

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur  
Université 8 mai 1945 Guelma

Faculté des Mathématiques et de l'Informatique et des Sciences de la Matière  
Département des Sciences de la Matière

Mémoire de fin d'études  
Master



Spécialité : Chimie Physique

*Présenté par : KHADRAOUI Khadidja*

---

---

***ETUDE DES PROPRIETES  
STRUCTURALES ET ELECTRONIQUES  
DES MOLECULES MEDICAMENTEUSES.***

---

---

Sous la Direction de :

**Dr. LACHI Nadia  
Dr. CHERIET Mouna**

**juillet 2021**

## ∞ Remerciements ∞

*Avant tout, je remercie ALLAH, tout puissant, de m'avoir donné la force, la volonté et la patience pour achever ce travail.*

*Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Computationnelle et Nanostructures (LCCN), Faculté des Sciences Mathématiques et des Sciences de la matière, Université 8 Mai 1945, Guelma.*

*Je remercie sincèrement, mon encadreur, M<sup>me</sup> LACHI Nadia, de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce mémoire, orientée, conseillée et encouragée tout au long de la réalisation de ce travail.*

*J'exprime mes sincères gratitude à M<sup>me</sup> CHÉRIET Mouna, pour son aide à se familiariser avec le logiciel Gaussian, ses explications concernant les résultats, sa patience et sa disponibilité.*

*Toute ma gratitude et mes remerciements aux membres de jurys d'avoir acceptés d'examiner ce mémoire.*

*Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Khadija*

## ☞ DEDICACE ☞

*A tous ceux qui m'ont appris les lettres dans cette vie éphémère.  
Je dédie mon diplôme à ceux qui ont englouti la coupe vide pour  
me donner une goutte d'amour, à ceux qui ont récolté les épines  
de mon chemin pour m'ouvrir la voie à la connaissance*

*"Mon père et ma mère"*

*A ceux qui ont été mon soutien dans la vie :*

*"Asmaa", "Noura/Hudā", "Bouchra ", "Amira",*

*A mes beaux- frères*

*"Bilalī" ,"Bilal 2"*

*Au baume de mon âme et de ma vie, pour oublier mon âge et la  
source de mon bonheur, mon neveu*

*"chouaibe".*

*A ma sœur, que ma mère n'a pas mis au monde, et j'étais  
heureux avec elle*

*"Roumaïssa"*

*Un cadeau spécial à la personne la plus chère à mon cœur*

*"Mahdī".*

## SOMMAIRE

Remerciements  
Dédicace  
Liste des figures  
Liste des tableaux  
Liste des abréviations

### **Introduction** **1**

Références **3**

### **Partie I : Etude bibliographique**

#### **Synéphrine&Enzymes**

<b>1.</b>	La synéphrine	<b>4</b>
<b>1.2.</b>	Les propriétés de la synéphrine	<b>5</b>
<b>1.3.</b>	Bienfaits de la synéphrine pour la santé	<b>6</b>
<b>2.</b>	Généralités sur L' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase	<b>7</b>
<b>2.1.</b>	Alpha-amylase	<b>7</b>
<b>2.1.1.</b>	Définition	<b>7</b>
<b>2.1.2.</b>	Nomenclature	<b>7</b>
<b>2.1.3.</b>	Structure	<b>7</b>
<b>2.1.4.</b>	Différentes origines	<b>8</b>
<b>2.1.5.</b>	Mode d'action	<b>9</b>
<b>2.2.</b>	Les $\alpha$ -glucosidases	<b>10</b>
<b>2.3.</b>	Inhibition enzymatique	<b>10</b>
	Références	<b>12</b>

### **Partie I : Docking Moléculaire**

<b>1.</b>	Introduction	<b>14</b>
<b>2.</b>	Docking moléculaire	<b>14</b>
<b>3.</b>	Les outils du docking moléculaire	<b>15</b>

3.1.	Le récepteur	15
3.2.	Le(s) ligand(s)	16
3.3.	Le programme	16
4.	Les étapes du docking	17
4.1.	Recherche conformationnelle (searching)	17
4.2.	Le scoring	17
5.	Les algorithmes	18
5.1.	Algorithme Génétique Lamarkien (AGL)	19
6.	Fonction de score	19
6.1.	Fonctions de score basées sur les champs de force	20
6.2.	Fonctions de score empiriques	20
6.3.	Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based »	20
7.	Interaction protéine-ligand	20
	Références	23
<b>Partie II : Etude in silico</b>		
1.	Introduction	25
2.	Matériel et méthodes	25
2.1.	Logiciel	25
2.2.	Préparation des récepteurs	25
2.3.	Préparation des ligands	25
2.4.	Calcul des grilles de potentiel	25
3.	Résultats et discussion	26
<b>Conclusion</b>		33
	Annexe 1	
	Annexe 2	

## Liste des figures

<b>N</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Partie I : Synéphrine</b>		
<b>Figure 1</b>	structures chimiques du p-synéphrine, m-synéphrine et o- synéphrine.	<b>4</b>
<b>Figure 2</b>	l'orange amer (Citrus aurantium).	<b>5</b>
<b>Figure 3</b>	Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ - amylase.	<b>8</b>
<b>Figure 4</b>	Structure chimique de la molécule de l'acarbose.	<b>11</b>
<b>Docking Moléculaire</b>		
<b>Figure 1</b>	Principe générale d'un docking moléculaire	<b>15</b>
<b>Figure 2</b>	Interaction électrostatique	<b>21</b>
<b>Figure 3</b>	Les forces de Van Der Waals	<b>21</b>
<b>Figure 4</b>	La liaison hydrogène	<b>22</b>
<b>Figure 5</b>	Interactions hydrophobes	<b>22</b>
<b>Partie II : Résultats et discussions</b>		
<b>Figure 1</b>	Mode d'interaction 1SMD @ p-synéphrine.	<b>28</b>
<b>Figure 2</b>	Mode d'interaction 1SMD @ m-synéphrine.	<b>29</b>
<b>Figure 3</b>	Mode d'interaction 4UZU@ p-synéphrine.	<b>29</b>
<b>Figure 4</b>	Mode d'interaction 4UZU@ m-synéphrine.	<b>30</b>
<b>Figure 6</b>	Mode d'interaction 3TOP@ p-synéphrine	<b>30</b>
<b>Figure 7</b>	Mode d'interaction 3TOP@ m-synéphrine	<b>31</b>
<b>Figure 8</b>	Mode d'interaction 3W37@ p-synéphrine	<b>31</b>

	<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Tableau 1</b>	La boîte GRID BOX des enzymes.	<b>25</b>
<b>Tableau2</b>	Résultats de Docking moléculaire des ligands.	<b>27</b>

## Liste des abréviations

ADT: Auto dock Tools

ALA: Alanine

ARG: Arginine

ASP : Asparagine

HIS : Histidine

IUB-MB : Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire.

GLN: Glutamine

GLU : Acide Glutamique

ILE: Isoleucine

LEU: Leucine

LYS: Lysine

Tyr: Tyrosine

MMFF: Merck Molecular Force Field

PDB: Protein Data Bank

PHE: Phenylalanine

SER : Sérine

TRP : Tryptophane



## Introduction

De nos jours, le traitement par les plantes ou phytothérapie est reconnu pour sa facilité d'utilisation, son efficacité et son coût bas.

La recherche et l'identification des molécules bioactives d'origine végétale est l'un des axes de recherche de l'industrie pharmaceutique qui a tendance à se développer de plus en plus pour pallier à l'utilisation de substances synthétisées chimiquement qui ont, en général, des effets indésirables et dans certain cas présentent une efficacité insuffisante.

Les substances bioactifs végétales s'intègrent beaucoup mieux dans les processus de régulation physiologique de l'organisme humain. Elles constituent l'outil thérapeutique le mieux adapté pour une approche intégrative et régulatrice, de soutien de l'organisme dans sa réactivité adaptative principalement dans les désordres pathologiques dus aux déséquilibres métaboliques comme le diabète, hypercholestérolémie, Alzheimer [1].

L'un des objectifs thérapeutiques définis pour fournir une thérapie pour le diabète comprennent l'inhibition de certaines enzymes, qui peuvent hydrolyser les sucres polysaccharides et les transformer en mono sucres.

Les médicaments comme l'acarbose et le miglitol sont des inhibiteurs des enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase. L'inhibition diminue la quantité du glucose absorbée par l'intestin et aide à diminuer les concentrations du glucose postprandiales. Quelques problèmes d'intolérance gastro-intestinale sont considérés comme des effets indésirables de ces agents hypoglycémiantes et limitent considérablement leur utilisation [2].

Des chercheurs ont développé des inhibiteurs de ces enzymes dans le but de ralentir l'absorption des glucides dans l'intestin donc le glucose passe plus lentement dans le sang, réduisant ainsi l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie postprandiale [3].

La synéphrine est un dérivé de la phényléthylamine que l'on trouve dans les fruits de plusieurs arbres appelés citrus aurantium de la famille des rutacées, on la trouve également dans les agrumes. Elle est composante de nombreux compléments

alimentaires dit « minceur » et qu'il a un excellent effet inhibiteur sur l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glycosidase et peut être un inhibiteur sélectif de ces enzymes [4].

La para-synéphrine est le principal ingrédient actif de l'orange amère qui a une longue tradition dans la médecine chinoise sous le nom de « Zhi Shi » et qui est depuis peu largement étudié par les chercheurs.

L'objectif de cette étude consiste à étudier *in silico* les mécanismes d'inhibitions d' $\alpha$ -amylase et d' $\alpha$ -glycosidase par l'acarbose et les isomères para et méta synéphrines. En appuyant sur les résultats de simulation par docking moléculaire, nous envisageons de faire ressortir le meilleur inhibiteur et de proposer *in silico* de nouveaux inhibiteurs naturels à activités potentielles antidiabétique plus puissants envers la cible thérapeutique de cette pathologie, en l'occurrence, l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glycosidase.

