

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Science de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité/Option: Phytopathologie et phytopharmacie.
Département: Ecologie et génie de l'environnement

Etude *in silico* de l'effet inhibiteur potentiel d'un groupe de flavonoïdes contre la chitinase fongique

Présenté par :

CHABBI Amina

NABTI Khaoula

Devant la commission composée de :

Zitouni A.	Président	Université de Guelma
Baali S.	Encadreur	Université de Guelma
Laouar H.	Examineur	Université de Guelma
Allioui N.	Membre	Université de Guelma
Khaladi O.	Membre	Université de Guelma
Ouchtati N.	Membre	Université de Guelma

Juin 2017

Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force, le courage, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur monsieur **Baali Salim** qui nous a encadrées et dirigées ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils, ses encouragements.*

Nos remerciements vont aussi aux membres de notre jury de mémoire :

*A notre président du jury Monsieur **Zitouni A.** (MCB) à L'Université de 08 mai 1945Guelma. C'est un réel plaisir pour nous que vous avez accepté de présider notre jury de mémoire.*

*A l'examinatrice madame **Laouar H.** (MCB) à L'Université de 08 mai 1945Guelma. Nous sommes fiers que vous avez accepté d'examiner et de juger notre travail*

*Sans oublier, on tient à remercier sincèrement madame **Allioui N.** (MCB), monsieur **Khaladi O.** (MAA) et madame **Ouchtati N.** (MCB) à L'Université de 08 mai 1945Guelma.*

Enfin nous présentons tous nos remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire par leurs connaissances et leurs conseils.

Amina et Khaoula

Dédicaces

Je dédie ce travail :

À mes très chers parents Ahmed et Akila que j'aime plus que tous au monde et auxquels je dois toute ma vie et toutes mes réussites.

À mon très cher mari Hamza pour son aide et ses encouragements et à toute sa famille Nabti.

À mes soeurs, Bouchra et sa petit prince Siraj eddine, Mariem, Chaima, Dounia, Hadil et Ghofran.

À mon très cher frère Amine

À mon oncle Lamri et sa femme Dalila

À toute ma famille Chabbi et toutes mes amies particulièrement Marwa

A mon binôme « khawla » qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail

En témoignage de ma profonde affection

Amina

Dédicace

A mes chers parents source de tendresse, de volonté et de patience. Mes Yeux

à travers lesquels j'ai vu et je vois ce monde : Abdallah et Salima.

À mon très cher mari Issam à la famille Nabti et Benmachiche.

A mes frères : Hamza ,Aymen, Fouad et Riyad .

À mes sœurs : Karima, zineb, souad, noufa, et sa petits prince Mouhamd

,Yasser, Baraa ,Elhassan ,elhossayn

A mon grand mère :fatima.

A celles qui je passe avec elles les bonnes heures et je porte avec

Elles que les bonnes souvenirs, à mes amies intimes :y

Marwa ,Amina ,Bouchra ,Mouna ,Kouka ,Rayhana, Hadjer,

Mariam... etc

A mon binôme «Amina» qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce

travail

En témoignage de ma profonde affection

Khawla

Sommaire

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Liste des abréviations.

Introduction..... 1

Chapitre 01 : les chitinase et ses inhibiteurs

I. La chitine 2

1. Généralités 2

2. Structure..... 2

II. Les chitinases et ses inhibiteurs 2

1. Historique 2

2. Définition 3

3. Classification des chitinases 3

4. Fonctions et rôles des chitinases 5

5. Description structurale de la chitinase 6

6. Mécanisme d'action des chitinases 8

7. Inhibiteurs de chitinases 10

7.1.L'allosamidine 10

7.2. La psammapline A 11

7.3. Les styloguanidines 12

7.4. L'argifine 12

8. Importance de l'interaction entre inhibiteurs et site catalytique des chitinases 13

Chapitre 02 : Les flavonoïdes

Les flavonoïdes	14
1. Définition	14
2. Structure des flavonoïdes	14
3. Biosynthèse des flavonoïdes	15
4. Classification des flavonoïdes	15
5. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes	16
5.1. Propriétés anticancéreuses des flavonoïdes	17
6. Fonctions des flavonoïdes pour les plantes.....	17
6.1.Rôle de protection contre le stress environnemental	17
6.2. Rôles comme composés de défense.....	18
6.3. Activité antifongique	21

Le chapitre 03 : Le Docking moléculaire

1. Généralité	20
2. Principe théorique	21
3. Le programme GOLD	22
3.1. Algorithme de GOLD	22
3.2. Le mécanisme du placement du ligand dans le site actif	23
4. La fonction de score	23

Matériel et méthode

Matériel	25
1. Microordinateur	25
2. Programmes	25

2.1. PyMOL	25
2.2. GOLD	26
2.2.1. Hermes	26
3. Les banques des données	27
3.1. La banque de données protéiques (PDB)	27
3.2. Pubchem.....	28
4. Structure des chitinases utilisées.....	28
Méthodes.....	29
1. Préparation des molécules à l'arrimage	29
2. Préparation des ligands	29
3. Les différentes étapes de docking.....	33
3.1. Addition des hydrogènes.....	33
3.2. Suppression des molécules d'eau.....	33
3.3. Suppression des ligands	33
3.4. Définition de site de liaison	33
3.5. La sélection du Ligand.....	33
3.6. La fonction de score	33
3.7. Run GOLD.....	34
4. Filtrage selon la règle de 5 de lipinski « 1997 »	34

Résultat et discussion

Résultats et discussion	36
1. Fiabilité de programme utilisé	36

1.1. Le test RMSD	36
Conclusion	37
1.2. L'analyse visuelle	37
Conclusion	39
2. Le docking des diverses molécules sur le récepteur 2IUZ par GOLD	39
2.1. Le complexe chitinase-inhibiteur (C2-Dicaffeine)	39
2.2. Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur 2IUZ	42
2.2.1. Etude des interactions du Gallocatéchine gallate avec la chitinase fongique	44
2.2.2. Etude des interactions du Curcumine avec la chitinase fongique	45
3. Application de la règle 5 du lipinski	47
La discussion	47
conclusion	49
Résumé.	
Référence bibliographique.	

Liste des figures

N° : figure	titre	page
Figure 01	Chaîne linéaire de chitine	01
Figure 02	Monomères de chitine avec représentation des sites d'action des endo- et des exochitinas es	03
Figure 03	Présentation schématique des différents domaines constituant les 5 classes de chitinasés chez les plantes	05
Figure 04	Modèle tridimensionnel des chitinasés de la famille 18 (chitinase B chez <i>Serratia marcescens</i>).	07
Figure 05	Modèle tridimensionnel des chitinasés de la famille 18 (chitinase A chez <i>Aspergillus fumigatus</i> , avec le site catalytique marqué (la région bleu) au centre du tonneau formé par les 8 unités α/β . Image générée par Pymol (code pdb 4TX6).	08
Figure 06	Le mécanisme catalytique des hydrolases de glycoside, famille18.	09
Figure 07	Structure de L'allosamidine.	10
Figure 08	Structure de la psammaline A	11
Figure 09	Structure des styloguanidines.	12
Figure 10	Structure de L'argifine.	12
Figure 11	Structure de base des flavonoïdes	15
Figure 12	Principe générale d'un programme de docking.	22
Figure 13	La fenêtre de visualisation.	25
Figure 14	L'interface graphique du GOLD.	26
Figure 15	L'interface graphique du site web de la base de donnée PDB.	27
Figure 16	L'interface graphique du site web de la base de donnée Pubchem.	28
Figure 17	Superposition des géométries de l'inhibiteur Pentoxifylline donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb 2a3c. RMSD = 1.461	37

	Å). Image générée par GOLD.	
Figure 18	Superposition des géométries de l'inhibiteur C2-Dicaffeine donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge).	38
Figure 19	Superposition des géométries de l'inhibiteur Allosamidine donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge).	38
Figure 20	Superposition des géométries de l'inhibiteur Allosamidine donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge).	39
Figure 21	Diagramme d'interaction de l'inhibiteur C2-Dicaffeine avec la chitinase fongique (2IUZ).	40
Figure 22	Emplacement de C2-Dicaffeine dans le site actif de la chitinase fongique (code PDB : 2IUZ).	41
Figure 23	Mode de liaison de la C2-Dicaffeine avec le site actif de la chitinase fongique (code pdb : 2IUZ).	42
Figure 24	Représentation de liaison hydrogène formée par le Gallocatéchine gallate.	44
Figure 25	Emplacement de Gallocatéchine gallate dans le site actif de la chitinase fongique.	45
Figure 26	Représentation de liaison hydrogène formée par la Curcumine.	46
Figure 27	Emplacement de la Curcumine dans le site actif de la chitinase fongique.	46

Liste des tableaux

N° : tableau	titre	page
Tableau 01	Classification des différentes chitinases en fonction de leurs séquences en acides aminés et de leur provenance	05
Tableau 02	Régions conservées chez les chitinases de la famille 18 : résidus catalytiques conservés dans toutes les séquences (*) avec un résidu aspartate et un résidu glutamate, qui joue un rôle clé dans le mécanisme catalytique	08
Tableau 03	présente quelques classes distinctes des flavonoïdes	16
Tableau 04	Différents logiciel de docking moléculaire.	21
Tableau 05	Structure des chitinases fongiques utilisées.	29
Tableau 06	Représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes.	30
Tableau 07	Valeurs de RMSD des quatre complexes chitinase-inhibiteurs étudiés.	36
Tableau 08	les interactions hydrogènes entre la chitinase fongique et le C2-Dicaffeine.	41
Tableau 9	Résultats de docking avec le programme GOLD.	43
Tableau 10	Les ponts hydrogènes entre la chitinase fongique et le Gallocatéchine gallate.	44
Tableau 11	Les ponts hydrogènes entre la chitinase fongique et la Curcumine.	45
Tableau 12	Propriété pharmacocinétique des flavonoïdes (La Gallocatéchine gallate, la Curcumine).	47

Liste des abréviations

(ASP): Astex Statistical Potential

2D: deux dimensions

3D : Trois dimensions

4CL : la CoA-ligase

Å: Angstrom

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion

ADN : acide désoxyribonucléique

ARG : Arginine

ASP : aspartique

C: carbone

C4H: l'enzyme cinnamate-4- hydroxylase

CBD : ChitinBinding Domain

CCDC : Cambridge Crystallographic Data Centre

CHS : la chalconesynthase

GlcNAc : poly β -1,4 acetyl glucosamine

GLU : glutamine

GLY: glycine

GOLD: Genetic Optimisation for Ligand Docking

H: Hydrogène

MET: Methionine

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NIH: National Institutes of Health

O: Oxygène

PAL : La phénylalanine ammonia lyase

PAL: Phénylammonia lyase

PDB: protein data bank

Pgp: glycoprotéine P

PHE: Phenylalanine

PLP: Piecewise Linear Potential

RMSD: Root Mean-Square Derivation

ROS: Reactive Oxygen Species

SDF: Stands for structure-Data File

THR: Thréonine

TRP: Tryptophane

TYR: tyrosine

UV : Ultra -Violet

VIH: Human Immuno desiciency Virus

α : alfa

β : beta

Introduction

Les mycoses sont de nos jours un réel problème de santé publique. Elles sont de plus en plus difficiles à éradiquer et leurs fréquences sont en très forte progression. L'apparition de souches résistantes aux antibiotiques usuels, le changement dans le spectre clinique des pathogènes (*Candida*, *Histoplasma*, *Aspergillus*), l'émergence d'un pouvoir pathogène chez des souches habituellement saprophytes de notre environnement et les immunodépressions causées par l'infection à VIH sont les principaux facteurs de cette forte recrudescence. (Bagre *et al.*, 2006).

