4RSO, 4RVK, 4RVL, 4RVM, 4XWZ, 4YHT, 4YU1, 4YX4, 4YXI, 4YYT, 4ZOL, 4ZI3, 4ZWI, 4ZWX, 4ZWY, 4ZWZ, 4ZXO, 5BNL, 5BYI, 5CLU, 5CYI, 5D0R, 5D1J, 5E28, 5E58, 5E2K, 5E2R, 5E2S, 5EAB, 5EAC, 5EAD, 5EAE, 5EAG, 5EAF, 5EAH, 5ETW, 5EH5, 5F1A, 5F19, 5FKJ, 5FUP, 5FV3, 5FXV, 5FXX, 5FXZ, 5FY0, 5FY7, 5FY8, 5FYH, 5FYI, 5FYM, 5FYT, 5HDV, 5HDU, 5HDZ, 5HE4, 5HE5, 5HE7, 5HX8.

Annexe 02 : les différentes substitutions utilisées pour l'amélioration du meilleur inhibiteur obtenu :

N° des composés	Les différentes substitutions				Score obtenue
	C4 (Cycle A)	C6 (Cycle A)	C3 (Cycle B)	C4 (Cycle C)	
01	OH	/	/	/	3,94
02	OH	/	CH ₂ -HSO ₂	/	3,53
03	OH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ HSO ₂	/	3,47
04	OH	CH ₂ -OH	CH ₂ HSO ₂	/	4,36
05	OH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ HSO ₂	/	2,78
06	OH	CH ₃	CH ₂ HSO ₂	/	4,75
07	CH ₂ -OH	CH ₃	CH ₂ HSO ₂	/	4,29
08	CH ₂ -OH	CH ₂ -COOH	CH ₂ HSO ₂	/	2,13
09	CH ₂ -OH	CH ₂ -OH	CH ₂ HSO ₂	/	2,30
10	CH ₂ -OH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ HSO ₂	/	2,61
11	CH ₂ -OH	CH ₂ -NH ₂	/	/	4,65
12	CH ₂ -OH	CH ₂ -OH	/	/	2,22
13	CH ₂ -OH	CH ₂ -HSO ₂	/	/	2,34

14	OH	CH ₂ -COOH	CH ₂ HSO ₂	/	3,07
15	COOH	/	/	/	3,01
16	COOH	CH ₂ -HSO ₂	/	/	2,35
17	COOH	CH ₂ -COOH	/	/	3,02
18	COOH	CH ₂ -OH	/	/	1,88
19	COOH	CH ₂ -NH ₂	/	/	2,10
20	COOH	CH ₃	/	/	3,34
21	COOH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -HSO ₂	/	1,70
22	COOH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -COOH	/	1,78
23	COOH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -OH	/	2,48
24	COOH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -NH ₂	/	2,31
25	COOH	CH ₂ -COOH	CH ₂ -HSO ₂	/	2,48
26	COOH	CH ₂ -COOH	CH ₂ -COOH	/	1,48
27	COOH	CH ₂ -COOH	CH ₂ -OH	/	3,58
28	COOH	CH ₂ -COOH	CH ₂ -NH ₂	/	2,39
29	COOH	CH ₂ -OH	CH ₂ -HSO ₂	/	1,53
30	COOH	CH ₂ -OH	CH ₂ -COOH	/	1,80
31	COOH	CH ₂ -OH	CH ₂ -OH	/	2,19
32	COOH	CH ₂ -OH	CH ₂ -NH ₂	/	2,53
33	COOH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -HSO ₂	/	1,88
34	COOH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -COOH	/	1,66
35	COOH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -OH	/	2,11
36	COOH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -NH ₂	/	2,31
37	COOH	/	CH ₂ -HSO ₂	/	2,25

38	COOH	/	CH ₂ -COOH	/	2,58
39	COOH	/	CH ₂ -OH	/	2,39
40	COOH	/	CH ₂ -NH ₂	/	2,74
41	COOH	CH ₃	CH ₂ -HSO ₂	/	3,61
42	COOH	CH ₃	CH ₂ -COOH	/	1,82
43	COOH	CH ₃	CH ₂ -OH	/	2,42
44	COOH	CH ₃	CH ₂ -NH ₂	/	2,84
45	NH ₂	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -HSO ₂	/	2,53
46	NH ₂	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -COOH	/	1,67
47	NH ₂	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -OH	/	2,55
48	NH ₂	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -NH ₂	/	3,16
49	NH ₂	CH ₂ -COOH	CH ₂ -HSO ₂	/	1,66
50	NH ₂	CH ₂ -COOH	CH ₂ -COOH	/	3,01
51	NH ₂	CH ₂ -COOH	CH ₂ -OH	/	2,69
52	NH ₂	CH ₂ -COOH	CH ₂ -NH ₂	/	2,84
53	NH ₂	CH ₂ -OH	CH ₂ -HSO ₂	/	2,60
54	NH ₂	CH ₂ -OH	CH ₂ -COOH	/	2,52
55	NH ₂	CH ₂ -OH	CH ₂ -OH	/	2,77
56	NH ₂	CH ₂ -OH	CH ₂ -NH ₂	/	3,52
57	NH ₂	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -HSO ₂	/	3,69
58	NH ₂	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -COOH	/	2,70
59	NH ₂	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -OH	/	4,64
60	NH ₂	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -NH ₂	/	4,09
61	NH ₂	CH ₃	CH ₂ -HSO ₂	/	3,30