Ce travail est structuré en deux parties :

- La première partie est consacrée à l'étude bibliographique portée sur :
  - utilisation de l'outil du docking moléculaire.
  - généralités sur les enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glucosidase.
  - présentation de la molécule synéphrine.
- la deuxième partie intitulée « étude *in silico* » présente :
  - matériels et méthodes utilisés dans ce travail.
  - résultats obtenus et leurs discussions.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

## Références

- [1] : Lapraz, J.C ; Duraffourd, C.2002.Traité de PhytothérapieClinique. Editions : Masson. Paris. 864 p.
- [2] : Krentz, A.J; Bailey, C.J. Oral Antidiabetic Agents. *Drugs*. 2005. (65). 385–411.
- [3] : Chiasson, J.L ; Rabasa-Lhoret,R. Inhibiteurs de l'alpha glucosidases. *Médecine thérapeutique / Endocrinologie*. 2. (2000). (3). 198-204.
- [4] : Taslimi, P ; Akincioğlu, H ; Gülçin, I. Synéprine and phenylephrine act as  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glycosidase, acétylcholinestérase, butyrylcholinesterase, and carbonic anhydrase enzymes inhibitors .*J. BiochemMol Toxicol*. 2017. e21973.

***Partie I :***

***Etude bibliographique***

▪ ***Synéphrine***

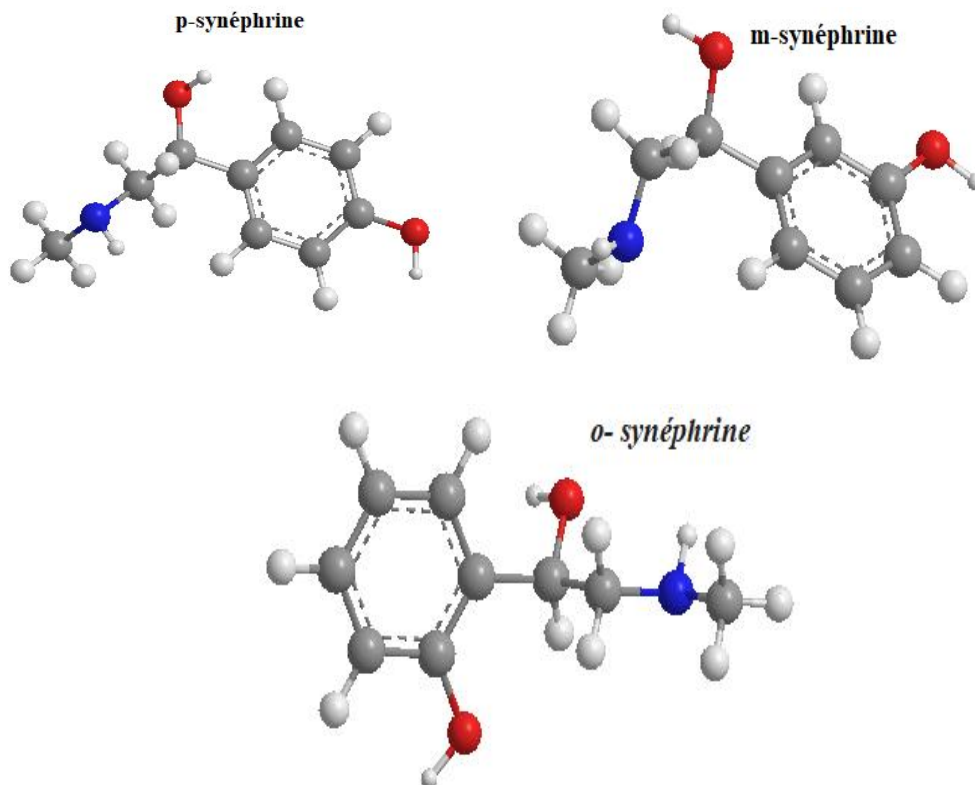
▪ ***Enzymes***

▪ ***Docking Moléculaire***

## 1. La synéphrine

La synéphrine (4- [1-hydroxy-2- (méthylamino) éthyl] phénol) est un dérivé de la phényléthylamine présent dans les fruits de plusieurs arbres de la famille des Rutacées tels que l'orange amère (*Citrus aurantium*), l'orange de Séville, l'orange aigre, Green Orange, ZhiShi et Kijitsu. De plus, ce phytochimique peut être trouvé dans de nombreuses autres espèces d'agrumes telles que les mandarines Nova et les oranges douces de Marr [1].

La synéphrine est un agoniste adrénergique non spécifique, qui peut exister sous forme de trois isomères de position : ortho, para et méta (**figure.1**) [2].



**Figure .1** : Structures chimiques du *p*-synéphrine, *m*-synéphrine et *o*- synéphrine.

L'isoforme para-synéphrine (ou anciennement Sympatol et Oxédrine) est le principal ingrédient actif du *Citrus aurantium*, communément appelé **orange amère** et qui a une longue tradition dans la médecine chinoise sous le nom de « Zhi Shi » et qui est

depuis peu largement étudié par les chercheurs. Elle est une composante de nombreux compléments alimentaires dit « minceur ».



**Figure.2 : l'orange amer (*Citrus aurantium*).**

Seule la peau d'orange amère a une valeur médicinale avérée, principalement pour les problèmes digestifs et certains autres problèmes de santé. La peau contient des flavones, des alcaloïdes de la synéphrine, de l'octopamine, de la N-méthyltyramine et des caroténoïdes.

L'isoforme o-synéphrine n'a pas d'effet pharmacologique chez l'homme et n'a pas été retrouvée dans les compléments alimentaires.

La *m*-synéphrine, également appelée phényléphrine, est considérée comme l'agoniste adrénergique de la synéphrine le plus puissant des récepteurs  $\alpha$ -1 adrénergiques, par rapport aux autres isomères de position [3,4].

### **1.1. Les propriétés de la synéphrine**

C'est un produit chimique naturel et structurellement similaire aux catécholamines (adrénaline et noradrénaline), qui sont les composés qui provoquent la dégradation des cellules adipeuses. La synéphrine est un stimulant du système nerveux central, dont les effets sont très similaires à ceux de l'éphédrine, mais avec des effets moins nocifs.

La synéphrine de l'extrait de *Citrus Aurantium* provoque la libération d'adrénaline et de noradrénaline à partir des dépôts cellulaires qui à leur tour activent les récepteurs

bêta 3 qui sont directement responsables de la lipolyse, c'est-à-dire la combustion des acides gras à l'intérieur des cellules adipeuses.

En particulier, le système adrénérgique, ou sympathomimétique aminé, possède plusieurs types de récepteurs qui sont répartis dans tout l'organisme et dans divers tissus, il est courant d'en trouver un qui prédomine sur les autres :

- Le **récepteur alpha 1** provoque une vasoconstriction des artères en augmentant la pression sanguine. Les récepteurs Alpha 2 agissent sur la pression en déterminant la vasoconstriction du microcircuit périphérique et en inhibant la lipolyse, et leur stimulation peut entraîner une hypertension.
- Les **bêta 1 et 2** sont distribués dans le cœur et le système respiratoire et contrôlent la broncho dilatation et la dilatation du vaisseau myocardique ainsi que la musculature du squelette, leur excitation excessive peut entraîner des problèmes.
- Les récepteurs **beta 3** (où la synéphrine agit) augmentent sélectivement la libération d'acides gras et de triglycérides du tissu adipeux, ce qui augmente la lipolyse et la thermogénèse et par conséquent la résistance

Par conséquent, la synéphrine extraite du Citrus Aurantium est un agent efficace pour accélérer l'élimination des graisses et favoriser la performance sans effets secondaires.

## 1.2. Bienfaits de la synéphrine pour la santé

### A. Remède naturel

En médecine populaire, elle est également utilisée pour le traitement des troubles gastro-intestinaux, de la nervosité et de l'insomnie, de la goutte et des maux de gorge, et même de l'obésité.

### B. Perte de graisse

Parmi les avantages à réduire le pourcentage de graisse, la synéphrine est liée à la réduction de l'appétit, augmentation d'énergie et du métabolisme, et possession de l'effet thermogénique.

## 2. Généralités sur l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase

Il existe plusieurs types d'enzymes intervenant dans le métabolisme des oses surtout celles agissant dans le catabolisme de ces derniers pendant la digestion. L' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase interviennent dans l'hydrolyse des glucides.

### 2.1. $\alpha$ -amylases

#### 2.1.1. Définition

L' $\alpha$ -amylase comme toutes les enzymes est une macromolécule appartenant à la classe des protéines globulaires [5]. Elle est une enzyme ubiquitaire, synthétisée chez tous les êtres vivants [6]. Elle appartient à la classe des hydrolases qui catalyse l'étape initiale d'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques dans l'amidon, le glycogène, et d'autres oligo et polysaccharides [7]. Les  $\alpha$ -amylases pouvant être divisées en deux catégories endomyases et exomyases. Les endomyases catalysent l'hydrolyse à l'intérieur de la molécule d'amidon d'une manière aléatoire. Cette action provoque la formation d'oligosaccharides linéaires et ramifiés de divers longueurs de chaîne. Les exomyases hydrolysent l'extrémité non réductrice, pour donner successivement des produits finaux plus courts [8]. Elle provoque la libération du glucose, du maltose et surtout d' $\alpha$ -dextrines.

#### 2.1.2. Nomenclature

Nom commun (Nomenclature IUBMB) :  $\alpha$ -amylase

- Nom systématique : 1,4- $\alpha$ -D-glucane,4-glucanohydrolase [6]
- Synonymes : glycogénase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A [5, 9,10].
- IUBMB N° (Nom codifié) : EC 3.2.1.1.