Les difficultés socio-économiques que connaissent les pays du tiers monde font que les populations n'ont pas toutes accès aux spécialités pharmaceutiques importées qui d'ailleurs font face à des résistances.

Face à cette situation, des moyens thérapeutiques traditionnels sont envisagés. C'est dans le but d'apporter notre contribution à la recherche de nouvelles molécules que nous évaluons l'activité antifongique d'extraits végétaux pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

Actuellement la recherche en biologie ne peut se passer des outils informatiques pour traiter le flux de données produites et optimiser ses avancées. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo saxon " docking "). L'emploi initial du " docking " moléculaire a été de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand (Chikhi, 2007).

L'objectif de la présente étude consiste à évaluer les activités antifongiques d'un groupe de flavonoïdes et comprendre les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre les flavonoïdes et la chitinase fongique par la méthode de docking moléculaire avec le programme **GOLD**. Il nous a paru alors important de développer cet aspect en vue d'évaluer l'énergie d'interaction de ces composés et aussi de visualiser les liaisons qu'ils impliquent avec le site actif de cet enzyme. Enfin nous avons tenté de proposer, *in silico*, de nouveaux inhibiteurs naturels plus puissants envers la cible thérapeutique en question.

Chapitre 01

Les chitinases et ses inhibiteurs

I. La chitine :

I.1. Généralités :

Absente du règne végétal, elle est une structure de soutien chez les champignons et les animaux. Chez les champignons où elle constitue 22 à 44% des parois cellulaires des hyphes mycéliens, la chitine est associée à des glycoprotéines (Ehrlich *et al.*, 2007).

I.2. Structure :

La chitine $[(C_8H_{13}O_5N)_n]$ est un polysaccharide cristallin constitué de longues chaînes linéaires contenant plus de 1000 résidus de N-acétylglucosamine (GlcNAc, 2-acetamido-2-deoxy- D-glucose) liés par des liaisons β (1-4).

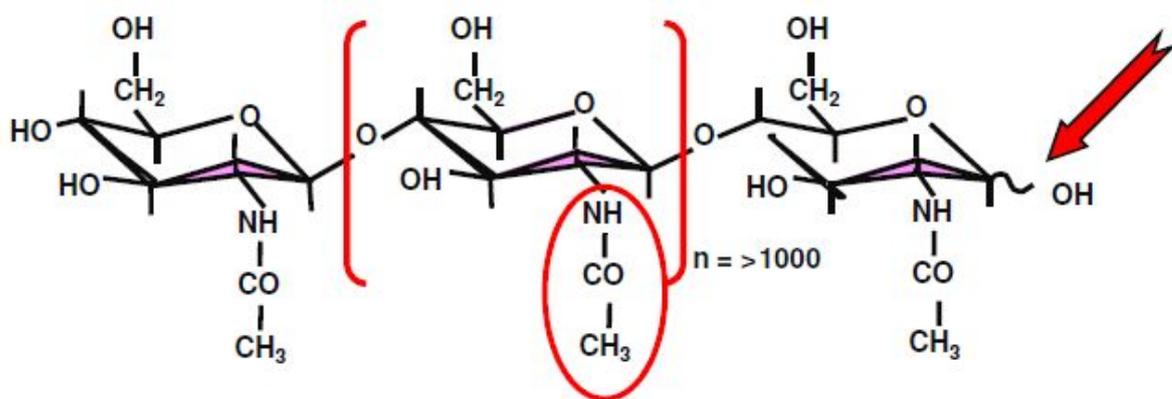


Figure 01. Chaîne linéaire de chitine

L'unité N-acétylglucosamine, indiquée entre parenthèses, constitue l'unité répétitive du polymère de chitine, Le groupement acétylé est entouré en rouge, La flèche indique l'extrémité réductrice de la chaîne (Merzendorfer et zimoch, 2003).

II. Les chitinases et ses inhibiteurs :

II. 1. Historique :

La chitinase a été découverte par Karrer en 1929, et son activité spécifique dans l'hydrolyse de la chitine a été démontrée par Zechmeister en 1939. Ces enzymes se trouvent dans une rangée importante d'organismes, comprenant les bactéries, les champignons, les crustacés, les insectes (PerrakiA *et al.*, 1993), les plantes (Neuhaus, 1999), et même dans les vertébrés, de puis lors ces molécules sont exactement considérés pendant qu'un outil pour renforcer l'immuno-réaction de plante contre une variété de microbes pathogènes par de divers ouvriers dû à sa propriété pour lyser le mur de cellules et les composants fongiques d'exosquelette d'insecte , sans compter que cette augmentation

dramatique de chitinase par de nombreux agents abiotiques (éthylène, acide salicylique, solutions de sel, ozone, lumière UV) et par des facteurs biotiques (mycètes, bactéries, virus), la cellule a également prouvé leur rôle dans la réponse de défense de plante (Cupta *et al.*, 2010 b), en plus de lui, les mycètes pathogènes d'insecte ont un potentiel considérable pour la commande biologique des parasites d'insecte qui surmontent apparemment les barrières physiques du centre serveur, en produisant les enzymes extracellulaires multiples comprenant les enzymes chitinolytiques qui aident à pénétrer le cuticule et à faciliter l'infection (Herrera-Estrella *et al.*, 1999).

II. 2. Définition :

Les chitinases sont des protéines de stress (protéine PR-3) (Politz *et al.*, 1992), ayant une activité hydrolytique envers la chitine présente dans la paroi de plupart des champignons pathogènes.

Plus précisément, les chitinases hydrolysent les liaisons (1→4)- β des résidus de N-acétyl- β -D-glucosamine présents dans la chitine et les chitodextrines.

II. 3. Classification des chitinases :

Les chitinases sont classées comme des glycosyl hydrolases et ont été isolées de plusieurs organismes différents (Kasprzewska, 2003), elles peuvent être divisées en deux catégories, à savoir les endochitinases et les exochitinases.

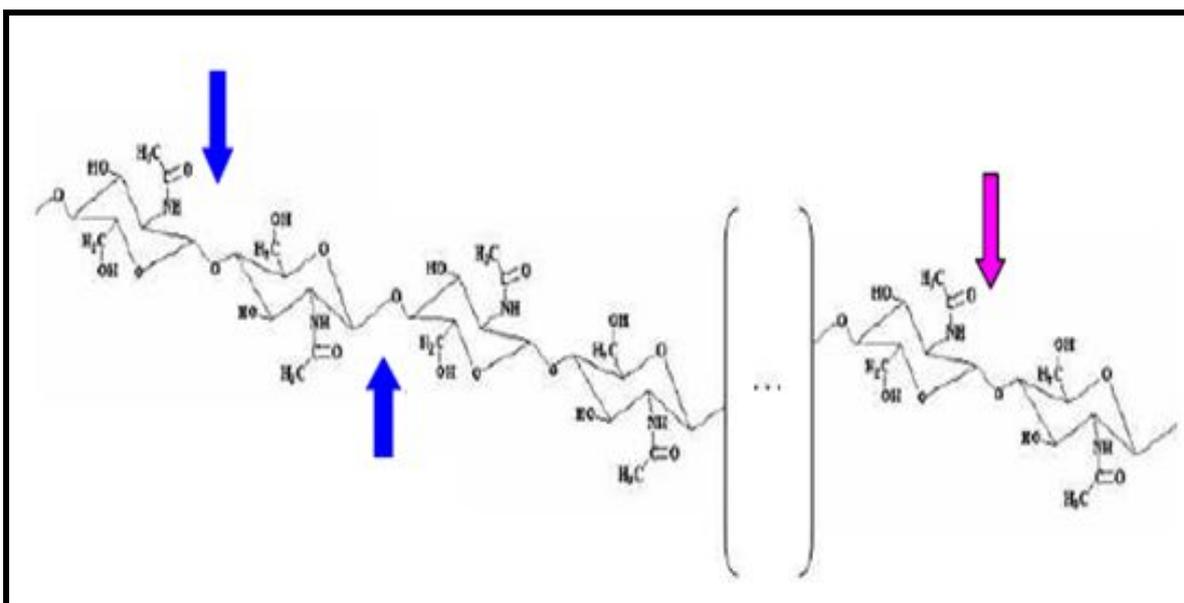


Figure 02. Monomères de chitine avec représentation des sites d'action des endo- et des exochitinases.

Les premières, également nommées poly [1,4-(Nacétyl- β -D-glucosaminide)] glycanohydrolases (EC 3.2.1.14) hydrolysent les liaisons internes des micro fibrilles de chitine pour libérer des fragments de chitobiose, chitotriose et chitotétraose composés respectivement de deux, trois ou quatre unités *N*-acétylglucosamine.

Les **endochitinases** clivent de manière aléatoire la chaîne de chitine en hydrolysant les ponts β (1,4)-glycosidiques formant ainsi des molécules de taille variable.

Les secondes, nommées **exochitinases** ou β -*N*-acétylhexosaminidases (EC 3.2.1.52), participent à la dégradation complète des fragments de chitine, Parmi ces exochitinases, les Chitobiosidases libèrent des diacétylchitobioses à partir des extrémités non-réductrices de la chitine et les β -D-acétylglucosaminidases hydrolysent ces diacétylchitobioses en monomères de *N*-acétylglucosamine (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998).

Les chitinases ont été subdivisées en deux familles : famille 18 et famille 19, qui diffèrent également dans leurs structures tridimensionnelle et dans leurs mécanismes catalytiques (Brameld *et al.*, 1998 ; Neuhaus, 1999) et D'importantes différences dans les propriétés biochimiques ont également été relevées (Watanabe *et al.*, 1999).

La première classification des chitinases avait été effectuée sur la base de différentes séquences de chitinases d'espèces de plantes variées (Hamel *et al.*, 1997). D'après la similitude des séquences d'acides aminés des différentes chitinases identifiées, cinq classes de chitinases ont été proposées et regroupées dans les deux familles de glycosyle hydrolases 18 et 19 (Watanabe *et al.*, 1999).

Les chitinases sont également classés selon la séquence N-terminale, le pHi, la localisation de l'enzyme, et la présence ou l'absence du peptide signal en différentes classes (I, II, III, IV, V) (Terwisscha van Scheltinga *et al.*, 1996).

La famille 18 est ainsi répartie entre les classes III et V et la famille 19 dans les classes I, II et IV (Tsujiibo, 2000).

Les chitinases des deux différentes familles (18 et 19) ne partagent pas une similitude de séquence d'acides aminés, et ont complètement différentes pour la structure tridimensionnelle (3D) (Tews *et al.*, 1997) et des mécanismes moléculaires.

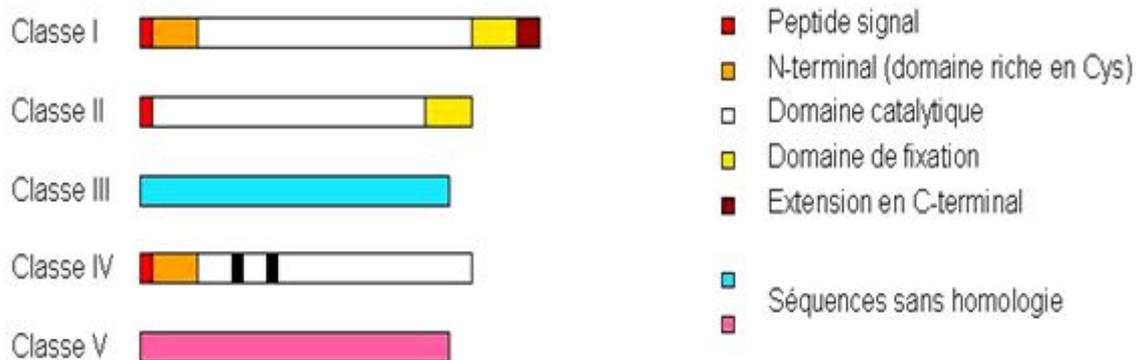


Figure 03. Présentation schématique des différents domaines constituant les 5 classes de chitinases chez les plantes (Azzouz, 2001).