62	NH ₂	CH ₃	CH ₂ -COOH	/	2,97
63	NH ₂	CH ₃	CH ₂ -OH	/	4,32
64	NH ₂	CH ₃	CH ₂ -NH ₂	/	2,85
65	NH ₂	/	CH ₂ -HSO ₂	/	3,05
66	NH ₂	/	CH ₂ -COOH	/	2,47
67	NH ₂	/	CH ₂ -OH	/	3,54
68	NH ₂	/	CH ₂ -NH ₂	/	3,78
69	NH ₂	/	CH ₂ -HSO ₂	/	3,28
70	NH ₂	/	CH ₂ -COOH	/	3,40
71	NH ₂	/	CH ₂ -OH	/	3,56
72	NH ₂	/	CH ₂ -NH ₂	/	2,80
73	NH ₂	/	CH ₃	/	4,17
74	NH ₂	/	/	/	3,96
75	OH	CH ₂ -COOH	/	/	1,92
76	OH	CH ₂ -OH	/	/	3,10
77	OH	CH ₂ -NH ₂	/	/	2,73
78	OH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -COOH	/	2,88
79	OH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -OH	/	3,50
80	OH	CH ₂ -HSO ₂	CH ₂ -NH ₂	/	2,47
81	OH	CH ₂ -COOH	CH ₂ -COOH	/	3,04
82	OH	CH ₂ -COOH	CH ₂ -OH	/	2,98
83	OH	CH ₂ -COOH	CH ₂ -NH ₂	/	2,53
84	OH	CH ₂ -OH	CH ₂ -COOH	/	2,79
85	OH	CH ₂ -OH	CH ₂ -OH	/	2,50

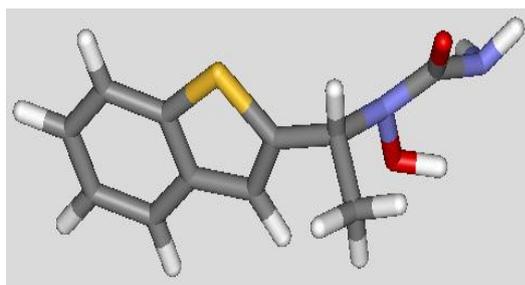
86	OH	CH ₂ -OH	CH ₂ -NH ₂	/	3,97
87	OH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -COOH	/	3,35
88	OH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -OH	/	3,07
89	OH	CH ₂ -NH ₂	CH ₂ -NH ₂	/	1,92
90	OH	CH ₃	CH ₂ -COOH	/	3,70
91	OH	CH ₃	CH ₂ -OH	/	2,72
92	OH	CH ₃	CH ₂ -NH ₂	/	4,02
93	OH	/	CH ₂ -COOH	/	3,87
94	OH	/	CH ₂ -OH	/	4,03
95	OH	/	CH ₂ -NH ₂	/	3,55
96	OH	/	CH ₃	/	3,76
97	OH	CH ₃	/	/	3,66
98	CH ₃	/	/	/	4,20
99	CH ₃	CH ₃	/	/	3,70
100	CH ₃	CH ₃	CH ₃	/	2,94
101	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	/	4,41
102	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃ 2 poses	3,24 4,77
103	CH ₃	CH ₃	CH ₃	di CH ₃	2,73
104	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅ 2 poses	2,71 3,73
105	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	di C ₂ H ₅	2,33
106	CH ₃	CH ₃	/	/	3,90
107	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	/	3,10

108	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃ 2 poses	3,54 3,10
109	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	di CH ₃	2,43
110	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅ 2 poses	1,81 2,96
111	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	di C ₂ H ₅	0,65
112	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	/	2,79
113	C ₂ H ₅	/	/	/	3,34
114	C ₂ H ₅	CH ₃	/	/	2,69
115	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	/	2,93
116	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃ 2 poses	3,78 2,71
117	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	di CH ₃	2,21
118	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	/	4,60
119	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	CH ₃ 2 poses	3,14 4,47
120	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	di CH ₃	2,15
121	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅ 2 poses	2,84 2,50
122	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	di C ₂ H ₅	1,20
123	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅ 2 poses	2,85 2,25
124	C ₂ H ₅	CH ₃	C ₂ H ₅	di C ₂ H ₅	1,02
125	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	/	/	1,92
126	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	/	2,82