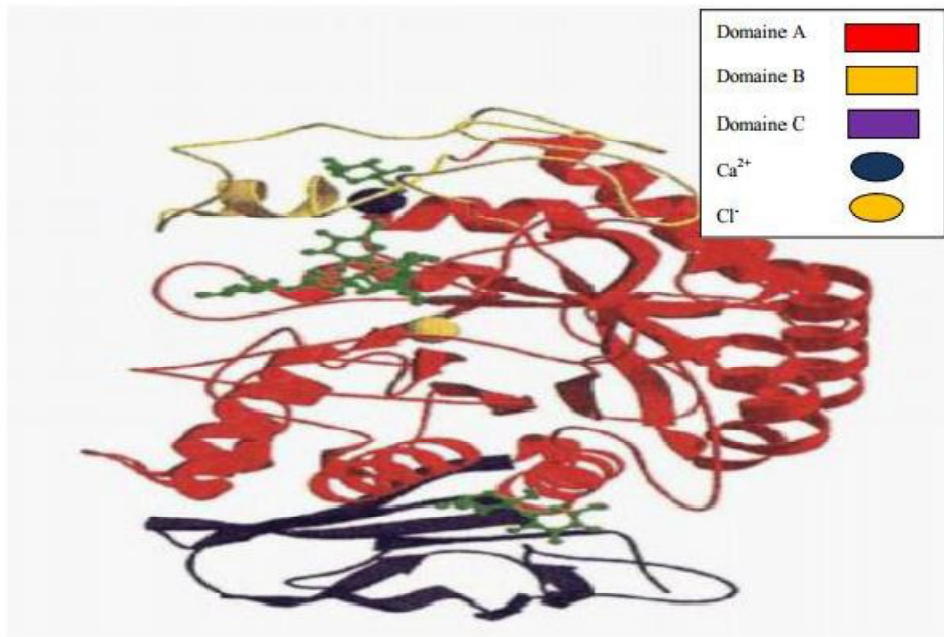
#### 2.1.3. Structure

Les  $\alpha$ -amylases sont des glycoprotéines renfermant 478 acides aminés forment huit feuillets  $\beta$  plissés et huit hélices  $\alpha$  [11,12] répartis en deux domaines globulaires appelés A (1-380 résidus) forme un tonneau ( $\beta/\alpha$ ) et B (381-478 résidus) forme une boucle à partir du milieu du domaine A. Ces domaines sont associés par une chaîne polypeptidique constituée principalement par des résidus hydrophobes. Il existe d'autre domaine C lié au domaine A par une chaîne polypeptidique simple et semble



être un domaine indépendant avec une fonction inconnue. Les résidus constituant le site de fixation du substrat, ainsi que ceux constituant le site catalytique sont localisés dans le domaine A, dont la partie glucidique est formée principalement, de D-mannose, D-glucose, D-galactose, D-xylose, et D-glucosamine.

Les  $\alpha$ -amylases sont des métallo enzymes à calcium (un ion calcium par molécule). Ces ions sont nécessaires à l'activité enzymatique et au maintien de la stabilité de la structure en acides aminés de l'enzyme [13].



**Figure.3 :** Structure tridimensionnelle de l' $\alpha$ - amylase.

### 2.1.4. Différentes origines

Les  $\alpha$ -amylases sont abondantes dans tous les règnes, elles ont été isolées par extraction à partir des tissus végétaux et animaux ou par fermentation par des cellules microbiennes [14,15].

## 2.1.5. Mode d'action

En général, les  $\alpha$ -amylases peuvent agir par différents modes d'action. Selon les conditions (température, pH, taille et structure du substrat), l'enzyme peut utiliser l'un ou l'autre mécanisme et même une combinaison entre plusieurs mécanismes.

- Attaque aléatoire : n'importe quelle liaison  $\alpha$ -(1-4) peut être hydrolysée à partir de l'extrémité réductrice. Elle provoque la formation de glucose, maltose et surtout du D-dextrine.
- Attaque préférée : l'  $\alpha$ -amylase montre une préférence pour certaines liaisons glucosidiques dans le substrat.
- Attaque multiple ou répétitive : elle implique le déplacement de l'enzyme tout au long de la chaîne du substrat et l'enzyme hydrolyse les liaisons glucosidiques sans se dissocier du substrat.
- Mécanisme uni-chaîne : l'enzyme dégrade une chaîne avant de passer à l'autre. Une fois que l'enzyme forme le complexe actif avec le premier substrat, elle catalyse la réaction et ne forme pas un autre complexe actif avec d'autres substrats jusqu'à l'achèvement de la dégradation de la première chaîne [19]. Mécanisme multi-chaîne : toutes les chaînes sont dégradées parallèlement [16-21].

## 2.2. Les $\alpha$ -glucosidases

Les glycosidases (glycoside hydrolases) sont des enzymes très répandues et impliquées dans un grand nombre de processus biologiques fondamentaux du métabolisme des sucres : la digestion des polysaccharides alimentaires dans la bouche et l'intestin grêle, la dégradation des polysaccharides au niveau du lysosome, ou encore la glycosylation des protéines au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi.

Les glycosidases catalysent la dégradation hydrolytique des polysaccharides en oligosaccharides et en hydrates de carbone monomères. De toutes les enzymes présentes dans la nature, ce sont les plus abondantes, les plus évoluées et comptent parmi les plus efficaces. Elles arrivent à augmenter jusqu'à  $10^{17}$  fois la vitesse de la réaction de coupure de la très stable liaison glycosidique C-O.

Selon la nomenclature établie par l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie

Moléculaire (IUBMB) est basée sur la spécificité de substrat, les glycosidases font partie de la famille EC 3.2.1., dans laquelle le chiffre 3 correspond aux hydrolases, le chiffre 2 aux glycosylases et le chiffre 1 aux O- et S-glycosidases.

Les glucosides hydrolases sont classifiés dans le groupe EC 3.2.1.x correspondant aux enzymes catalysant l'hydrolyse des liaisons O-ou S-glycosidiques. La rétention ou l'inversion de la configuration absolue du carbone anomérique au cours de l'hydrolyse permet de séparer les enzymes en fonction de leur mécanisme.

Les  $\alpha$ -glucosidases (EC 3.2.1.20,  $\alpha$ -D-glucoside glucohydrolase) sont définies comme des exo-glycosidases catalysant majoritairement l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques d'un substrat (comme chez les maltooligosaccharides ou le glycogène par exemple) pour libérer un  $\alpha$ -D-glucose [23].

### 2.3. Inhibition enzymatique

La régulation de l'activité enzymatique peut être assurée par des composés appelés effecteurs (activateurs ou inhibiteurs) qui agissent directement ou indirectement sur le site actif de l'enzyme.

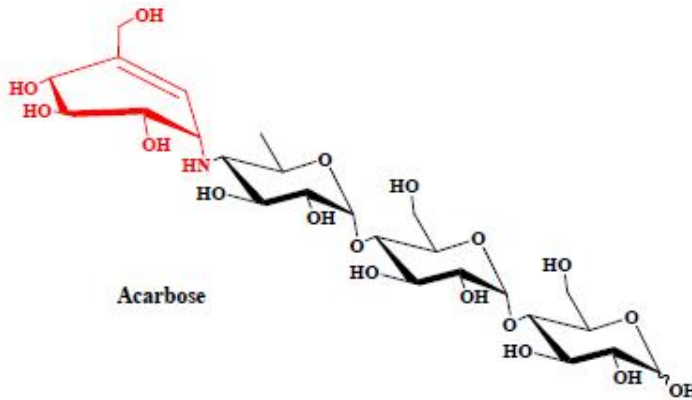
Les inhibiteurs sont généralement des molécules de structure voisine du substrat, qui ne donnent pas de réaction ou réagissent beaucoup plus lentement que le substrat. L'étude de l'effet d'inhibiteur est utilisée pour déterminer le mécanisme catalytique d'une réaction enzymatique, de mieux connaître la spécificité d'une enzyme ainsi qu'obtenir des données physiques et chimiques concernant le site actif de l'enzyme [22].

Les inhibiteurs d'enzymes peuvent être classés en deux types : inhibiteurs réversibles et inhibiteurs irréversibles.

Les inhibiteurs réversibles s'associent à l'enzyme de manière non covalente, alors que les inhibiteurs irréversibles forment des liaisons covalentes stables avec l'enzyme. L'effet net de l'inhibition correspond à une diminution de la concentration de l'enzyme active.

Parmi les nombreux médicaments antidiabétiques, l'acarbose (figure.4) est un inhibiteur puissant d'enzymes digestives : l' $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, la sucrase et la

maltase. Isolé dans les années 70 d'une souche bactérienne *Actinoplanes sp.* EE5042, l'acarbose est le plus largement utilisé pour le traitement du diabète type 2. commercialisé par la société Bayer sous le nom Glucor ou Glycobay.



**Figure.4 :** Structure chimique de la molécule de l'acarbose.

Ces dernières années, beaucoup d'efforts ont été faits pour identifier des inhibiteurs efficaces de ces enzymes à partir des ressources naturelles afin d'éviter les effets secondaires des agents antidiabétiques synthétiques administrés. Heureusement, divers polysaccharides naturels ont une activité antidiabétique et leur utilisation en complément des thérapies conventionnelles [24].