Tableau 01 : Classification des différentes chitinases en fonction de leurs séquences en acides aminés et de leur provenance (Azzouz, 2001).

Famille 19			Famille 18	
Plantes			plantes	
Nématodes			Virus	
Bactéries			Bactéries	
			Champignons	
			Nématodes	
			Invertébrés	
			Vertébrés	
Classe I	Classe II	Classe IV	Classe III	Classe V

II. 4. Fonctions et rôles des chitinases :

Les chitinases jouent plusieurs rôles dans une multitude de systèmes biologiques différents, chez les plantes, les chitinases jouent un rôle dans la résistance contre les pathogènes. Des recherches ont en effet montré que les chitinases sont également impliquées dans un grand nombre d'événements physiologiques, lors du développement ou dans les processus de croissance (Azzouz, 2001).

Les rôles des chitinases de la famille 18, ont bien été étudiés et se situent visiblement dans une large palette de fonctions, chez les champignons, les chitinases possèdent un rôle auto lytique, nutritionnel et morphogénétique, la chitinase des virus quant à elle est impliquée dans la pathogenèse (Dahiya, 2005).

Chez les insectes et les crustacés, les chitinases sont étroitement liées avec les mues et le besoin d'une dégradation partielle de l'ancienne cuticule. La présence des chitinases chez les vertébrés est ainsi principalement associée au système digestif, ces enzymes sont également associées à un rôle de défense contre les attaques pathogènes des champignons. De nombreux venins de vertébrés possèdent également pour composante de la chitinase (Dahiya, 2005).

Les fonctions de la chitinase chez les bactéries montrent également un rôle dans la nutrition par exemple : *Streptomyces griseus* HUT6037, qui possède une chitinase de la famille 19, présente une activité antifongique (Itoh *et al.*, 2003).

II. 5. Description structurale de la chitinase :

La structure d'un certain nombre d'enzymes de chitinase est modulaire, possédant un domaine catalytique et un ou plusieurs domaines non catalytiques qui peuvent ou ne peuvent pas jouer un rôle dans la liaison au substrat.

Les chitinases des deux différentes familles (18 et 19) ne partagent pas une similitude de séquence d'acides aminés, et sont complètement différentes pour la structure tridimensionnelle (3D) (Tews *et al.*, 1997) et des mécanismes moléculaires. La structure d'un certain nombre d'enzymes de chitinase est modulaire, possédant un domaine catalytique et un ou plusieurs domaines non catalytiques qui peuvent ou ne peuvent pas jouer un rôle dans la liaison au substrat.

La Famille 18 est ubiquitaire et comporte des chitinases de bactéries, de champignons, de virus, d'animaux et de plantes.

Les membres de cette famille possèdent une structure tridimensionnelle commune composée de 3 domaines principaux : domaine catalytique, un linker (linker) et un domaine fixateur de la chitine (CBD = Chitin Binding Domain). Ce dernier est composé de 3 feuillets β anti parallèles reliés par de longues boucles. (Figure 04).

La famille 18 comprend plusieurs régions d'acides aminés conservés, Ces séquences signatures sont trouvées dans le site actif qui contient un résidu aspartate (D) et un résidu glutamate (E), crucial pour le mécanisme catalytique. (Tableau 2).

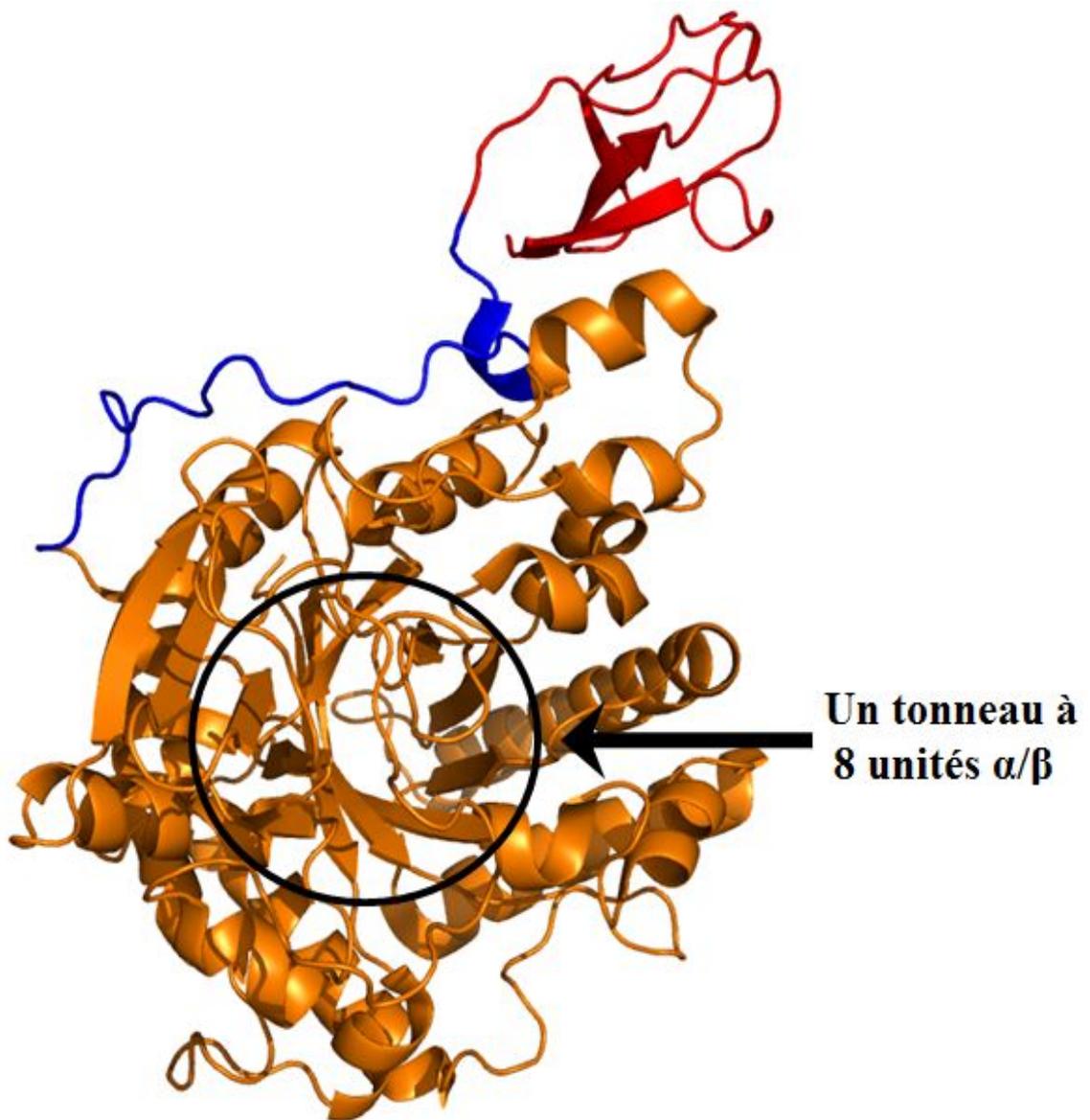


Figure 04. Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase B chez *Serratia marcescens*). *Domaine catalytique* (résidus 1-425) en **orange**, *lieur (linker)* résidus (426-450) en **bleu**, et *domaine fixateur* résidus (451 à 499) en **rouge**. Image générée par Pymol (code pdb 1E15).

Tableau 02 : Régions conservées chez les chitinases de la famille 18 : résidus catalytiques conservés dans toutes les séquences (*) avec un résidu Asp et un résidu Glu, qui joue un rôle clé dans le mécanisme catalytique (Neuhaus *et al.*, 1999).

<i>Tobacco</i>	GQSNTRPLGDAV	LDGIDFDI [*] EGGTT
<i>Cucumber</i>	GQSDSRPLGAAV	LDGVDFDI [*] ESGSG
<i>Maize</i>	GSGSSRPLGAAV	LDGIDFDI [*] ENGQS
<i>Coccidioides immitis</i>	LSIGGWTYSPMF	FDGIDIDWE [*] YPED
<i>Trichoderma harzianum</i>	LSIGGWTYSTNF	FDGIDIDWE [*] YPAD
<i>Aphanocladium album</i>	LSIGGWTYSTNF	FDGIDIDWE [*] YPAD
<i>Serratia marcescens</i>	PSIGGWTLSDPF	FDGV [*] IDWE [*] FPGG
<i>Caenorhabditis elegans</i>	IDSAITFVRTWG	FDGIDIDWE [*] YPSG
<i>Brugia malayi</i>	IKSAIAFLRKNN	FDGF [*] DL [*] DWE [*] YPVG

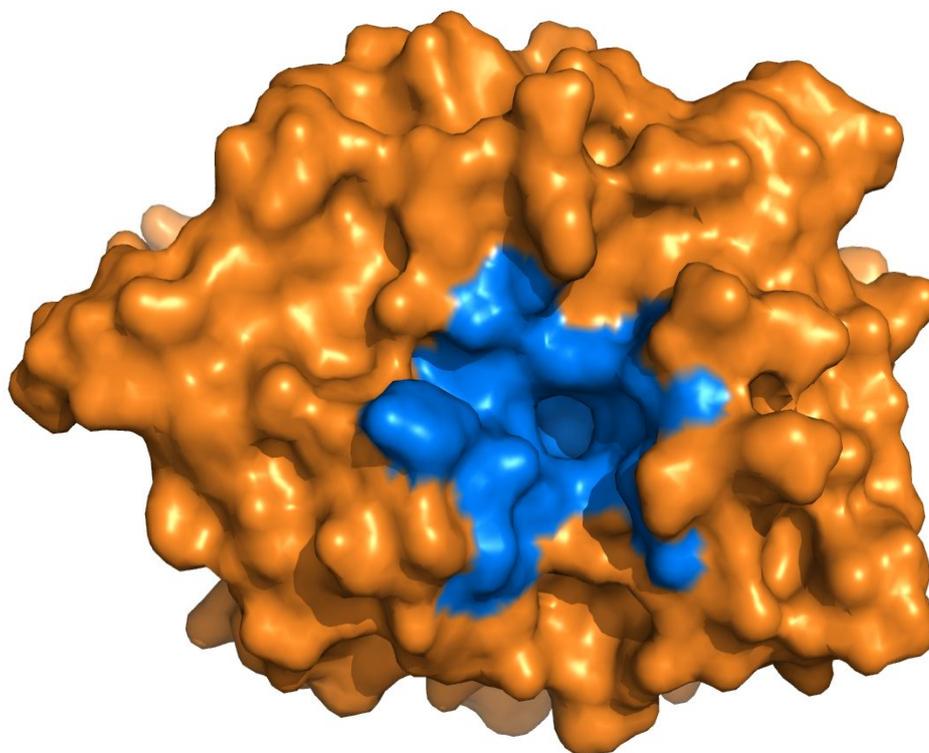


Figure 05. Modèle tridimensionnel des chitinases de la famille 18 (chitinase A chez *Aspergillus fumigatus*, avec le site catalytique marqué (la région bleu) au centre du tonneau formé par les 8 unités α/β . Image générée par Pymol (code pdb 4TX6).