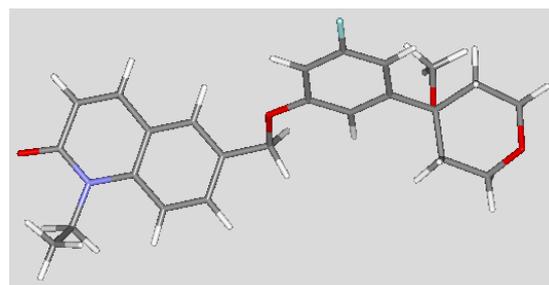
127	C_2H_5	C_2H_5	CH_3	CH_3 2 poses	3,10 2,73
128	C_2H_5	C_2H_5	CH_3	di CH_3	2,56
129	C_2H_5	C_2H_5	CH_3	C_2H_5 2 poses	3,54 2,71
130	C_2H_5	C_2H_5	CH_3	di C_2H_5	0,74
131	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	/	1,79
132	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	CH_3 2 poses	3,23 1,43
133	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	di CH_3	1,33
134	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5 2 poses	2,98 1,71
135	C_2H_5	C_2H_5	C_2H_5	di C_2H_5	0,90
136	CH_3	CH_3	CH_3	C_2H_5 2 poses	3,21 3,45
137	CH_3	CH_3	CH_3	di C_2H_5	2,04
138	CH_3	CH_3	C_2H_5	CH_3 2 poses	3,42 3,94
139	CH_3	CH_3	C_2H_5	di CH_3	2,52
140	CH_3	C_2H_5	CH_3	C_2H_5 2 poses	3,73 2,95
141	CH_3	C_2H_5	CH_3	di C_2H_5	1,55
142	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	CH_3 2 poses	4,02 3,73
143	CH_3	C_2H_5	C_2H_5	di CH_3	2,20

144	OH	CH ₃	CH ₂ -COOH C6(CO-NH ₂)	/	5,92
145	CH ₃ , C3(Br)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	4,92
146	CH ₃ , C3(Cl)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	4,28
147	CH ₃ , C3(F)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	2,87
148	CH ₃ , C3(I)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	2,63
149	CH ₃ , C3(SH)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	3,48
150	CH ₃ , C3(OH)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	3,18
151	CH ₃ , C3(CH ₃)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	3,47
152	CH ₃ , C3(C ₂ H ₅)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	3,34
153	CH ₃ , C3(phényl)	CH ₃	CH ₃	CH ₃	2,72

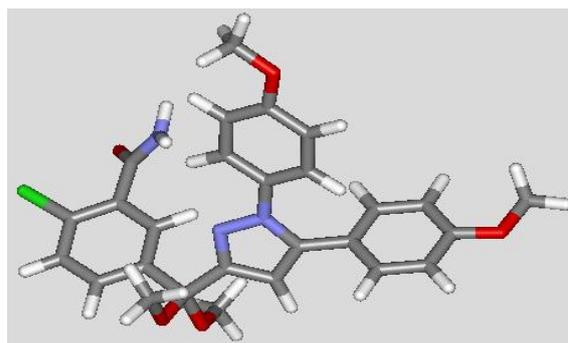
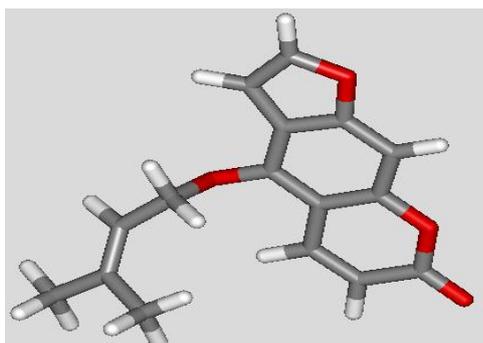
Annexe 3 :



(1)

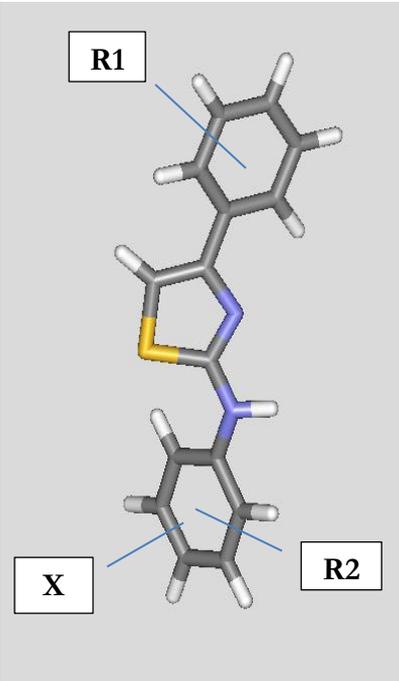
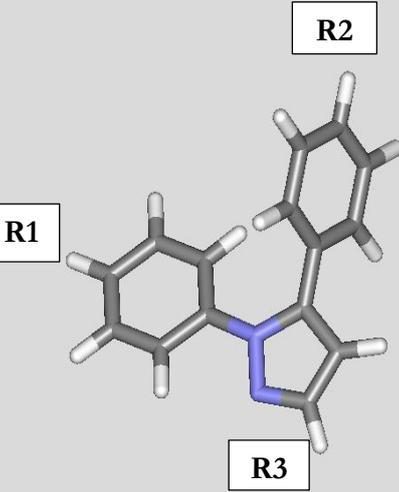
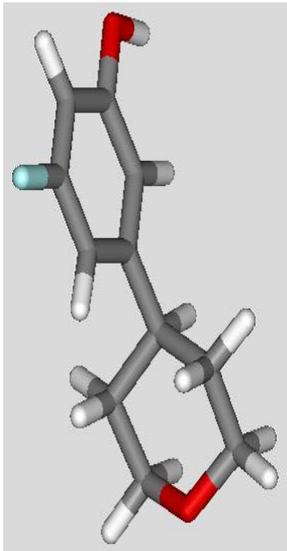