## Références

---

- [1]: Pellati, F ; Benvenuti, S.J ; *Chromatogr. A* 2007.1165, 58–66.
- [2]: Haaz,S; Fontaine,K.R; Cutter,G; Limdi,N; Perumean-Chaney, S; Allison. *Obes. Rev.* 2006.7, 79–88.
- [3]: Sidney J. S; Mohd.S; Sidhartha.D.R. p-Synephrine, ephedrine, p-octopamine and m-synephrine: Comparative mechanistic, physiological and pharmacological properties. *Phytotherapy Research.* 2020. 1–9.
- [4]: Haaz, S; Fontaine, KR ; Cutter, G; Limdi, N ; Perumean-Chaney, S; Allison, DB. Citrus aurantium and synephrine alkaloids in the treatment of overweight and obesity: an update. *Obes. Rev.* 2006, 7, 79–88.
- [5]: Nouadri, T. L'α-amylase de *Penicillium camemberti* PL21 : Production, Purification,Caractérisation et Immobilisation. Université Mentouri, Constantine. 2011. p 160.
- [6]: Merabti, R. Isolement et caractérisation de souches levuriennes amylolytiques à partir de solsaaharien algérien. Université Mentouri, Constantine. 2006. p 85.
- [7]: Kato, C; Goncalves, G; Peralta, R; Seixas, F; Sa-nakanishi, A; Bracht, L; Comar,J; Bracht, A. Inhibition of -Amylases by Condensed and Hydrolysable Tannins: Focus on Kinetics and Hypoglycemic Actions, Brazil. 2017. 12.
- [9]: Schomburg, D; Salzmann, M. - Enzyme Hand In Classe 3: Hydrolases. Edited by 4. Springer, Berlin Heidelberg. Germany.pp. 1991. 1-12.
- [10]: Dauter, Z; Dauter, M; Brzozowski, A.M; Christensen, S; Borchert, T.V; Beier, L; Wilson, K.S; Davies, G.J.J.B. 38(26): 1999.8385-8392.
- [11]: Chiba, S. Amyloglycosidase. In: Handbook of Amylases and related enzymes (The Amylase Research Society of Japan, éd.), Pergamum Press, Oxford, U.K:1988. 104-116.
- [12]: Burhan, A; Unaldi, N; Coral, G; Colak, O; Aygan, A; Gulnaz, O. Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic,alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp, Isolate ANT-6, *Process Biochemistry*, (38): 2003. 1397- 1403.
- [13]: Fogarty, W.M; Kelly, C.T. Amylase, amyloglucosidase and related glucanases. In Rose (A.H.) Ed. *Economic microbiology, microbial enzymes and bioconversion*, London: Academic Press.5: 1980. 115-170-268.
- [14]: Haq, I; Ahsraf, H; Labal, J; Qadeer, M.A. Production of -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, In: Behal ,A; Singh, J; Sharama, M.K; Pur P and Batra, N; Characterisation of Alkaline -Amylase from *Bacillus* sp AB 04. *International Journal of Agriculture & Biology*,08(1): 2003. 80-83.
- [15]: Srinivasa Rao, M; Reddy, G; Venkateswara Rao, G; Sambasiva Rao, K.R.S - Studies on the extraction and characterisation of thermostable -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology*, 4:2004. 289-291.

## Références

---

- [16]: Mazur, A.K; Nakatani, H. - Multiple attack mechanism in the porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase hydrolysis of amylose and amylopectine. Archives of Biochemistry and Biophysics, 306(1) :1993. 29-38.
- [17]: Nielson, J.E; Borchert, T.V; Vriend, G. - The determinant of  $\alpha$ -amylase pH-activity profiles. Protein Engineering. Oxford University Press, 14(7):2001.505-512.
- [18]: Scriban, R. Biotechnologie. 5ème édition. Techniques et Documentation – Lavoisier (éd.). p : 1999. 401-409.
- [19]: Berry, D; Paterson, A. - Enzymes in food industry. In Sucking C.J. Enzyme chemistry impact and application. Edition champman and hall, London. 1990. 306-351.
- [20]: Kandra, L; Gyemant, G; Farakas, E; Liptak; A. - Action pattern of porcine pancreatic amylase on three different series of beta-maltooligosaccharide glycoside. Carbohydrate Research, 289(3):1997. 237-242.
- [21]: Pazur, J.H; Marchetti, N.T. - Action patterns of amylolytic enzymes as determined by the [1-14C] mlto-oligo-saccharides mapping method. Carbohydrate Research, 227:1992. 215-225.
- [22]: Garrett, R. H; Grisham, C. M. Biochimie.2000. 1292.
- [23]: David, J. H; Hazel, P. Analytical biochemistry, 3ème Edition. Ed. Prentice Hall, Angleterre:1998. 336.
- [24]: Wu,J; Shi,S; Wang, H; Wang,S. Mechanisms underlying the effect of polysaccharides in the treatment of type 2 diabetes: A review. Carbohydrate Polymers . (144).2016.474-494.

***Partie I :***

***Docking Moléculaire***

### **1. Introduction**

La modélisation moléculaire est un terme générique qui regroupe différentes méthodes et techniques qui permettent de simuler et de comprendre le comportement d'un système chimique ou bien physique. Ces techniques dépendent essentiellement de la taille du système étudié. Ce dernier peut aller d'un simple atome vers des macromolécules biologiques de plusieurs dizaines de milliers d'atomes.

Elle sert à expliquer différents aspects des systèmes atomiques ou moléculaires entre leurs réactivités, comprendre les processus de repliement des protéines, expliquer l'importance de certains acides aminés d'un site catalytique enzymatique. Le docking moléculaire est une étape cruciale dans la connaissance des modes d'interactions entre ligands et macromolécules.

### **2. Docking moléculaire**

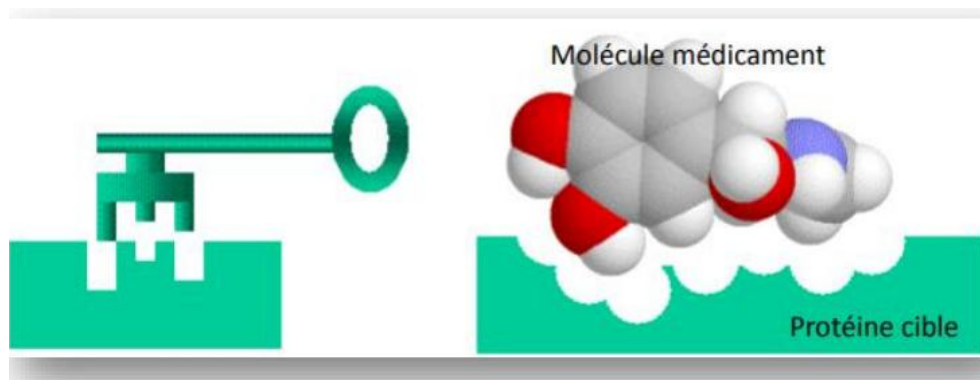
On désigne par Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) les simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand ».

[1].

Le ligand est généralement une molécule flexible étrangère de petite taille tandis que le récepteur est une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques.

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





**Figure.1** : Principe générale d'un docking moléculaire.

Le docking comprend essentiellement deux étapes :

1. le docking proprement dit qui est l'étape de sélection, qui consiste à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interaction les plus favorables. Cette étape peut bien être faite manuellement mais elle est exécutée souvent de manière automatisée à l'aide d'algorithmes de docking, ce qui améliore la vitesse et la précision des simulations.
2. le scoring : c'est l'étape de classement, qui consiste à l'évaluation de l'affinité entre le ligand et la protéine dans chacun des complexes sélectionnés, lors de l'étape du docking.

Les outils informatiques utilisés pour accomplir cette tâche sont nommés fonctions de score, en évaluant d'abord les différentes contributions énergétiques pour la stabilisation du complexe protéine@ligand, et en ordonnent par la suite ces complexes, permettant ainsi l'identification des modes d'interaction les plus probables.

### 3. Les outils du docking moléculaire

#### 3.1 Le récepteur

Le récepteur (cible) est le plus souvent une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques.

Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la PDB (« Protein Data Bank », la plus grande archive de données structurales de macromolécules biologiques, comme les protéines et les acides nucléiques (ARN et ADN). Cette banque de données a été établie en 1971 et contenait à l'époque sept structures [2]. En avril 2011, plus de 72300 structures 3D, dont environ 67000 structures de protéines sont disponibles et accessibles gratuitement. Elles ont été résolues pour la grande majorité par cristallographie aux rayons X (un peu plus de 63000

structures) du fait que cette technique présente de nombreux avantages, notamment celui de ne pas être limitée par la taille de la protéine.

La RMN fournit, quant à elle, plus de 8800 structures contre seulement 360 dans le cas de la microscopie électronique [3]. De nombreuses informations associées à chaque structure sont accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique via la PDB par un serveur internet (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

On peut y trouver la séquence correspondante, ses coordonnées atomiques, les conditions expérimentales (par exemple, la résolution), des images 3D...etc. Cette base de données est fiable car elle est vérifiée et maintenue par différents centres. Les coordonnées atomiques des structures se trouvent dans un format de référence, appelé *pdb*, lu par différents logiciels de visualisation, de modélisation, de criblage virtuel...etc.

### **3.2 Le(s) ligand(s)**

Le ligand est généralement une molécule flexible étrangère de petite taille.

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules [4].

A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné : La première souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de structures chimiques appelées chimiothèques ou espaces chimique [5].

Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (*pdb*, *mol*, *mol2*...etc.)

### **3.3 Le programme**

Le docking moléculaire a pour objectif essentielle de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable du ligand au sein de son récepteur. Initié au début des années 1980, ce domaine s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs [6,7].

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles [8].

Les plus fréquemment cités sont respectivement : AutoDock [9], GOLD [10], FlexX [11], DOCK [12].

### **4. Les étapes du docking**

Toutes les approches employant le docking moléculaire utilisent deux étapes indispensables et complémentaires.

#### **4.1. Recherche conformationnelle (searching)**

Consiste à rechercher les conformations du ligand aptes à établir des interactions idéales avec le récepteur par un algorithme de recherche. Elle doit parcourir au mieux l'espace conformationnel pour trouver l'énergie minimale globale. Les algorithmes de recherche de la flexibilité du ligand peuvent se classer en différentes approches :

##### **A. L'approche classique**

Regroupe les méthodes selon lesquelles un jeu de conformères est généré sans prendre en compte explicitement les acides aminés du site actif. Par contre, afin de miner l'intérieur de la protéine, la molécule à analyser est explorée dans certaines conditions physico-chimiques d'hydrophilie ou lipophilie.

Un autre élément à prendre en compte est le degré de flexibilité de la molécule étudiée. Plus celui-ci augmente, moins la recherche conformationnelle est exhaustive.

##### **B. L'approche rationnelle**

Utilise généralement une fonction de scoring qui guide chaque étape de la construction du ligand. Une autre limitation est l'adaptation des fonctions de scoring qui sont généralement prévues pour une molécule entière et non pas pour des fragments moléculaires [13].

#### **4.2. Le scoring**

Les résultats du docking consistent le plus souvent en différentes poses du ligand dans le site d'interaction, correspondant à plusieurs conformations favorables que le ligand peut adopter. Les méthodes de "scoring" permettent d'évaluer l'énergie de liaison du complexe formé et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra d'une part de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées, mais également de classer la meilleure pose de différents ligands pour identifier les meilleurs d'entre eux. En général, le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du

passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe [14].