II. 6. Mécanisme d'action des chitinases :

Les chitinases agissent en hydrolysant la liaison β glucidique entre les résidus GlcNAc. En général cette hydrolyse se déroule de l'une ou de l'autre manière, l'une avec conservation anomérique dans le produit, l'autre avec une inversion anomérique (figure 6)

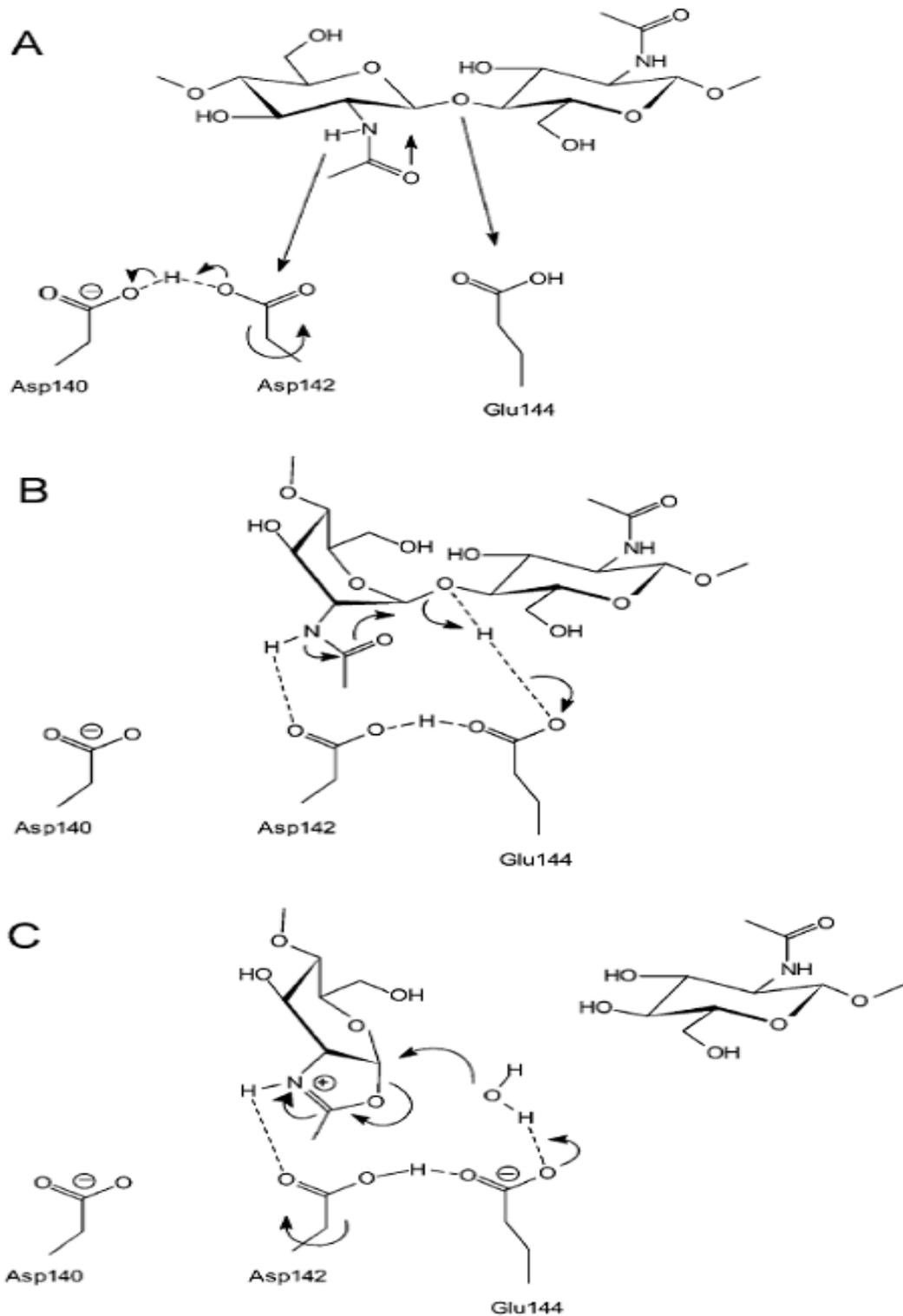


Figure 06. Le mécanisme catalytique des hydrolases de glycoside, famille18. La figure montre le mécanisme proposé dans Réf. (Tews *et al.*, 1997) et précisé dans Réf. (Van Aalten *et al.*, 2001) (A) liaison du substrat (B) distorsion du substrat et protonation de la liaison glycosidique (C) la formation de l'ion oxazolinium intermédiaire et départ des groupes clivés , une molécule d'eau (destinée à hydrolyser l'ionoxazolinium) se rapproche de l'atome de carbone anomère.

II. 7. Inhibiteurs de chitinase :

Si de nombreux inhibiteurs de la synthèse de chitine sont commercialisés, aucun inhibiteur de la dégradation de la chitine n'a jusqu'alors été utilisé. Les effets attendus d'un inhibiteur de chitinases sont l'inhibition de l'apolyse et la perturbation des processus d'exuviation. Toutefois, de nombreux inhibiteurs de chitinases ont été découverts, isolés et caractérisés au cours de ces deux dernières décennies. Différents types d'inhibiteurs de chitinases ont pu être mis en évidence, les uns mimant la structure de la chitine, les autres des intermédiaires de dégradation de la chitine par les chitinases de la famille 18.

II. 7.1. L'allosamidine (C₂₅H₄₂N₄O₁₄) :

L'inhibiteur le plus étudié est l'allosamidine (Figure 7), un pseudotrisaccharide découvert par Sakuda *et al.* (1987) et isolé à partir de bactéries du genre *Streptomyces*. Une puissante activité inhibitrice est décrite contre les chitinases de la famille 18, dont celles des insectes et des champignons mais l'allosamidine n'affecte pas les chitinases de la famille 19 (Sakuda et Sakurada, 1998). Ce composé, qui agit par inhibition compétitive des chitinases, présente de nombreux effets délétères sur les insectes.

Les effets insecticides (inhibition des mues) de l'allosamidine, mis en évidence dès 1987 chez le lépidoptère *Bombyx mori* ont été retrouvés chez de nombreux autres insectes, notamment chez la mouche *Lucilia cuprina* chez laquelle le taux de mortalité est également significativement augmenté (Blattner *et al.*, 1997).

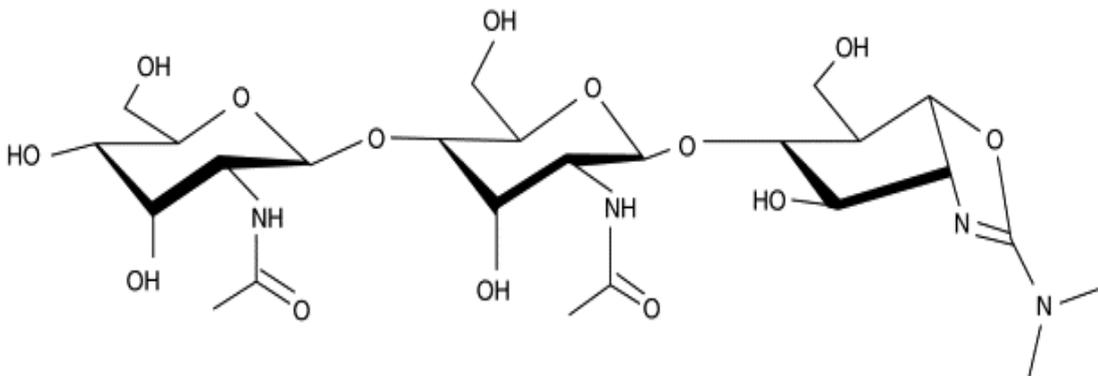


Figure 07. Structure de L'allosamidine.

Les effets de l'allosamidine ne se limitent pas uniquement aux insectes. En effet, cet inhibiteur retarde l'enkystement de l'amibe *Entamoeba invadens* et affecte aussi les chitinases du nématode *Onchocerca gibsoni* et celles des bactéries du genre *Bacillus* (Gooday *et al.*, 1988).

L'allosamidine possède enfin des propriétés antifongiques dirigées contre des champignons pathogènes tels que *Candida albicans* et *Neurospora crassa*. L'allosamidine inhibe également la fragmentation des hyphes de *Acremonium chrysogenum* (Sandor *et al.*, 1998) et de *Penicillium chrysogenum* (Sami *et al.*, 2001).

Le mode d'interaction entre les chitinases de la famille 18 et cet inhibiteur a été mis en évidence par cristallographie ; l'allosamidine mime un état transitoire de la catalyse de la chitine. L'allosamidine est constituée de deux groupements Nacétylallosamine liés à une allosamizoline et présente une structure analogue à celle de la chitine mais qui n'est pas hydrolysable (Fusetti *et al.*, 2002; Rao *et al.*, 2003).

Bien que de nombreuses études aient été menées sur l'allosamidine et ses dérivés, leur production est onéreuse en raison des difficultés de synthèse. C'est pourquoi de nombreuses recherches ont été développées pour cribler de nouvelles molécules aux pouvoirs inhibiteurs vis-à-vis des chitinases de la famille 18.

II. 7.2. La psammapline A ($C_{22}H_{24}Br_2N_4O_6S_2$) :

La psammapline A (Figure 8) est un produit naturel dérivé de tyrosine bromée, récemment extrait de l'éponge *Aplysinella rhax* (Tabudravu *et al.*, 2002). Ce produit phénolique présente des propriétés antibiotiques sur la bactérie *Staphylococcus aureus* (Kim *et al.*, 1999a). Outre ces effets thérapeutiques, la psammapline A présente des effets inhibiteurs modérés sur les chitinases bactériennes de *Bacillus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Actinomyces sp.* et *S. marcescens* avec des activités inhibitrices variables d'une espèce à une autre. Cette molécule inhibe également la croissance du mildiou de la vigne *Plasmopora viticola*. En revanche, si elle ne présente pas d'effet sur *Drosophila melanogaster* ni sur *Heliotis virescens*, elle induit toutefois une mortalité de 55% sur le lépidoptère *Plutella xylostella* (Tabudravu *et al.*, 2002).

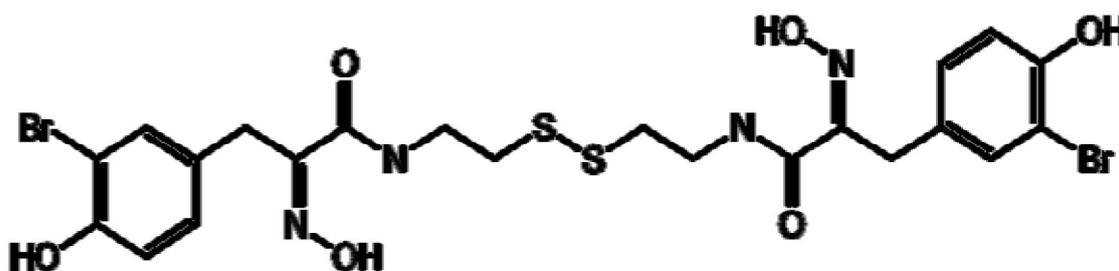


Figure 08. Structure de la psammapline A

II. 7.3. Les styloguanidines (C₁₇H₂₂ClN₉O₂) :

Trois styloguanidines (Figure 9) ont été isolées à partir de l'éponge marine *Stylotella aurantium*. Ces composés de nature cyclique présentent une activité inhibitrice contre des chitinases de bactéries du genre *Shewanella* sp. La mue des larves de certains crustacés est également inhibée par ces styloguanidines (Kato *et al.*, 1995).