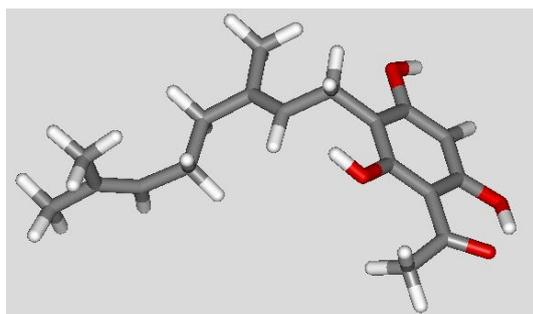
(2)



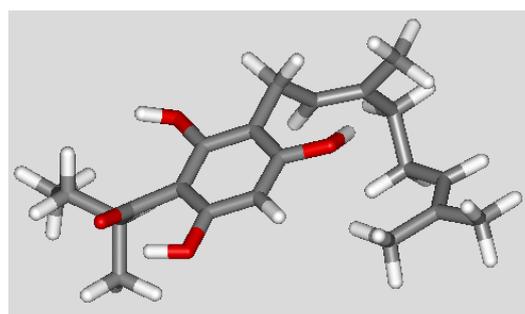
(3)

(4)

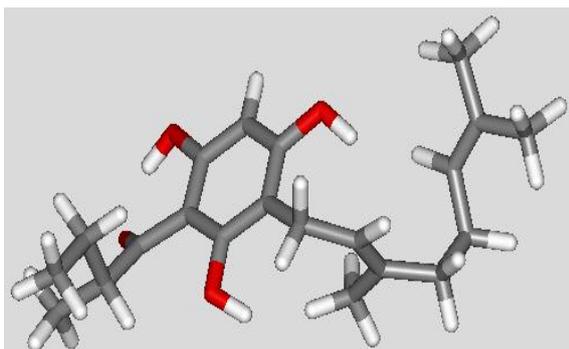
N°	Molécule de base	R1	R2	X	
05		H	4-OH	H	
06		4-F	4-OH	H	
07		4-Br	4-OH	H	
08		4-Cl	4-OH	H	
09		4-NO ₂	4-OH	H	
10		2-F	4-OH	H	
11		3-F	4-OH	H	
12		4-Cl	2-OH	H	
13		2,5-diCl	4-OH	H	
14		2,4-diF	4-OH	H	
15		4-Cl	4-OH	3,5-diCl	
16		4-Cl	4-OH	3,5-diCH ₃	
17		4-F	4-OH	3-Cl-5-CH ₃	
18		4-F	4-OH	3,5-diCl	
19		4-F	4-OH	3,5-diCH ₃	
20		4-F	4-OH	2,3,5-triCH ₃	
21		H	4-NH ₂	H	
22		4-F	4-NH ₂	H	
23		4-Br	4-NH ₂	H	
24		4-Cl	4-NH ₂	H	
25		4-NO ₂	4-NH ₂	H	
26		4-Cl	2-NH ₂	H	
27		2,5-diCl	4-NH ₂	H	
28		2,5-diF	4-NH ₂	H	
N°		Composé de base	R1	R2	R3
29			4-CH ₃ SO ₂	H	
30			H	H	
31			4-F	H	
32	4-Cl		H		
33	4-CH ₃		H		
34	4-CH ₃ O		H		
35	3-CF ₃ O		H		
36	4-NH ₂ SO ₂		H		
37	4,5-diCH ₃		H		
38	4,5-diCl		H		



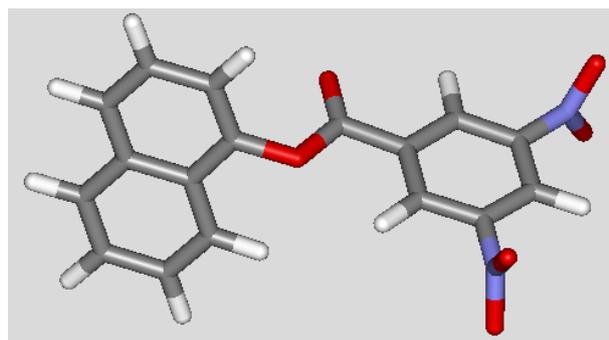
(39)