### **5. Les algorithmes**

Les algorithmes de docking ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association récepteur-ligand les plus favorables [1].

Cependant, la recherche de la « pose optimale » du ligand au niveau de son récepteur est une des difficultés majeures en simulation *in silico* étant donné que le nombre de possibilités croît de manière exponentielle en fonction de la taille des composants. A titre d'exemple, pour reproduire la structure expérimentale d'un complexe protéine-ligand composés respectivement de 1562 et 449 atomes, en considérant ces derniers rigides, il faut un nombre d'essais de l'ordre de 107. En intégrant la flexibilité des molécules, le problème devient encore plus important [5].

L'utilisation des programmes de docking a conduit à de nombreux succès dans le domaine de la découverte de nouvelles molécules bioactives [15] ; néanmoins, leurs algorithmes sont toujours en maturation. Actuellement, il existe une panoplie d'algorithmes de docking qu'on peut répartir en deux grandes catégories selon la méthode utilisée :

- L'ajustement de fragments.
- Simulation par trajectoire.

#### ✓ **L'ajustement de fragments (matching)**

Cette méthode commence par construire un modèle «en négatif» du site actif dit *protomol* dans le cas du programme Surflex. Ce modèle est constitué par le volume accessible du site et les points d'interaction tels que les sites de liaison hydrogène, les charges ou les sites lipophiles.

Ces algorithmes sont dits aussi de fragmentation/ reconstruction car, dans un premier temps, la molécule est découpée en parties rigides et en liaisons flexibles. Par la suite, les parties rigides sont positionnées en premier et le ligand est reconstruit de proche en proche, explorant diverses conformations lors de la mise en place des liaisons flexibles [16]. Des logiciels tels que DOCK [12], Surflex[17] utilisent cette approche qui permet notamment un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés [18].

### ✓ **Simulation par trajectoire**

La seconde approche, par trajectoire, est plus précise : à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand considéré dans son entier explore le site étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Les mouvements sont effectués par des opérations de translation, de rotation et de changement de conformation et bien entendu, l'algorithme s'arrête lorsqu'il trouve la position idéale du ligand dans le récepteur [18].

Ces techniques sont plus lentes que celles par *matching* mais prennent mieux en compte la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes. Dans cette catégorie nous pouvons citer GLIDE, GOLD et AutoDock .

### **5.1. Algorithme Génétique Lamarkien (AGL)**

Les algorithmes génétiques (AG) reprennent des mécanismes et la terminologie de la génétique naturelle et de l'évolution biologique. L'organisation d'un ligand en complexe avec un récepteur peut être définie par un jeu de paramètres décrivant la position, l'orientation et la conformation du ligand par rapport au récepteur. Ces paramètres sont les chaque variable d'état correspond à un gène. La valeur de ces variables correspond au et les coordonnées atomiques associées correspondent au Chaque état défini du ligand correspond à [18].

## **6. Fonction de score**

La fonction de score fournit un mode permettant de classer le positionnement des ligands proportionnellement à un autre. Idéalement, le score devrait correspondre directement à l'affinité de liaison du ligand pour la protéine, de sorte que les ligands présentant le meilleur score soient les meilleurs liants. Les fonctions de scoring peuvent être empiriques [19].

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe.

Le principe thermodynamique est le suivant :

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}} \dots \dots \dots 1$$

### **6.1. Fonctions de score basées sur les champs de force**

Les fonctions de score basées sur un champ de force calculent, par mécanique moléculaire, l'énergie d'interaction du complexe récepteur-ligand (interactions intermoléculaires) et l'énergie interne du ligand. Les interactions entre récepteur et ligand comprennent souvent des termes de Van der Waals et électrostatiques. L'énergie interne du ligand est généralement écrite de manière similaire [20,21]. Les fonctions de score qui se basent sur les champs de force sont par exemple : Goldscore [22], DOCK [23] et Autodock [20, 24].

### **6.2. Fonctions de score empiriques**

Les fonctions empiriques de score estiment l'affinité des complexes protéine-ligand en additionnant des termes d'interaction (liaison hydrogène, interaction hydrophobe, interaction ionique ...). Elles sont utilisées dans la plupart des algorithmes d'amarrage.

### **6.3. Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based »**

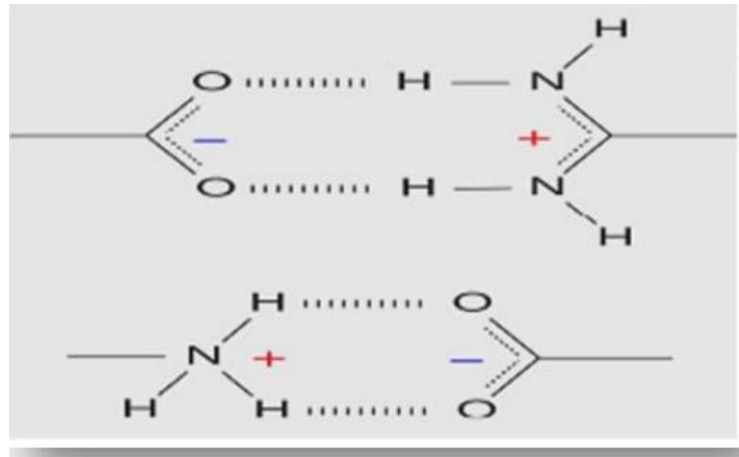
Ces fonctions de score sont construites à partir de règles fondées sur une analyse statistique des complexes protéine-ligand résolus expérimentalement. La fonction PMF (Potential of Mean Force) fait partie de cette classe de fonction [23].

## **7. Interaction protéine-ligand**

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles.

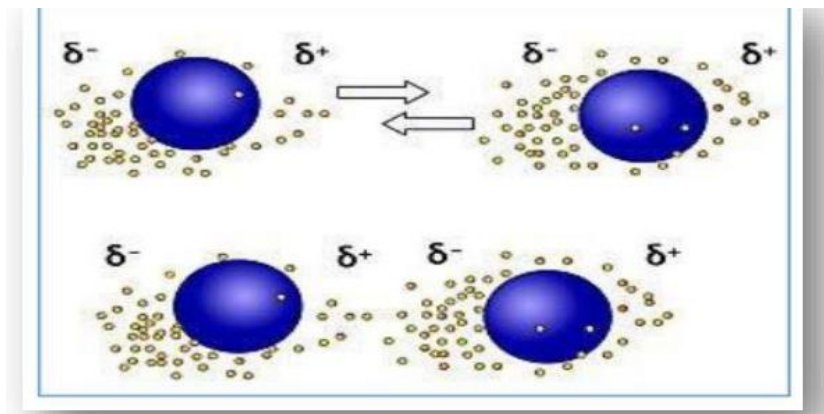
En effet, La capacité de la protéine à fixer sélectivement et avec une grande affinité son ligand repose sur la formation de différents types d'interactions non covalentes parmi lesquelles :

✓ Les interactions électrostatiques : liaisons ioniques résiduelles faibles, proviennent de l'interaction entre deux atomes de charges opposées conduisant à la création d'une force attractive.



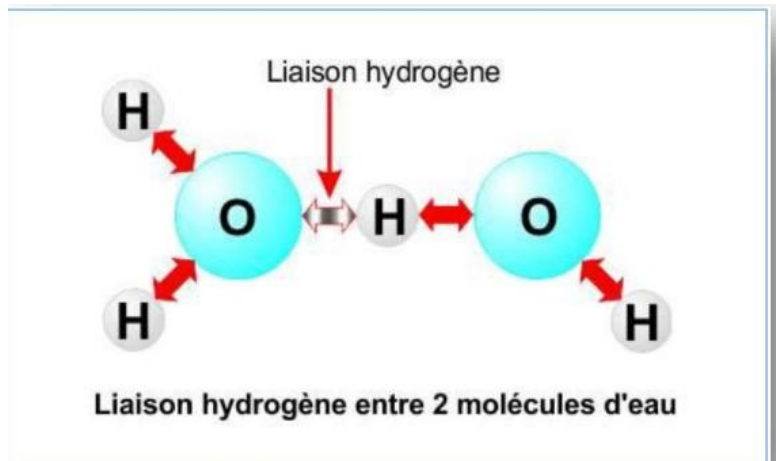
**Figure. 2 :** Interactions électrostatiques.

Les interactions de Van der Waals : forces électrique résiduelles faibles, résultent de l'interaction entre deux atomes, ou groupements d'atomes, adjacents neutres constituant des dipôles opposés et conduisant à la création d'une force attractive avec une distance de 3 à 4,5 Å approximativement.



**Figure .3 :** Les forces de Van Der Waals.

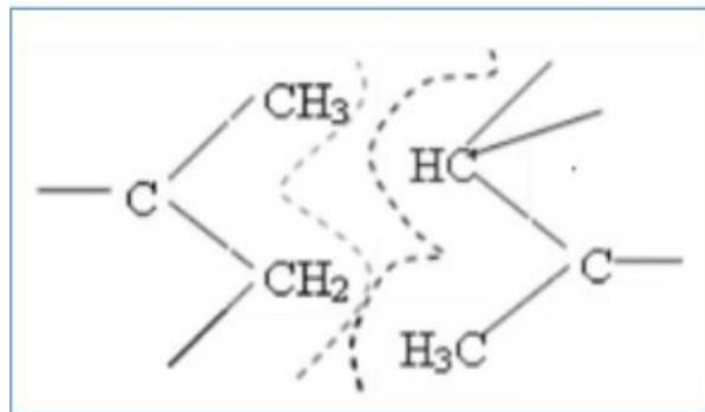
✓ Les liaisons hydrogène : découlent de l'interaction électrostatique entre un élément très électronégatif portant au moins un doublet non liant et un atome d'hydrogène. Ces interactions sont plus fortes que celles des forces de Van der Waals et elles se font sur une distance qui varie entre 2,2 et 4Å.



**Figure.4** : La liaison hydrogène.

Les interactions hydrophobes : sont des chaînes organiques saturées ou aromatiques non polaires ayant très peu d'affinité pour l'eau.