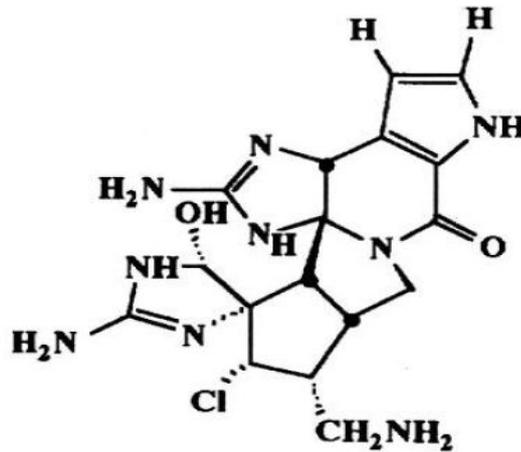


Figure 09. Structure des styloguanidines.

II. 7.4. L'argifine (C₂₉H₄₁N₉O₁₀) :

L'argifine (Figure 10) est le premier inhibiteur d'origine fongique à avoir été isolé. Issu de la souche FTD-0668 de *Gliocladium* sp., il est classé dans la famille des cyclopentapeptides et est constitué d'arginine, de *N*-méthyphénylalanine, de deux acides aspartiques ou deux asparagines, d'alanine et de résidus *N*-méthylcarbamoyl. Bien que présentant de faibles propriétés inhibitrices contre les chitinases de la famille 18, l'argifine inhibe la croissance des larves de la blatte américaine *Periplaneta americana* (Omura *et al.*, 2000).

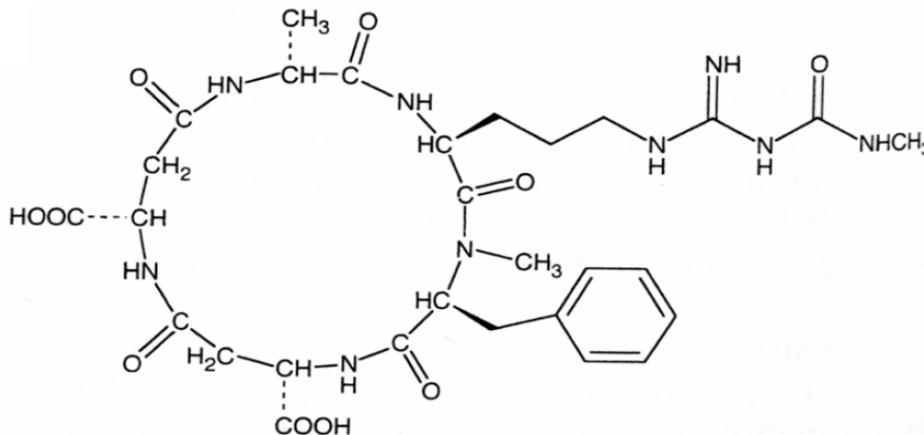


Figure 10. Structure de L'argifine.

II. 8. Importance de l'interaction entre inhibiteurs et site catalytique des chitinases :

Les inhibiteurs de chitinases montrent qu'il existe de nombreuses disparités dans les effets observés. Ces différences peuvent être associées à la structure des inhibiteurs et à leurs modalités d'interactions avec les chitinases. Les études cristallographiques montrent que la force des liaisons établies entre les inhibiteurs et le site actif des chitinases détermine le niveau d'activité inhibitrice et les spécificités d'action.

La nature de l'inhibiteur et la composition en acides aminés du site actif des chitinases sont des facteurs importants dans la mise en place de ces interactions. Ainsi, la structure de l'allosamidine mime le substrat naturel des chitinases et se lie très fortement aux chitinases. Chez les dérivés de l'allosamidine, des modifications plus ou moins importantes de la structure de cet inhibiteur peuvent affecter l'efficacité de l'inhibition (Spindler-Barth, 1997; Spindler-Barth *et al.*, 1998).

Les inhibiteurs d'origine peptidique (argifine) se lient également au site actif des chitinases mais avec d'autres types d'interactions, induisant des activités inhibitrices variables (Houston *et al.*, 2002b). La nature des acides aminés qui constituent le site actif des chitinases varie d'un organisme à l'autre et des modifications du site actif des chitinases peuvent significativement modifier les interactions entre l'inhibiteur et les chitinases.

La mutation d'un résidu tryptophane ne modifie pas l'affinité des chitinases pour leur substrat, mais peut perturber les propriétés catalytiques de l'enzyme (Zhang *et al.*, 2002). Le résidu Arg présent dans le site catalytique des chitinases de la famille 18 est également essentiel pour leur liaison avec les cyclopentapeptides (Dixon *et al.*, 2005).

Chapitre 02

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes

1. Définition :

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Et jouent un rôle important dans la protection des plantes. Les flavonoïdes se trouvent également dans plusieurs plantes médicinales. Des remèdes à base de plantes renfermant ces composés sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde entier. (Bouchama et Yezza, 2014)

2. Structure des flavonoïdes :

Flavonoïde, est un terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone qui fait de deux cycles phényles C6, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6). Ce dernier est situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (cycle centrale). Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et dans le cycle B de 2' à 6' (Figure ci-dessous). La Distinction des sous-classes se fait sur la conformation de la structure centrale (cycle C). (Bouchama et Yezza, 2014)

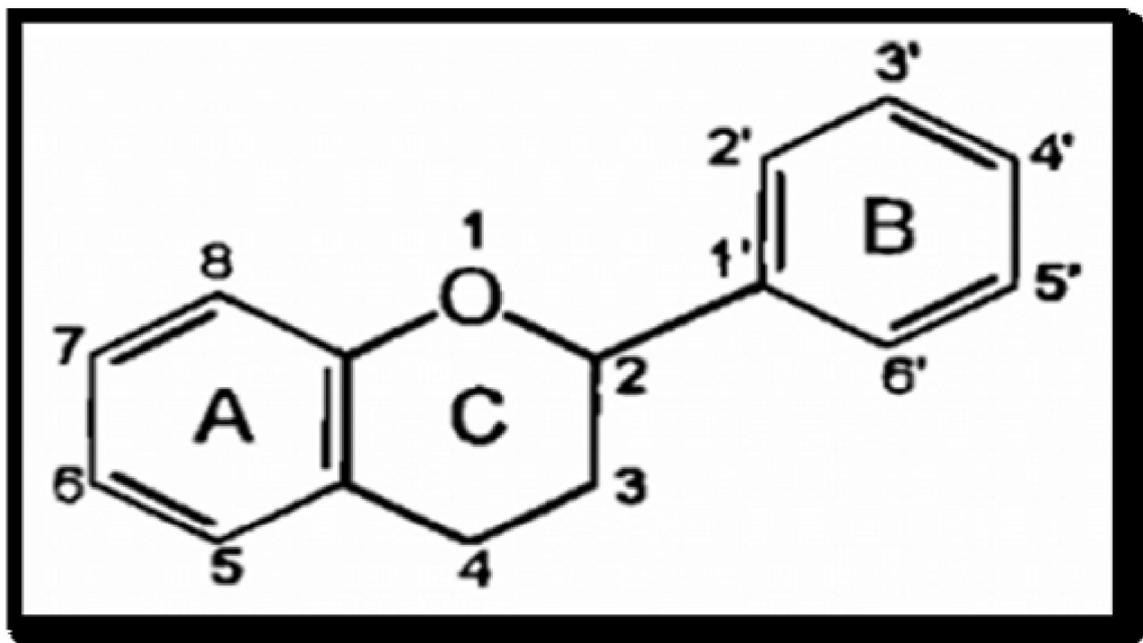


Figure 11: Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles libres, méthylés ou glycosylés) sur les deux cycles aromatiques A et B et le cycle central C. (Bouchama et Yezza, 2014)

3. Biosynthèse des flavonoïdes :

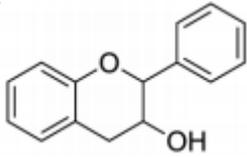
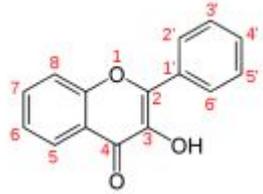
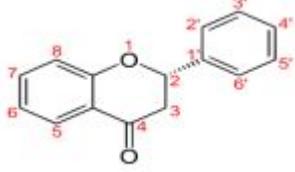
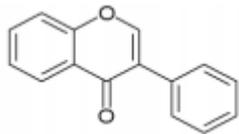
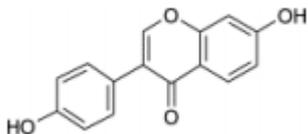
A l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine. La réaction de désamination est catalysée par la phényl ammonia lyase (PAL) et conduit à la formation de cinnamate. Ce dernier est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'enzyme cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL). Cette réaction préliminaire précède la biosynthèse de tous les flavonoïdes. Le coumaroyl-CoA est ensuite transformé en chalcone en faisant intervenir le malonyl-CoA et la chalcone synthase. Le motif chalcone est ainsi le point de départ de la synthèse des différents groupes de flavonoïdes. (Tigrine, 2014)

4. Classification des flavonoïdes :

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de degré d'hydroxylation et de méthylation, de degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C, c'est-à-dire, la présence de double liaison C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo (Yao *et al.* 2004).

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et auronés (Havsteen, 2002), quelques classes sont cités dans le tableau 03.

Tableau 03 : présente quelques classes distinctes des flavonoïdes (Yao *et al.* 2004).

Classe	Formule	Source	Propriété
Flavanols		Raisins, thé, cacao.	-Antioxydants naturels -anticancéreuses
Flavonols		Oignon, pomme, brocoli, fruits rouges.	-antihistaminique, antiinflammatoire et antioxydante. -antihistaminique, antiinflammatoire et antioxydante. -Isorhamnétine: propriétés antioxydante.
Flavanones		Les Agrumes : orange, citron, pamplemousse, mandarine, orange amère.	-neutralisation des radicaux libres. -amélioration de l'absorption de la vitamine C. -la prévention des cancers de la peau.
Isoflavones		soja.	- phytoestrogéniques. -Source de phytoestrogènes.
Anthocyanes		Myrtille, mûre, raisin noir, aubergine, prune...	- la lutte contre le vieillissement cellulaire en améliorant l'élasticité et la densité de la peau. - Présente comme des couleurs brillant dans les fruits et les légumes. - antiseptiques urinaires.

5. Propriétés biologiques et pharmacologiques des flavonoïdes

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes qui sont des métabolites synthétisés en grande quantité par les plantes représentent un système de défense contre les microorganismes pathogènes (Bruneton, 2009). De même, les flavonoïdes protègent les

plantes contre les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et en neutralisant les espèces réactives de l'oxygène formées (Shirley, 1996). Chez l'homme, les flavonoïdes possèdent de remarquables activités biologiques et pharmacologiques qui sont activité antioxydante, activité anticancérigène, activité anti-inflammatoire, activité antiparasitaire, activité antivirale et activité antibactérienne.

5.1. Propriétés anticancéreuses des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont utilisés pour leur capacité à inhiber l'allergie, l'inflammation, les viroses, la cancérogenèse (Lagarde, 2001). Le cancer se présente habituellement comme une tumeur formée d'une masse cellulaire qui est l'aboutissement d'une série de transformation pouvant se dérouler pendant plusieurs années, donc la cancérogenèse est un processus complexe multi-séquentiel menant une cellule de l'état sain à un état précancéreux et finalement à un stade précoce de cancer (Zeghad, 2009).

Depuis longtemps, on associe le cancer et le type d'alimentation, de nombreux chercheurs ont étudié le rôle des nutriments dans le développement des cancers. Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains.

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement ; lutéoline, quercétine, Kamphérol, apigénine, taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogenèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose (Zeghad, 2009).