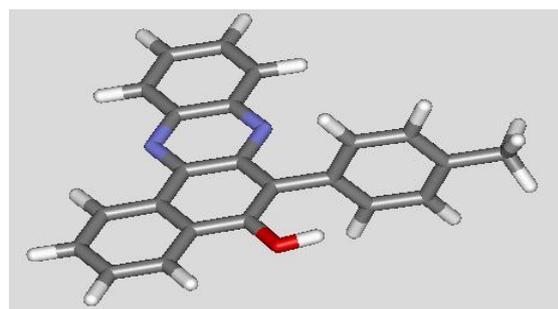
(40)



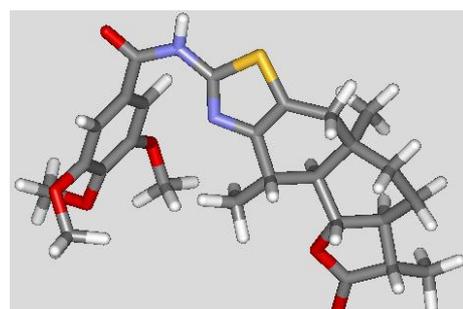
(41)



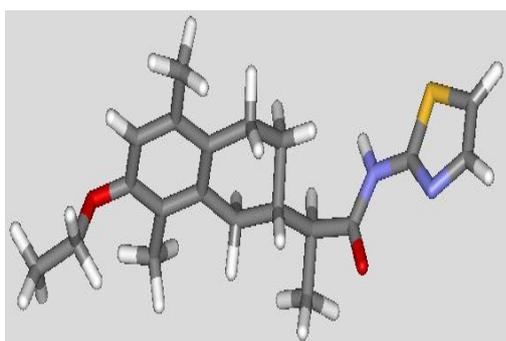
(42)



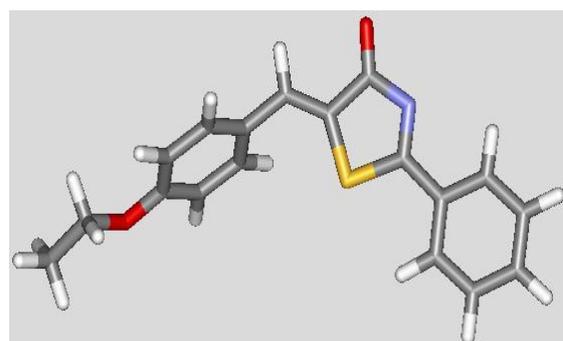
(43)



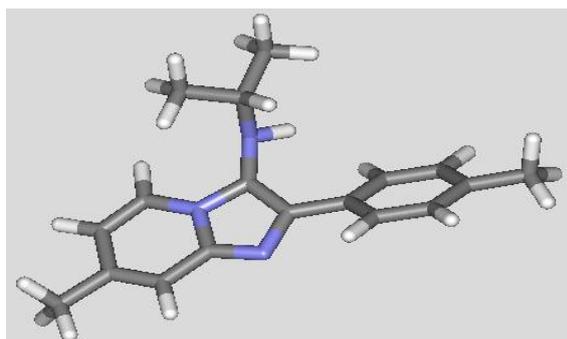
(44)



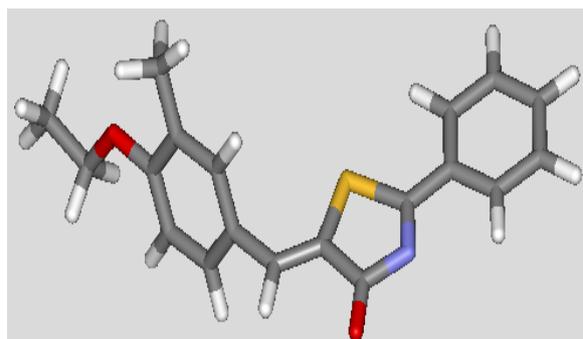
(45)



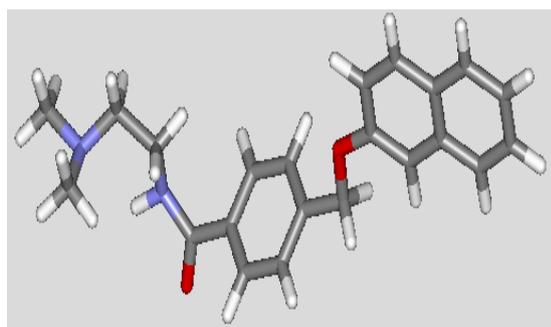
(46)



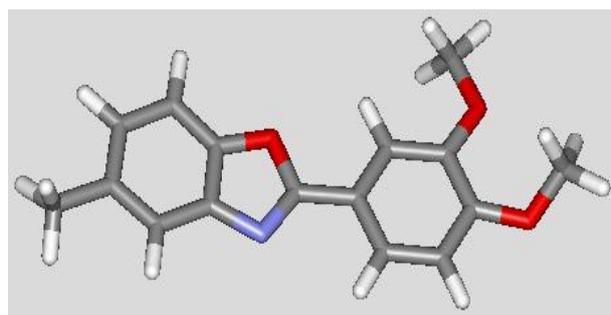
(47)