Ils ont tendance à se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'environnement aqueux.



**Figure.5** : Interactions hydrophobes.



## Références

---

- [1] : De Oliveira, E. B. Simulation moléculaire appliquée à l'acétylation de flavonoïdes catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la régiosélectivité de la bioconversion. Thèse de doctorat d'université : Procédés biotechnologiques et alimentaires. Nancy : Institut National Polytechnique de Lorraine. France. 2009. 187 p.
- [2] : Martin, L. Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif : une application sur la protéine kinase FAK. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique. Montpellier : Université Montpellier 2. France. 2006. 149 p.
- [3] <http://www.pdb.org/pdb/static.do?p>.
- [4] : Monge, A. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat d'université : Chimie Informatique et Théorique. Orléans : Université d'Orléans. France. 2006. 154 p.
- [5] : Renvez, G. Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking. Thèse de doctorat d'université : Nanophysique. Toulouse : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 2010. 163 p.
- [6] : Thiriote, E. Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. Thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. 2009. 291 p.
- [7] : Chikhi, A. Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase – Substances antibactériennes à l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat d'université : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2007. 90p.
- [8] Grosdidier, A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2007. 90 p.
- [9] Morris, G. M ; Goodsell, D. S; Halliday ,R. S; Huey, R; Lindstrom, W; Hart, W. E. et al. Journal of Computational Chemistry. 1998; 19: 1639-1662.
- [10]: Jones, G; Willett ,P; Glen, R. C; Leach, A. R; Taylor, R. Journal of Molecular Biology. 1997; 267: 727-48.
- [11]: Rarey, M; Kramer, B; Lengauer, T; Klebe, G. Journal of Molecular Biology. 1996; 201:470-489.
- [12]: Ewing, T. J; Makino, S; Skillman, A. G; Kuntz, I. D. DOCK 4.0: Journal of Computer-Aided molecular 2001; 15:411-428.

## Références

---

- [13]: Warren, G.L; Andrews, C.W; Capelli, A; Clarke, B; LaLonde, J; Lambert, M.H; Lindvall, M; Nevins, N; Semus, S.F; Senger, S.et al. *J. Med. Chem.* 49 : p 5912-5931. (2006).
- [14]: Kollman, P.A; Massova, I; Reyes, C; Kuhn, B; Huo, S; Chong, L; Lee, M; Lee, T; Duan, Y; Wang, W; Domini, O; Cieplak, P; Srinivasan, J; Case, D.A; Cheatham, T.E; *Chem. Res.* 33.12 (2000) : 889-897.
- [15]: Bravo, J. Development and Validation of Target-Based Drug Design Tools: Virtual Screening of Monoamine Oxidase Inhibitors. Thèse de doctorat d'université : Sciences pharmaceutiques. Genève : Université de Genève. Suisse. 2009. 215 p.
- [16]: Hazan, C. Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase beta par criblage virtuel et RMN. Thèse de doctorat d'université : Biologie structurale. Toulouse : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 2008. 258 p.
- [17]: Golbraikh, A; Tropsha, A. *Journal of Computer-Aided Molecular Design.* 2002; 16: 357-369.
- [18]: Fortuné, A. Techniques de Modélisation Moléculaire Appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance. Thèse de doctorat d'université : Sciences du médicament. Grenoble : université JOSEPH FOURIER - Grenoble I. France. 2006. 168 p.
- [19]: Friesner, R.A; Banks, J.L; Murphy, R.B; Halgren, T.A; Klicic, J.J; Mainz, D.T. et al. *J Med Chem.* 2004, 47, 1739-1749.
- [20]: Kitchen, D. B; Decornez, H; Furr, J. R; Bajorath, J.2004. *Drug discovery.* 3: 935-949.
- [21]: Bissantz, C ; Folkers, G ; Rognan, D. 2000. *Journal of medicinalchemistry.*43:4759-4767.
- [22]: Verdonk, M. L; Cole, C; Hartshorn, M. J; Murray, C. W; Taylor, R. D. 2003. *Proteins: Structure, Function, and Genetics.* 52: 609- 623.
- [23]: Ewing, T. J. A; Makino, S; Skillman, A. G;Kuntza, I. D. 2001. DOCK 4.0: *Journal ofComputer-Aided Molecular Design.* 15: 411-428.
- [24]: Rarey, M; Kramer, B; Lengauer, T; Klebe, G. 1996. *Journal of MolecularBiology.* 261: 470-489.

## ***Partie II : Etude In Silico***

- ***Matériels et Méthodes***
- ***Résultats et discussion***

***Partie II :***  
***Matériels et Méthodes***

### **1. Introduction**

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à appliquer la technique du docking moléculaire afin de prédire le mode d'inclusion et d'interaction de la synéphrine (para et méta) au sein de l'alfa amylase et l'alfa glucosidase d'une part et d'évaluer leurs affinité d'une autre part.

Aussi nous avons réalisés le docking moléculaire pour chaque récepteur avec l'acarbose connu comme un médicament qui a un fort pouvoir inhibiteur envers ces enzymes.

### **2. Matériels et méthodes**

#### **2.1. Logiciel**

Nous avons utilisé Auto Dock-vina [1], un logiciel d'amarrage moléculaire très répandu et connu par sa fiabilité et sont pouvoir de reproduire les ligands déjà complexés et utilisé dans le docking moléculaire.

Auto Dock Vina utilise un algorithme de recherche d'optimisation globale stochastique de type Iterated Local [2]. La fonction de scoring utilisée par Auto Dock Vina permet de faire la somme des contributions intramoléculaires et intermoléculaires du système d'une manière inspirée par le programme Xscore [3] qui utilise une fonction de score empirique. Elle combine ainsi les avantages des fonctions de score empiriques et knowledge-based [1].

#### **2.2. Préparation des récepteurs**

Il suffit de consulter la PDB (Protéine Data Bank) et d'inscrire le nom de la structure pour télécharger le fichier du récepteur au format pdb indispensable à l'opération de docking moléculaire.

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

Parmi les protéines proposées par la PDB, nous avons choisi les codes suivants :

- 1HNY, 1SMD, 4W93 et 4U4Z pour l' $\alpha$ -amylase.
- 3A4A, 3TOP, 3W37, 2ZE0 pour l' $\alpha$ -glucosidase.

Avant son utilisation par Vina, chaque enzyme est séparé de son ligand de Co-cristallisation afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre.

Il est ensuite préparé en éliminant les molécules d'eau et en définissant les charges partielles des atomes par l'intermédiaire du sous-programme Auto dock Tools (ADT) qui attribue des charges de type "Kollman" calculées avec le champ de forces empirique MMFF.

Il est aussi nécessaire de rajouter au récepteur les hydrogènes dits polaires c'est-à-dire « essentiels ».

Le fichier ainsi préparé est converti par Vina au format pdbqt qui correspond aux données des charges. Enfin, on intègre dans ce fichier les paramètres de solvation des atomes avant de l'enregistrer dans le format pdbqt (format propre à AutoDock).

### **2.3. Préparation des ligands**

Les ligands étudiés ont été téléchargés via la chimiothèque Pubchem puis optimisés avec la méthode DFT (B3LYP/6-31++(d,p)) implanté dans le logiciel Gaussian09 pour trouver les conformations les plus stables.

Les molécules ainsi obtenues sont enregistrées en format pdb. La phase finale de préparation du ligand est réalisée par l'ADT. Ce dernier a pour rôle de contrôler les mouvements du ligand, en définissant les atomes aromatiques, les liaisons flexibles et les angles de torsion. La molécule finale est enregistrée en format pdbqt avant son utilisation pour docking.

### **2.4. Calcul des grilles de potentiel**

Pour augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, le récepteur est plongé dans une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine étudiée et permettant la libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées X et Y et Z avec les dimensions  $\text{Å}^3$ . L'espacement ou la maille de la grille est fixé 3.375  $\text{Å}$ . La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés.

**Tableau 01** : La boîte GRID BOX des enzymes.

Receptor	Centre X (Å)	Centre Y (Å)	Centre Z (Å)	Délimitations (Å <sup>3</sup> )
<b><i>α</i>-amylase</b>				
<b>1HNY</b>	8.444	58.668	19.247	40x40x40
<b>1SMD</b>	8.903	38.125	6.260	40x40x40
<b>4UZU</b>	33.809	2.933	30.015	50x50x50
<b>4W93</b>	-11.95	3.634	-22.996	44x44x44
<b><i>α</i>-glucosidase</b>				
<b>3A4A</b>	21.544	-7.476	24.158	40x40x40
<b>3TOP</b>	-5.6	35.700	26.324	40x40x40
<b>3W37</b>	0.301	-2.798	-23.212	44x44x44
<b>2ZE0</b>	12.531	5.307	34.700	40x40x40

## Références

---

[1]-Stahl M., Rarey M. 'Detailed analysis of scoring functions for virtual screening'. J. Med. Chem. (2001), 44.p 1035.

[2]-Chang M.W., Ayeni C., Breuer S., Torbett B.E. 'Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina'. PLoS ONE, (2010),5. p11955.

[3]-Nocedal J., Wright S.J.. Quasi-Newton Methods. 'In Numerical Optimization. T. V. Mikosch, S. I. Resnick, S. M. Robinson (Ed.) '. (2006). [3] Seeliger, D ;de Groot, B. L. (2010). "Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina." Journal of computer-aided molecular design24 (5): 417- 422.



***Partie II:***  
***Résultats et discussions***

### 1. Docking

Les énergies de complexations ligands@récepteurs obtenues par docking moléculaire sont mentionnées dans le tableau.2.

D'après l'évaluation de l'affinité on remarque que :

- l'acarbose présente la meilleur affinité envers les deux classes d'enzyme avec une énergie d'interaction qui varie entre -7.6 et -9.2 Kcal/mol. Alors on peut constater qu'il a un effet inhibiteur fort.
- L'énergie d'interaction synéphrine@enzyme varie entre -6.0 et -7.4Kcal/mol avec le conformère m-synéphrine et entre -5.4 et -6.6 kcal/mol avec le conformère p-synéphrine respectivement. L'écart d'énergie de complexation de ces conformères est inférieur à 1kcal/mol.
- les résultats obtenus révèlent un taux d'inhibition de para plus faible que celui de méta.