6. Fonctions des flavonoïdes pour les plantes

6.1. Rôle de protection contre le stress environnemental

Les plantes étant immobiles, elles ont du mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement et conserver leur forme. La dureté au gel et la résistance à la sécheresse sont parfois attribuées aux flavonoïdes et autres composés phénoliques. Il semblerait notamment que les flavonoïdes antioxydants ont un effet protecteur contre le stress attribué à la sécheresse. Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium. Ils jouent un rôle important dans la protection contre les UV en absorbant les radiations UV et en protégeant ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles. Les

flavonoïdes sont de puissants piègeurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et préviennent ainsi la peroxydation des lipides (Treutter, 2005).

Les flavonoïdes ont des *maxima* d'absorption dans la gamme des UV-B, et sont retrouvés avec des niveaux élevés dans les couches épidermiques des tissus des feuilles et dans le pollen. De plus, la synthèse de flavonoïdes est rapidement et fortement induite par l'irradiation aux UV-B, une réponse qui est médiée, au moins pour une partie, par le niveau de transcription des gènes biosynthétiques des flavonoïdes (Shirley, 1996). Dans certains cas, ce phénomène est accompagné d'une réduction de la biomasse, une diminution de la germination du pollen et une réduction de l'activité photosynthétique (Harborne *et al.*, 2000). La phénylalanine ammonia lyase (PAL), ainsi que la chalcone synthase (CHS) sont des enzymes inductibles par les UV-B. D'autres enzymes entrant dans la biosynthèse des flavonoïdes sont également inductibles par les UV, en particulier la glucose-6 phosphatase déshydrogénase, la 3-déoxy-D-arabino heptulosonate-7-phosphate synthase et la S-Adénosyl- homocystéine hydrolase (Zhang *et al.*, 2009). L'accumulation de certains isoflavonoïdes, existant de manière constitutive, est ainsi stimulée par les radiations UV-B. Il semblerait que la sensibilité des plantes aux radiations UV-B se fait à différents niveaux, notamment (Zhang *et al.*, 2009) :

- photogénération des ROS et une sensibilité des plantes à ceux-ci ;
- dégradation irréversible de l'ADN (par formation de dimères de nucléotides) ;
- absorption des radiations par des récepteurs UV-B spécifiques avec des *maxima* d'absorption vers 280-290 nm ;
- absorption des radiations par d'autres récepteurs UV-B spécifiques avec des *maxima* d'absorption vers 300-310 nm (Zhang *et al.*, 2009).

6.2. Rôles comme composés de défense

Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : ceux préformés, et ceux dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, ou sont uniquement biosynthétisés après une agression et dans ce cas on parle de phytoalexines.

Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour la défense. Mais les preuves de la relation entre la localisation et les effets bénéfiques pour la plante sont difficiles à trouver. Par exemple, l'occurrence de flavanols

dans le noyau de plusieurs espèces d'arbres est encore à débattre. Des études microscopiques mettent en évidence la présence de flavanols dans les anthères de *Camellia sinensis* pendant l'anaphase et la prophase, mais la fonction des flavanols à ce niveau est encore obscure (Treutter, 2005).

6.3. Activité antifongique

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994). Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *Candida albicans*. Alors que plusieurs flavones polyméthoxylées sont actives contre *Aspergillus flavus* (Cushnie *et al.*, 2005).

Le groupe des ptérocarpanes regroupe de nombreux antifongiques. Il semblerait que l'activité des ptérocarpanes soit due à la configuration particulière de ces molécules (structure plane), de plus, la présence de substituants oxygénés en position 3 et 9 apparaît comme essentielle à l'activité (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Quelque soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008 ; Grayer *et al.*, 1994). De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité mais pas essentielle (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Chapitre 03

Le Docking moléculaire

1. Généralité :

De façon générale, le but du docking est de prédire la structure du complexe formé par un ligand et son récepteur. Plus particulièrement, dans les travaux présentés ici, les ligands sont des petites molécules destinées à inhiber l'activité d'une protéine, qui constitue le récepteur.

Historiquement, les premiers outils de docking obéissaient au principe dit « lock-and key » (principe « clef-serrure ») selon lequel le ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure (Elkaim, 2011).

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation des systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques. Connaître la façon dont les protéines interagissent avec d'autres entités biochimiques est une étape essentielle pour comprendre les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées.

Le docking moléculaire est l'étude *in silico* des différents mécanismes et interactions qui interviennent lorsque plusieurs structures moléculaires s'assemblent, l'objectif étant de parvenir à déterminer comment ces molécules vont s'agencer les unes par rapport aux autres. Il existe deux grands types de docking moléculaire. Le docking rigide consiste à obtenir la conformation préférentielle d'un système protéine-ligand en considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe. Dans ce cas, la relaxation de la géométrie interne de chaque entité, en interaction dans le complexe, n'est pas prise en compte. Cependant, il est tout à fait concevable que les structures de la protéine et du ligand soient modifiées durant le processus de docking moléculaire afin d'optimiser au mieux l'interaction entre les deux entités. On parle, dans ce cas, de docking flexible (Teniou, 2012). A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont respectivement : AutoDock, **GOLD**, FlexX, DOCK et ICM (Mokrani, 2012).

Tableau 4 : 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

2. Principe théorique :

Docking (ancrage ou amarrage en français) et le nom donné aux simulations moléculaires dans les quelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interactions entre deux molécules. Dans la plus part des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible de docking) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand). Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine (baillet, 2003). Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (figure 12).

- ☞ La première (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- ☞ La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées (Baillet, 2003 ; Beutraït, 2008).

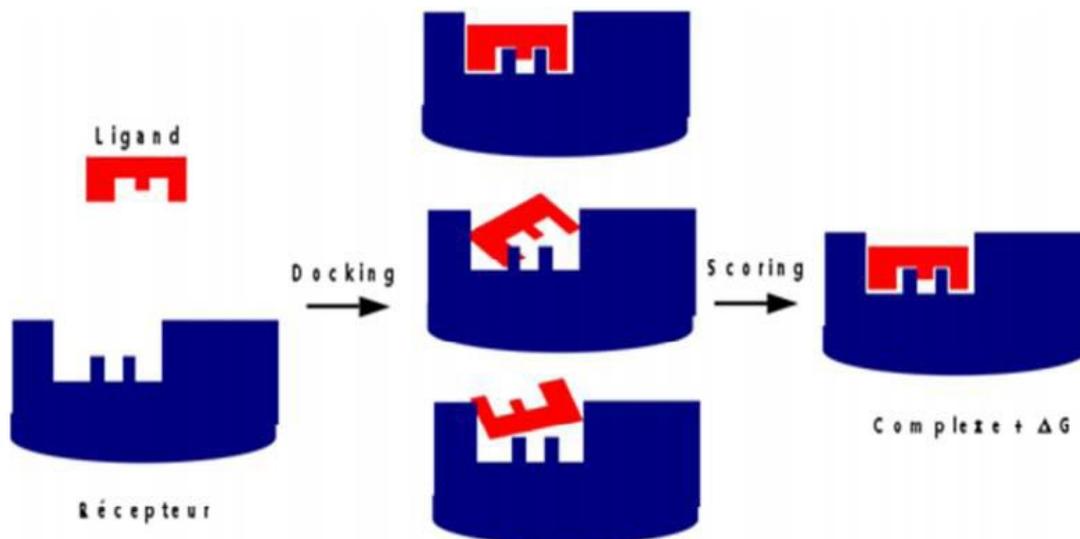


Figure 12 : Principe générale d'un programme de docking.

3. Le programme GOLD :

Le programme GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) est l'un des programmes de docking les plus réussis et largement utilisés, provient d'une collaboration entre l'Université de Sheffield, GlaxoSmithKline plc et CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*). Il est basé sur trois parties majeures (Brauer, 2007) : un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison.

3.1. Algorithme de GOLD :

GOLD utilise un algorithme génétique pour le docking de petites molécules (ligand) dans le site actif d'une protéine. Il considère le ligand comme flexible alors que la protéine est maintenue fixe sauf pour les groupements hydroxyles de certains résidus à savoir Tyrosine, Serine et Thréonine (Bruno et Goms, 2003).

L'algorithme génétique est basé sur le principe de la sélection naturelle, développé par

Charles Darwin en 1838. Les algorithmes génétiques fonctionnent par une génération successive d'individus ou structures du ligand. Chaque individu possède des gènes se sont ses caractéristiques. La méthode comporte trois phases

: reproduction, *crossover*, mutation. La phase de reproduction vise à identifier les individus pouvant donner une autre génération.

Pour la première génération les éléments sont créés au hasard pour éviter la dépendance vis-à-vis de la structure de départ. Pour les générations suivantes elles sont composées des meilleurs éléments de la génération précédente sélectionnés par une fonction d'évaluation. Dans notre cas il s'agit souvent d'une fonction basée sur la Fitness. Durant la phase de *crossover*, les gènes des individus sélectionnés sont échangés 2 à 2 pour créer la nouvelle génération, le lieu de croisement est déterminé au hasard. La troisième étape est la mutation, certains individus peuvent être le résultat de mutations où un gène est modifié de façon aléatoire. Le cycle de génération est répété jusqu'à ce que soit atteint le nombre maximum de générations ou le nombre maximum d'évaluations de l'énergie (Brute, 2009 ; Cabarrot, 2008).

3.2 . Le mécanisme du placement du ligand dans le site actif :

GOLD utilise une méthode unique pour ce faire, qui est fondée sur les points de fixation, il ajoute des points de fixation aux groupements de liaisons hydrogènes sur la protéine et le ligand, puis il va cartographier les points accepteurs qui se trouvent dans le ligand sur les points donateurs dans la protéine et vice versa. En outre, GOLD génère des points de fixation hydrophobiques dans la cavité de la protéine sur laquelle les groupements CH du ligand sont mappés (Cauvin, 2015).

4. La fonction de score :

GOLD utilise différentes fonctions de score pour le processus d'optimisation (Chikhi, 2007) : **GoldScore** (une fonction de score basée sur le champ de force), **ChemScore**, **ASP** (Astex Statistical Potential), **CHEM PLP** (Piecewise Linear Potential) et **User Defined Score**.

Cependant, Goldscore est la fonction originale pour GOLD, issue des travaux de Willet.

Cette fonction est la somme de quatre éléments (Chikhi, 2007 ; Bourotte, 2004):

$$\text{GOLD Fitness} = Shb_ext + Svdw_ext + Shb_int + Svdw_int$$

☞ *Shb_ext* est l'énergie de liaison hydrogène entre le récepteur et le ligand.

- ☞ ***Svdw_ext*** est l'énergie des forces de Van der Waals (vdw) entre le récepteur et le ligand.
- ☞ ***Shb_int*** est l'énergie de liaison hydrogène interne du ligand ;
- ☞ ***Svdw_int*** est le résultat de la contrainte intramoléculaire dans le ligand.

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. Dans les programmes de docking, on trouve différents types de fonction de score : celles utilisant un champ de force de mécanique moléculaire, celles reposant sur les connaissances actuelles et les méthodes empiriques.

Chapitre 04

Matériel et méthodes

Matériel :**1. Microordinateur :**

Dans notre étude, nous avons utilisé une station puissante (processeur Intel Core I7 2.8 GHz, 8 Go de RAM, plateforme: Windows7). Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7 (64bits).

2. Programmes :**2.1. PyMOL :**

PyMOL est un logiciel de visualisation moléculaire, créé par Warren Delano. En plus d'offrir de nombreuses possibilités de rendus en 3D, le logiciel PyMOL permet de réaliser des animations, des alignements de structure, de générer des structures, etc.... Il est l'un des outils le plus utilisé dans la publication scientifique. Il s'agit d'un logiciel libre et gratuit (Jérôme, 2014).

La fenêtre inférieure contient également " la fenêtre de visualisation." Ce contiendra une liste des objets moléculaires une fois que tu as chargé une structure de protéine.