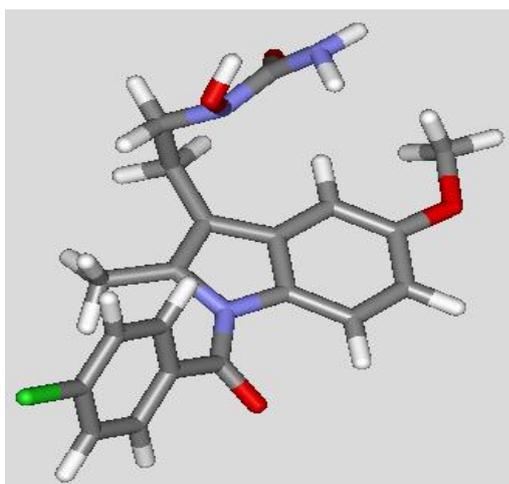
(48)



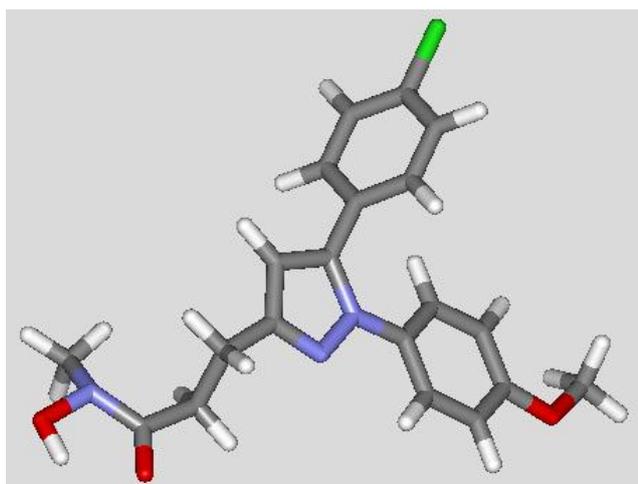
(49)



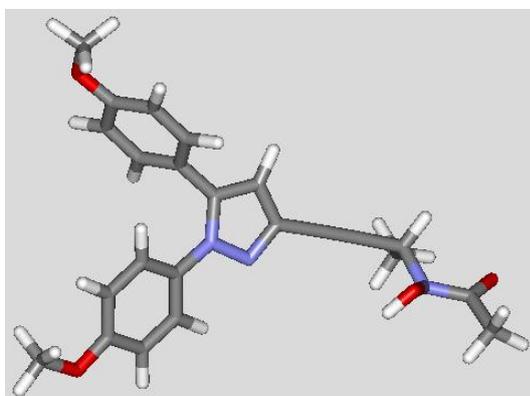
(50)



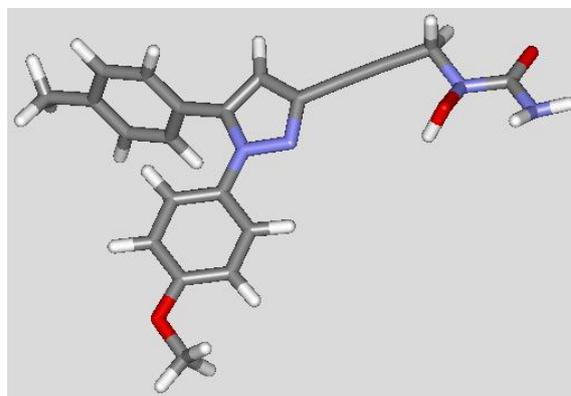
(51)



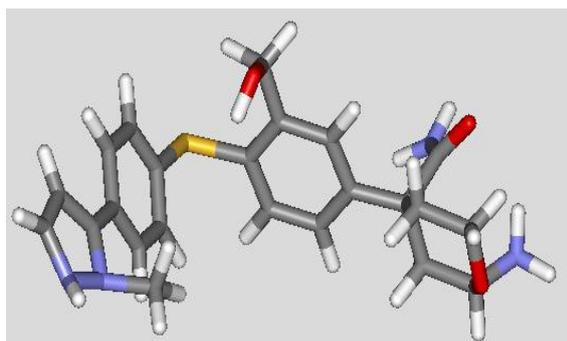
(52)



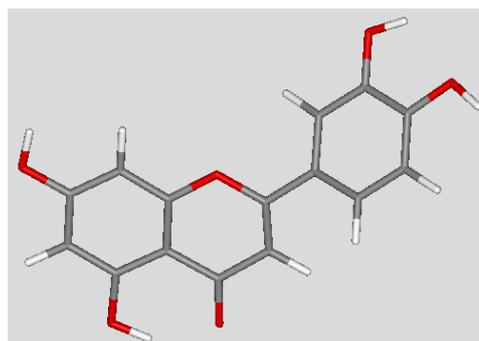
(53)