**Tableau.2** : Résultats de Docking moléculaire des ligands.

		Affinité (Kcal/mol)		
		p-synéphrine	m-synéphrine	Acarbose
Ligand	Récepteur			
<b><math>\alpha</math>-amylase</b>	<b>1HNY</b>	-5.6	-6.1	-8.6
	<b>1SMD</b>	-5.9	-6.3	-7.6
	<b>4UZU</b>	-5.6	-6.3	-7.7
	<b>4W93</b>	-5.4	-6.0	-9.0
<b><math>\alpha</math>-glucosidase</b>	<b>3A4A</b>	-6.6	-6.9	-9.2
	<b>3TOP</b>	-6.6	-7.4	-8.6
	<b>3W37</b>	-6.2	-7.1	-8.6
	<b>2ZE0</b>	-5.8	-6.3	-8.4

Sur la base de l'affinité vis-à-vis aux récepteurs, on peut classer les ligands par ordre décroissant pour chaque enzyme : acarbose > m-synéphrine > p-synéphrine.

## Résultats et discussions

Cet ordre montre que l'acarbose est le meilleur inhibiteur de cette classe d'enzymes ce qui justifier son utilisation comme médicament anti diabète.

Les résultats du docking réalisés montrent que le complexe enzyme@acarbose est plus stable que le complexe enzyme@synéphrine.

Par comparaison des valeurs d'affinité, nous avons choisi pour chaque récepteur le complexe de forte interaction avec la synéphrine.

On constate que l'isomère m-synéphrine a une forte interaction avec les enzymes 1SMD et 4ZUZ pour l'alpha amylase et avec 3TOP et 3W37 pour l'alpha glucose respectivement.

### 2. Analyse visuelle

#### 2.1. Interaction ligand – alfa amylase

L'arrimage du complexe acarbose@ $\alpha$ -amylase a fourni les modes d'interaction illustrés dans l'annexe 2.

Les complexes sont stabilisés par plusieurs liaisons hydrogènes conventionnelles formées avec les résidus GLN 63, LYS200, HIS201et HIS305 de l'enzyme 1SMD et avec les résidus ARG1262, HIS236 de l'enzyme 4UZU (Voir Annexe.2).

Tandis que Les modes d'interaction qui régissent la formation du complexe synéphrine @ $\alpha$ -amylase sont de type :

- Hydrogènes,
- Hydrophobes,
- Et électrostatiques

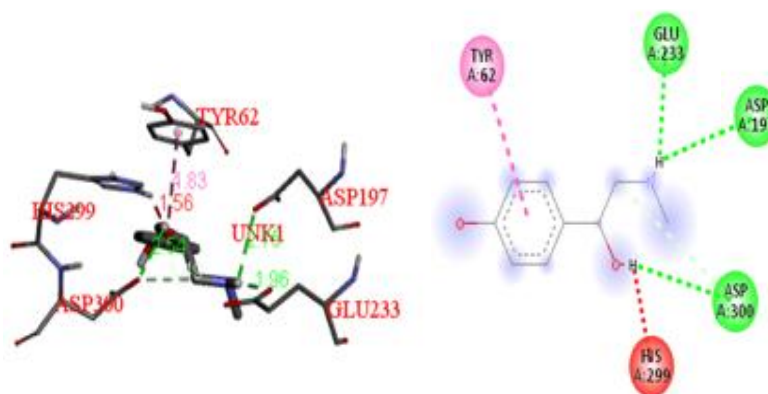
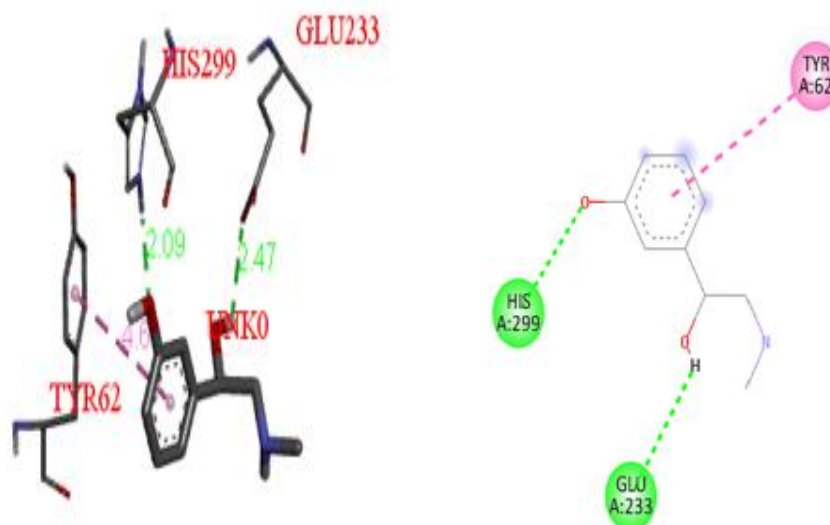
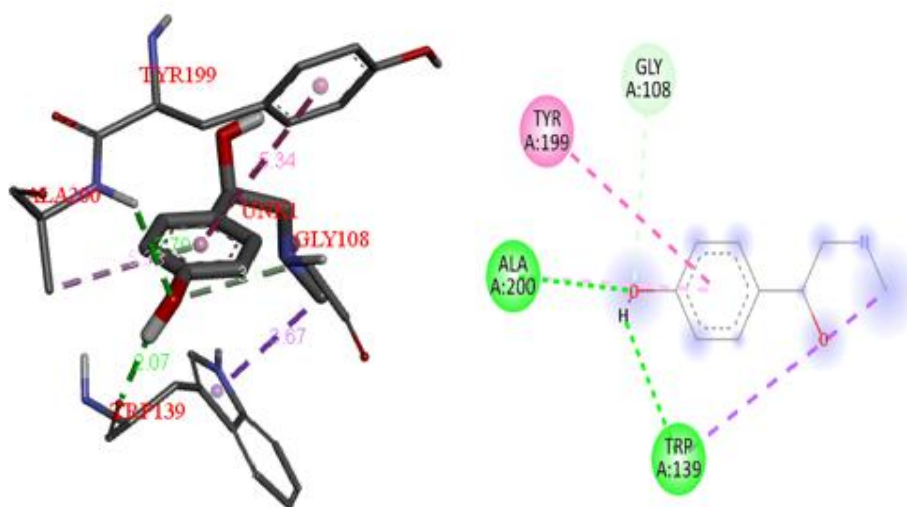


Figure.1 : Mode d'interaction 1SMD @ p-synéphrine.



**Figure.2 :** Mode d'interaction 1SMD @ m-synéphrine.

- Pour 4UZU les points de fixation sont : TYR199 (hydrophobe) pour p-synéphrine et ASP165 (électrostatique) pour m-synéphrine.



**Figure.3 :** Mode d'interaction 4UZU@ p-synéphrine.

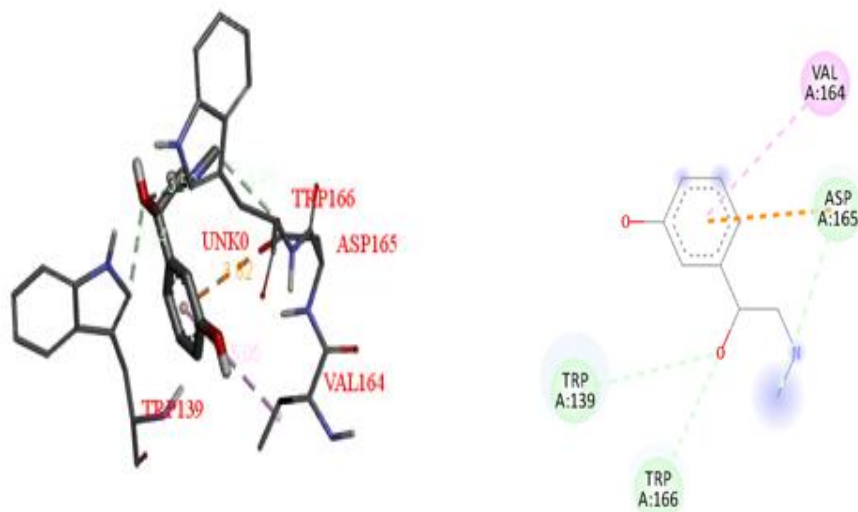


Figure.4 : Mode d'interaction 4UZU@m-synéphrine.

### 2.2. Interaction ligand @ $\alpha$ -glucosidases

L'étude de mode d'interaction du synéphrine (p et m-synéphrine) avec le site actif de différentes enzymes permet de montrer les interactions qui agissent sur la stabilité du complexe ligand-enzyme et par conséquent choisir 3TOP et 3W37. Les résultats sont mentionnés dans l'annexe.3.

- Pour 3TOP le point de fixation du p-synéphrine: LEU152 (hydrophobe), et m-synéphrine : PHE1559 (hydrophobe), ASP1420 (électrostatique).