C'est dans cette fenêtre que la majorité du travail s'effectue. Elle permet de visualiser les différents Objets, de modifier les styles de visualisation, de réaliser des sélections,

La partie principale de L'écran sert à visualiser les molécules chargée.

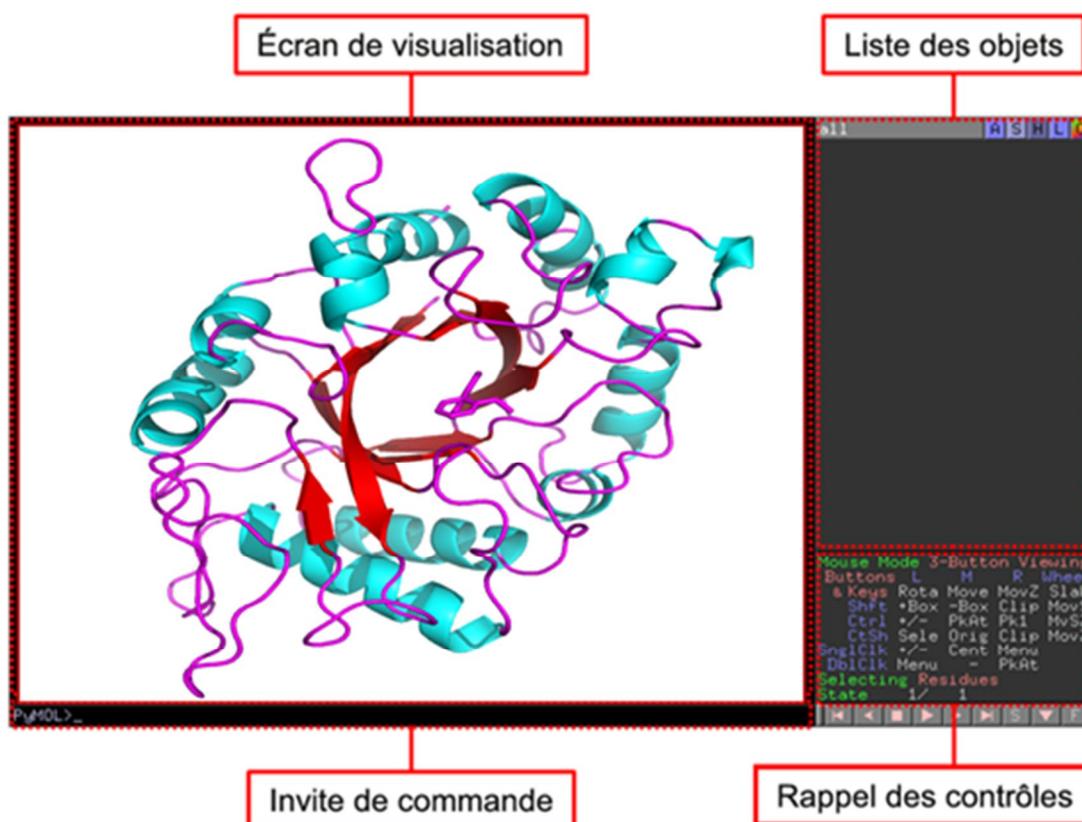


Figure13.La fenêtre de visualisation.

2.2. GOLD

GOLD est un programme de calcul des modes de docking de petites molécules dans les sites de liaison des protéines et est fourni dans le cadre de GOLD Suite, un ensemble de programmes pour la visualisation et la manipulation des structures (Hermes v 1.4), pour l'arrimage protéine-ligand (GOLD v 5.0.1) et pour le traitement et la visualisation des résultats de docking (GoldMine v 1.3).

Ses principaux avantages sont sa fiabilité à prédire des structures cristallographiques pour des complexes de type protéine-ligand et l'emploi d'un algorithme génétique efficace. De plus, le logiciel dispose d'une interface graphique simple d'emploi, et aisément scriptable et s'adapte particulièrement bien aux environnements de calcul parallèle.

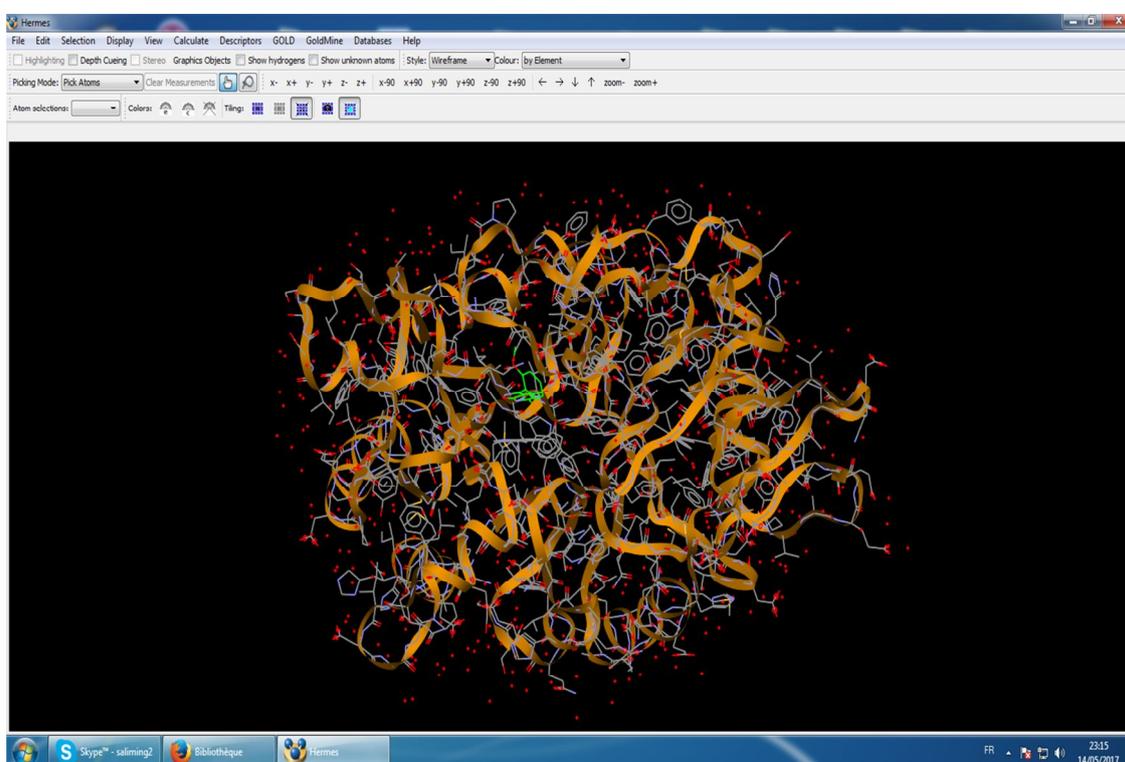


Figure 14.L'interface graphique du GOLD.

2.2.1. Hermes :

Hermes est un programme permettant de visualiser la structure des protéines en trois dimensions. Ses caractéristiques comprennent [1] :

- La capacité de lire les structures des protéines et de ligand à partir de fichiers externes.

- Une gamme d'options de visualisation 3D, y compris le choix des modèles d'affichage, les couleurs, la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les atomes, les résidus, les ligands, les molécules d'eau, ...etc.
- La capacité de mesurer et afficher les distances, les angles et les angles de torsion ;
- La capacité de trouver et montrer les liaisons hydrogène ;
- La possibilité d'enregistrer les fichiers ;
- La possibilité de modifier les ligands ;
- La possibilité de charger et de visualiser les surfaces contournées.

3. Les banques des données :

3.1. La banque de données protéiques (PDB) :

La banque de données protéiques (Protein Data Bank) est la principale source de données de biologie structurale et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont principalement déterminées par les deux méthodes la cristallographie à rayons X et la RMN. Les structuralistes du monde entier sont tenus d'y déposer leurs données expérimentales, de cette façon elles appartiennent au domaine public [2].



Figure 15.L'interface graphique du site web de la base de donnée PDB.

3.2. Pubchem

Pubchem est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par la *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), branche de la Bibliothèque nationale de médecine des États-Unis sous l'autorité de la *National Institutes of Health* (NIH) (Murray, 2001).

PubChem répertoire plusieurs millions de composés en mettant en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres chimique, biochimique, Pharmacologique, production, toxicologie.



Figure 16. L'interface graphique du site web de la base de donnée Pubchem.

4. Structure des chitinases utilisées

Vingt structures tridimensionnelles pour la chitinase d'*Aspergillus fumigatus* sont disponibles sur la PDB, identifiées par les codes, 1W9P, 1W9U, 1W9V, 1WNO, 2A3A, 2A3B, 2A3C, 2A3E, 2IUZ, 2XTK, 2XUC, 2XVN, 2XVP, 2Y8V, 3CH9, 3CHC, 3CHD, 3CHE, 3CHF et 4TX6. Les structures, **2IUZ**, **2XTK**, **2A3E**, **2A3C**, constituent un compromis entre une bonne résolution et la présence d'un inhibiteur cocrystallisé.

Pour le docking, nous avons choisi parmi les 4 structures de chitinase fongique étudiées celle portant le code **2IUZ** car elle présente la meilleure résolution soit 1.95 Å.

Les caractéristiques de ces enzymes sont regroupées dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Structure des chitinases fongiques utilisées.

Code PDB	Organisme	Ligand cocristallisé	Résolution	Référence
2IUZ	<i>Aspergillus fumigatus</i>	C2-Dicaffeine	1.95 Å	Schüttelkopf <i>et al.</i> , 2006
2A3E	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Allosamidin	1.95 Å	Rao <i>et al.</i> , 2005
2XTK	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Allosamidin	2.00 Å	Alexander W <i>et al.</i> , 2010
2A3C	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Pentoxifylline	2.07 Å	Rao <i>et al.</i> , 2005

Méthodes

1. Préparation des molécules à l'arrimage

Le complexe protéine-ligand est téléchargé dans le format *.pdb* à partir de la banque de données en introduisant son code pdb.

GOLD utilise directement le format *.pdb* et n'a pas besoin d'une préparation préalable.