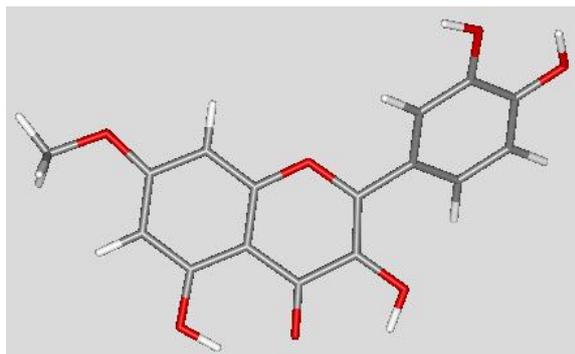
(54)



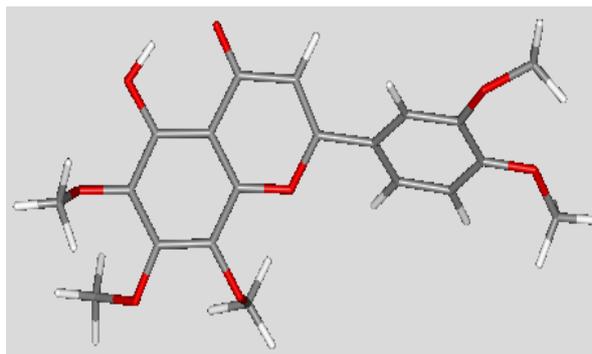
(55)



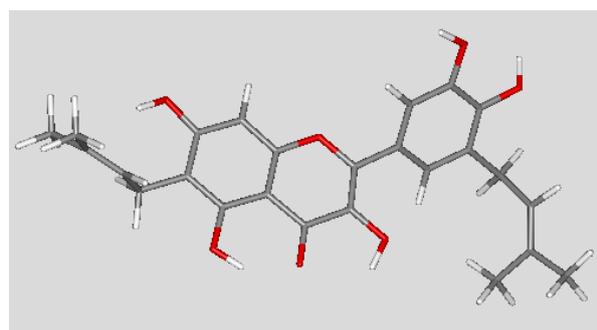
(56)



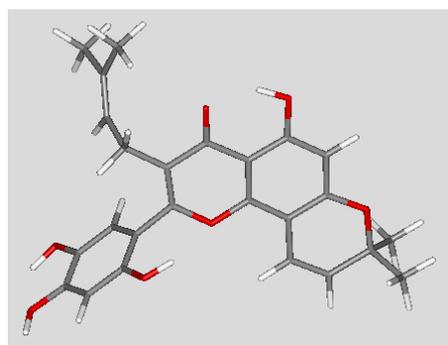
(57)



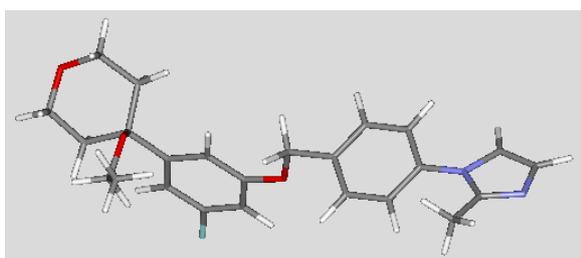
(58)



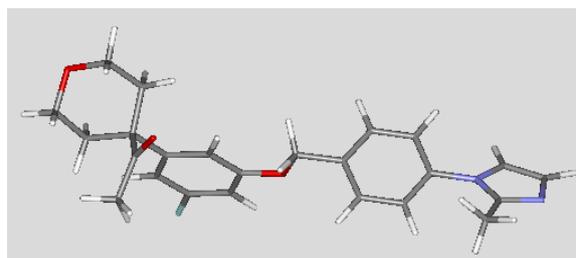
(59)



(60)



(61)



(62)

RÉSUMÉS

Résumé :

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

Le docking moléculaire est une nouvelle approche théorique qui permet d'étudier les interactions d'un ligand avec la protéine au niveau moléculaire.

Le programme *Surflex*, a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de l'enzyme 5-lipoxygénase.

Avec un coefficient de corrélation de (0.6058) et un bon pourcentage des valeurs du RMSD qui sont inférieures de 2 Å (88%) nous avons pu tester les performances du programme et dire qu'il est fiable.

Par poly-substitution (mono, di, tri et tétra-substitutions) d'un inhibiteur de base qui a un bon $IC_{50} = 0.060 \mu M$, nous avons pu améliorer son score d'affinité d'interaction de $4,27 M^{-1}$ jusqu'à $5,92 M^{-1}$, puis nous avons fait une analyse visuelle de ces interactions avec le site actif de l'enzyme grâce au programme **Viewerlite**. Enfin, l'application de la règle de **Lipinski** a permis de nous renseigner de manière positive sur les propriétés ADME de ce composé issu de tétra-substitution qui se présente comme un nouveau inhibiteur théoriquement plus affin et plus sélectif de la 5-LOX.

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

Mots clés : Surflex, 5-LOX, Docking moléculaire, Affinité d'interaction, inhibiteur, IC_{50} , Viwer, Lipinski.

ملخص :

في عملنا هذا ركزنا على تثبيط إنزيم 5-Lipoxygénase (5-LOX)، وهو إنزيم يشار كفيالحتعلمر ضسرطان البروستاتا .