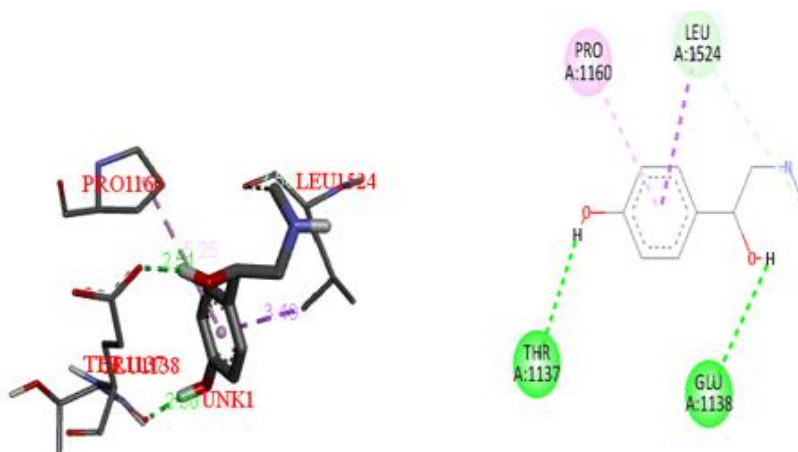
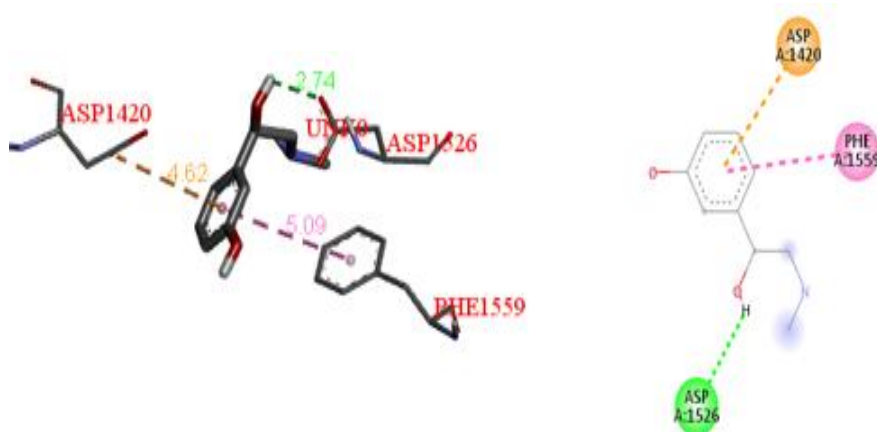
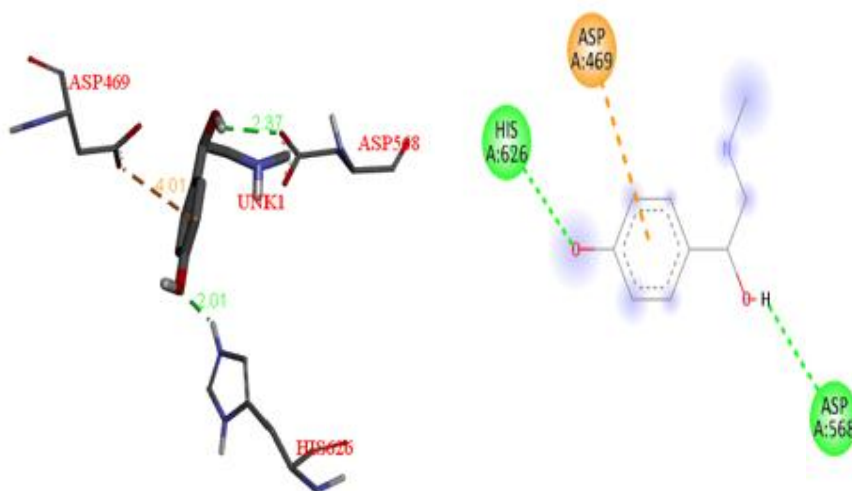


Figure.5 : Mode d'interaction 3TOP@ p-synéphrine



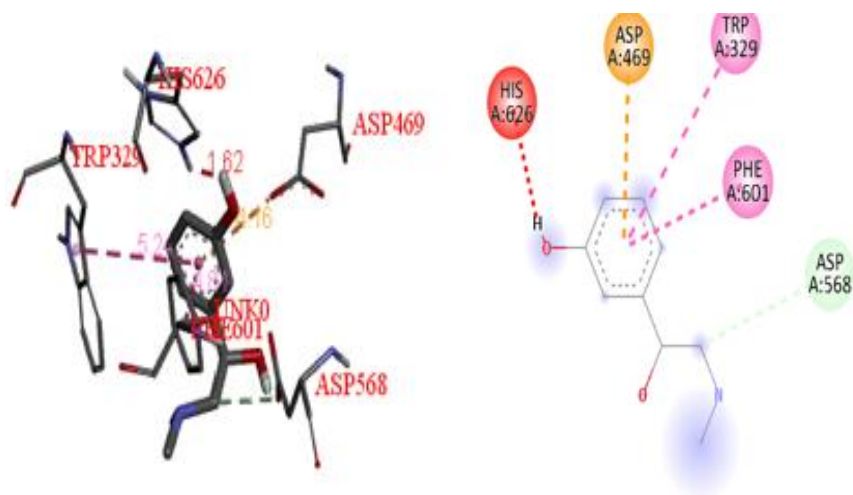
**Figure .6 :** Mode d'interaction 3TOP@ m-synéphrine.

- Pour 3W37 le point de fixation du p-synéphrine HIS626 (hydrogène), ASP469 (électrostatique), et m-synéphrine: PHE601, TRP329 (hydrophobe), ASP469 (électrostatique).



**Figure.7 :** Mode d'interaction 3W37@ p-synéphrine.

## Résultats et discussions



**Figure.8** : Mode d'interaction 3W37@ m-synéphrine.

Ces résultats révèlent une inhibition du métabolisme des molécules  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glycosidase par l'acarbose ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux.

D'après ces résultats on peut constater que la synéphrine peut exercer un effet inhibiteur sur ses enzymes, moins faible que celui de l'acarbose.

## Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons envisagé une étude computationnelle par docking moléculaire pour évaluer l'inhibition des enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glycosidase, d'une part par les composés méta et para synéphrine (constituants naturels de l'orange amer) et par l'acarbose (médicament antidiabétique) d'une autre part.

Les enzymes  $\alpha$ -amylase et  $\alpha$ -glycosidase digèrent les hydrates de carbone. L'alpha-amylase hydrolyse les amidons complexes en oligosaccharides, tandis que l'alpha-glycosidase hydrolyse les oligosaccharides en glucose et autres monosaccharides.

L'inhibition de ces enzymes bloque le processus de la dégradation des oligosaccharides, stoppant la digestion des carbohydrates, et permettant ainsi de régler le taux de glucose dans le sang chez les diabétiques.

Les résultats obtenus montrent que:

- l'acarbose possède la meilleure affinité par rapport aux synéphrine vis-à-vis les enzymes étudiés.
- le composé m-synéphrine possède la plus forte action sur l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glycosidase par rapport à l'isomère para.
- La synéphrine peut empêcher l'activité des enzymes clés dans le métabolisme des glucides.
- Les principales interactions qui guident et orientent les ligands au sein des macromolécules sont de type hydrophobiques ou hydrogènes.

L'ensemble des résultats obtenus au fil de cette étude n'est qu'une étape préliminaire dans la recherche. Le mécanisme d'action du synéphrine en tant qu'inhibiteur à notre connaissance n'a jamais été décrit, en utilisant le docking moléculaire. Alors, il est souhaitable d'accomplir et d'enrichir ce travail.

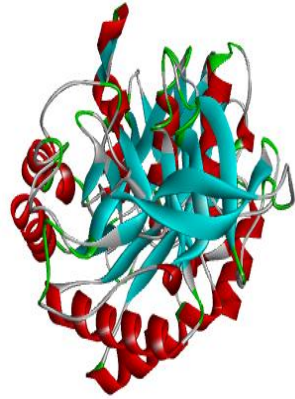


## Annexe.1

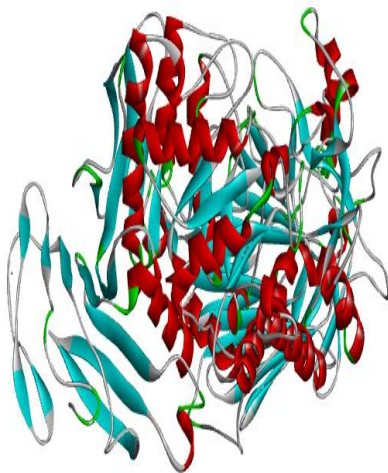
1SMD



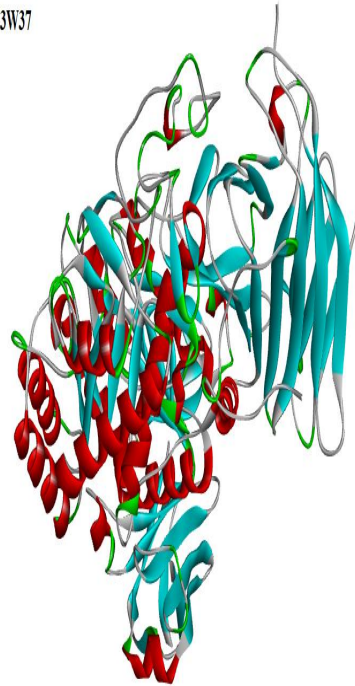
4UZU



3TOP



3W37



## Annexe .2

Proteins	1SMD			4UZU		
ligands	p-synéprine	m-synéprine	Acarbose	p-synéprine	m-synéprine	Acarbose
<b>interactions Hydrogènes</b>		HIS299 2.09 Å	GLN63 2.70 Å  LYS200 2.41 Å 2.33 Å  HIS201 2.49 Å  HIS305 3.50 Å	ALA200 2.79 Å  GLY108 3.66Å	TRP139 3.54 Å  TRP166 3.49 Å	ARG126. 61 Å  HIS236 2.22 Å
<b>interactions hydrophobes</b>	TYR62 4.82 Å	TYR62 4.61 Å		TYR199 5.33 Å		
<b>interactions électrostatiques</b>					ASP165 3.82 Å	

### Annexe.3

Proteins	3TOP			3W37		
	ligands	p-synéprine	m-synéprine	Acarbose	p-synéprine	m-synéprine
<b>interactions Hydrogènes</b>		ASP1526 2.74	ARG1285 1.97  ARG1377 1.91, 2.32  ASP1281 3.08  GLN1286 3.28  GLN1372 2.17  TYR1251 2.77			ALA234 2.65 Å  SER497 2.73 Å 1.93 Å 2.16 Å  ARG552 1.80 Å 2.85 Å ILE233 3.52 Å
<b>interactions hydrophobes</b>	LEU152 3.48 Å	PHE1559 5.09 Å			TRP329 5.23 Å  PHE601 4.81 Å	
<b>interactions électrostatiques</b>		ASP1420 4.62Å		ASP469 4 Å	ASP469 4.6 Å	