الاتحاما للجزئي على الآلة هو نهجنظر يجديديسمحيدر اسةتفا علل ركاز معالبر وتينعلدالمستو بالجزئي .

في هذا العمل، معبر نامج « Surfex » الذي استخدمنا هعلد الحاسو بللتعر فعلا أقو بالمثبطات الجديدة لإنزيم 5-لو كس.

مع معاملات تباط خيطي قدر ب (0.6058) ونسبة جيدة من قيم RMSD التيتقلعن Å2 (88 %) قد تمكنا من اختبار أداء البرنامجو والقولأنهموثوق بنتائجه،ويمكناستخدامه للبحثعلمثبطاتجديدة .

بالقيام بإضافات مختلفة (أحادية، ثنائية، ثلاثية و رباعية) لوظائف كيميائية مختلفة على المثبطات الأساسية الذي لديه IC₅₀ جيدة تساوي 0.060 ميكرومولر، تمكنا من تحسين جاذبية تفاعلهم مع الإنزيم من 4.27 لتصل إلى 5.92، ثم قدمنا صوراً مرئية لكل هذا التفاعل مع الموقع النشط للإنزيم من خلال البرنامج « Viewerlite42 ».

وأخيراً، تطبيق قاعدة « LIPINSKI » سمح لنا أن نتعرف على

إيجابية الخصائص ADME للمركبات الناتجة من الإضافات المختلفة، هاتها الأخيرة نظرياً

نظر حنفسها كمثبطات جديدة أكثر جاذبية وأكثر انتقائية لإنزيم 5-LOX.

ومن ثم فإن تطبيق « Surfex » طريقة موثوقة يمكن أن تسهم بفعالية في تطوير مثبطات جديدة لإنزيم معين .

الكلمات المفتاحية: Surfex, 5-LOX, Docking moléculaire, Affinité d'interaction, inhibiteur, IC₅₀,

Viwer, Lipinski.

Abstract:

In our study, we focused on the inhibition of 5-lipoxygenase (5-LOX) as an enzyme involved in the disease of cancer of the prostate.

The molecular docking "*in silico*" is a new theoretical approach that allows studying the interaction of a ligand with the protein at the molecular level.

In this study, with the "Surflex" program, that we used to develop *insilico* new more potent inhibitors of the 5-lipoxygenase enzyme.

With a coefficient of correlation (0.6058) and a good percentage of the values of the RMSD that undercut 2Å (88%) we were able to test the performance of the program and say it is reliable and we can use this program for detecting the new inhibitors.

By poly-substitution (mono, di, tri and tetra-substitutions) of an inhibitor which has a good $IC_{50} = 0.060 \mu M$, we have been able to improve its score of affinity of interaction of 4.27 up to 5.92, and then we did a Visual analysis on these interactions with the active site of the enzyme through the "Viewerlite42" program. Finally, the application of the Lipinski rule allowed us to inform us in a positive way on ADME properties of the resulting compound of tetra-substitution which presents itself as a new inhibitor theoretically more affine and more selective 5 - LOX.

The *in silico* approach by Surflex is a reliable method that can contribute effectively to the development of novel inhibitors of a given enzyme.

Key words: Surflex, 5-LOX, Docking moléculaire, Affinité d'interaction, inhibiteur, IC_{50} , Viewer, Lipinski.

ETUDE DES MÉCANISMES D'INTERACTION DES INHIBITEURS DE LA 5-LOX

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en :
Biochimie moléculaire et santé (BMS)

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

Le docking moléculaire est une nouvelle approche théorique qui permet d'étudier les interactions d'un ligand avec la protéine au niveau moléculaire.

Le programme *Surflex*, a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de l'enzyme 5-lipoxygénase.

Avec un coefficient de corrélation de (0.6058) et un bon pourcentage des valeurs du RMSD qui sont inférieures de 2 Å (88%) nous avons pu tester les performances du programme et dire qu'il est fiable et on peut l'utiliser pour rechercher de nouveaux inhibiteurs.

Par de poly-substitution (mono, di, tri et tétra-substitutions) d'un inhibiteur de base qui a un bon $IC_{50} = 0.060 \mu M$, nous avons pu améliorer son score d'affinité d'interaction de $4,27 M^{-1}$ jusqu'à $5,92 M^{-1}$, puis nous avons fait une analyse visuelle de ces interactions avec le site actif de l'enzyme grâce au programme *Viewerlite*. Enfin, l'application de la règle de **Lipinski** a permis de nous renseigner de manière positive sur les propriétés ADME de ce composé issu de tétra-substitution qui se présente comme un nouveau inhibiteur théoriquement plus affin et plus sélectif de la 5-LOX.

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

Mots clés : 5-LOX, docking moléculaire, Inhibition, cancer de la prostate, Surflex

Laboratoire de recherche : Biologie appliquée et santé

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIKHI A. (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : BENSEGUENI A. (Professeur - UFM Constantine).

Examineur : MOKRANI E.H. (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 05/06/2016