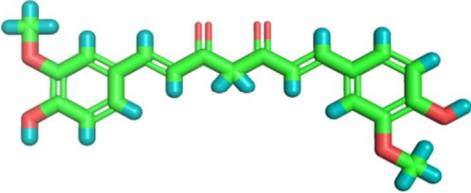
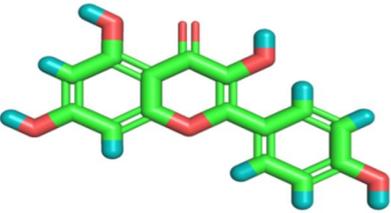
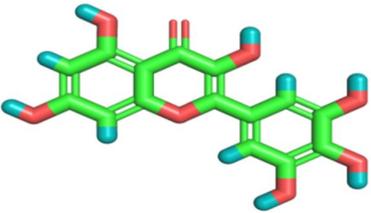
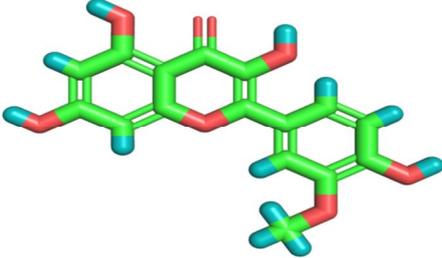
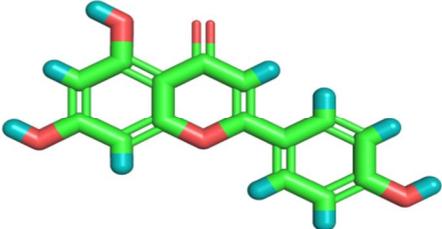
2. Préparation des ligands

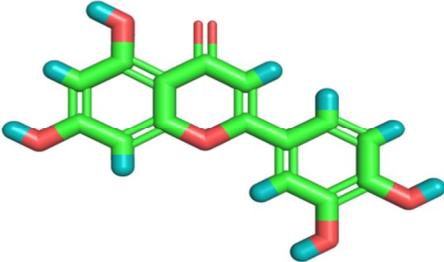
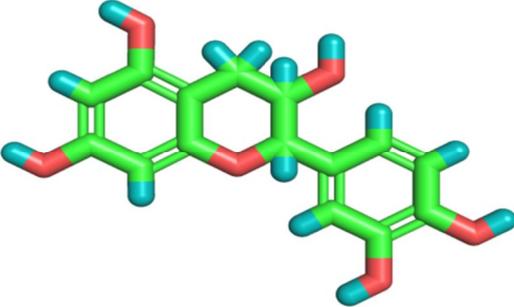
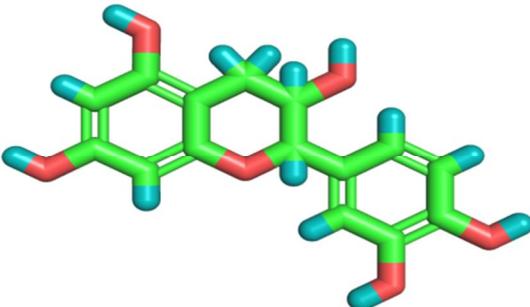
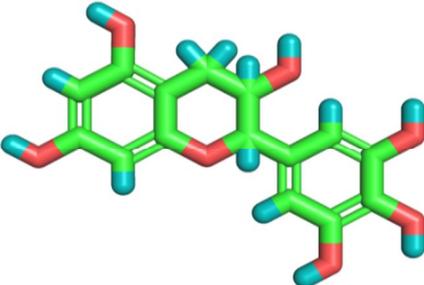
Les structures des 15 molécules retenues pour le docking, la quercétine, le kaempférol, la myricétine, l'isorhamnétine, l'apigénine, la lutéoline, la chrysine, la catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine, l'épicatéchine gallate, l'épigalocatechine, l'épigalocatechine gallate, la naringénine, curcumine, ont été téléchargées de la base de données PubChem(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) du National Center for Biotechnology Information, sous format SDF 2D.

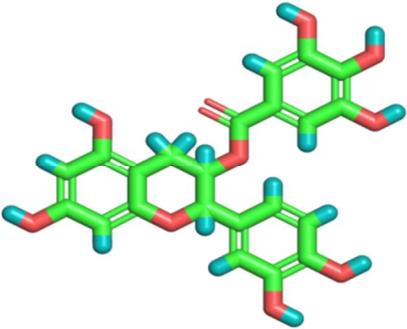
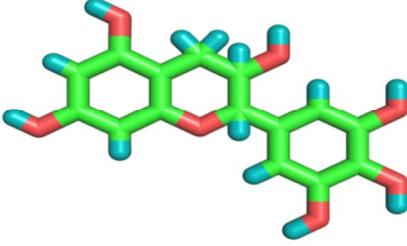
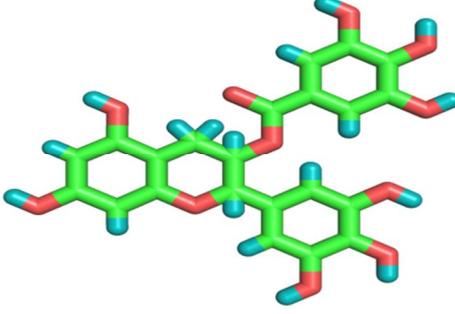
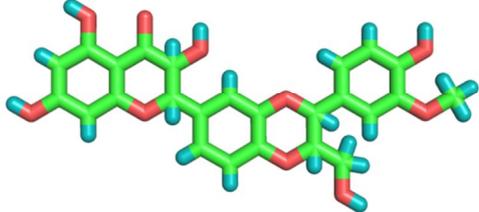
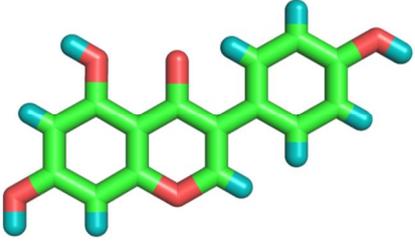
Les structures ont été converties au format 3D par LigPrep. Elles sont ensuite transformées dans le format *.mol2* par l'intermédiaire du programme disponible gratuitement **mol2mol**.

Toutes les structures chimiques des composés ligands utilisés dans l'étude ont montré sur Le tableau 6.

Tableau 06 : Représentation des structures 2D et les formules des flavonoïdes.

Nom des flavonoïdes	Structures 2D	Formules
Curcumine		C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Quercétine		C ₁₅ H ₁₀ O ₇
Kaempférol		C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Myricétine		C ₁₅ H ₁₀ O ₈
Isorhamnétine		C ₁₆ H ₁₂ O ₇
Apigénine		C ₁₅ H ₁₀ O ₅

<p>Lutéoline</p>		<p>$C_{15}H_{10}O_6$</p>
<p>Catéchine</p>		<p>$C_{15}H_{14}O_6$</p>
<p>Epicatéchine</p>		<p>$C_{15}H_{14}O_6$</p>
<p>Gallocatéchine</p>		<p>$C_{15}H_{14}O_7$</p>

<p>Lépicatéchine gallate</p>		<p>$C_{22}H_{18}O_{10}$</p>
<p>Epigallocatechine</p>		<p>$C_{15}H_{14}O_7$</p>
<p>Epigallocatechine gallate</p>		<p>$C_{22}H_{18}O_{11}$</p>
<p>Silybinine</p>		<p>$C_{25}H_{22}O_{10}$</p>
<p>Génistéine</p>		<p>$C_{15}H_{10}O_5$</p>

3. Les différentes étapes de docking

Après l'ouverture du visualiseur *Hermes*. On ouvre la fenêtre *GOLD setup wizard*, en cliquant sur *Wizard*. Le complexe *enzyme-ligand.pdb* sera téléchargé, en cliquant sur le bouton *LoadProtein*.

Les étapes suivantes sont nécessaires :

3.1. Addition des hydrogènes

Tous les atomes d'hydrogène doivent être présents dans le fichier d'entrée des protéines.

3.2. Suppression des molécules d'eau

Les molécules d'eau dans les cavités des protéines peuvent parfois être un élément fondamental. Elles sont capables d'assurer le relais entre le récepteur et le ligand et ainsi créer des réseaux de liaisons hydrogène. Dans nos études, nous n'avons pas mis en évidence l'intérêt d'introduire des molécules d'eau. Un clic sur l'option *DeleteRemaining Waters* permet l'élimination des molécules d'eau.

3.3. Suppression des ligands

Le fichier protéine peut avoir un ou plusieurs ligands occupant le site de liaison qui doit être enlevé avant de pouvoir effectuer un docking. En cliquant sur *Delete Ligands* de la liste des options proposées, puis sur le bouton *Extract*. Le ligand extrait est enlevé du fichier de la protéine et automatiquement rechargé dans *Hermes* de sorte qu'il puisse être employé pour définir le site de liaison. Le ligand est sauvegardé sous forme *ligand.mol2*.

3.4. Définition de site de liaison

Il est nécessaire de préciser le site de liaison de l'enzyme, en cliquant sur *Define Binding Site* de la liste *Global Options* puis choisir l'option *One or more ligands*. Une liste de ces ligands actuellement chargés dans le visualiseur *Hermes* sera montrée. Choisissez le ligand d'référence que vous souhaitez utiliser à partir de cette liste.

3.5. La sélection du Ligand

Pour sélectionner le ligand, appuyer sur *Add*. Choisir *ligand.mol2* puis cliquer sur *Open*. Le *ligand.mol2* sera inscrit au *Ligand File*.

3.6. La fonction de score

La fonction *Goldscore* est utilisée dans le cadre du docking, pour l'évaluation de l'énergie des systèmes protéine-ligand.

3.7. Run GOLD

Avant de terminer la mise en place de notre arrimage, cliquer sur l'option *Advanced*, sélectionner *Output Options*. Cette page est séparée en trois vues tabulées : *File Format Options*, *Information in File* et *Selecting Solutions*, permettent de contrôler les informations des fichiers de sortie.

Enfin, le choix de l'option *Run GOLD* dans le menu permet de lancer les calculs. Une fois le travail terminé, le message *Finished Docking Ligand* apparaîtra dans la fenêtre *Run GOLD*. Les résultats de docking sont présentés sous forme de 5 fichiers de sortie, pouvant être observés dans la fenêtre *Run GOLD*:

- Les fichiers contenant des informations sur la protéine et le ligand initialisé (*gold_protein.mol2* et *gold_ligand.mol2*) ;
- Les fichiers contenant le ligand docké (*gold_soln_ligand_m1_n.mol2*) ;
- Les fichiers contenant le score de Fitness (*ligand_m1.rnk* et *bestranking.lst*) : les tentatives d'amarrage sont énumérées selon le score de Fitness. Donc, la meilleure solution est placée en premier ;
- Les fichiers log des protéines et de ligand (*gold_protein.log* et *gold_ligand_m1.log*);
- Les fichiers contenant les messages d'erreur (*gold.err*).

4. Filtrage selon la règle de 5 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.
- Un coefficient de partition octanol / eau "logP" ou une lipophilie ≤ 5
- Possède un nombre de **liaisons rotatives** inférieur à 15.

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>

- ☞ Ouverture du site web indiqué au-dessus.
- ☞ Entrer l'inhibiteur dans la case « **Enter SMILES** ».
- ☞ Click sur le bouton « **calculate properties** ».

Chapitre 05

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1. Fiabilité de programme utilisé

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la chitinase par diverses molécules, nous avons tenté d'évaluer la fiabilité du logiciel GOLD utilisé dans cette étude. La performance de ce programme est jugée au moyen de deux critères différents :

- ☞ L'écart quadratique moyen ou le RMSD (*Root Mean Square Déviation*).
- ☞ L'analyse visuelle.

1.1. 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 moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (*root mean-square dérivation*) entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Un seuil maximal de 2Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne position d'une mauvaise position (Bensegueni, 2007).

Dans notre cas, le test de fiabilité du programme GOLD par le RMSD a été réalisé sur **04** complexes de la chitinase fongique disponibles dans la PDB.

Les codes PDB des complexes et de leurs inhibiteurs ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus avec GOLD sont mentionnés dans le tableau 07.

Tableau 7 : Valeurs de RMSD des quatre complexes chitinase-inhibiteurs étudiés.

Code PDB	Ligand co-cristallisé	RMSD (Å)
2a3e	Allosamidine	0.558
2iuz	C2-Dicaffeine	0.611
2a3c	Pentoxifylline	1.461
2xtk	Allosamidine	1.467

Sur les quatre complexes chitinase-inhibiteur étudiés, le programme GOLD simule correctement les interactions, avec des valeurs de RMSD inférieurs à 2 Å. Ceci prouve davantage que ce programme est bien adapté à l'étude *in silico* de l'inhibition de la chitinase qui nous intéresse ici.

Conclusion :

Le test par le RMSD nous permet de conclure, que le programme GOLD peut être utilisé pour prédire les interactions enzyme-inhibiteurs. Il est généralement plus efficace en présence de petites molécules de ligand.

1.2. L'analyse visuelle

L'analyse visuelle par GOLD est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD. Elle permet de déterminer si un ligand simulé se superpose avec le ligand Co-cristallisé. (figures : 17, 18 ; 19 ;20 et 21).

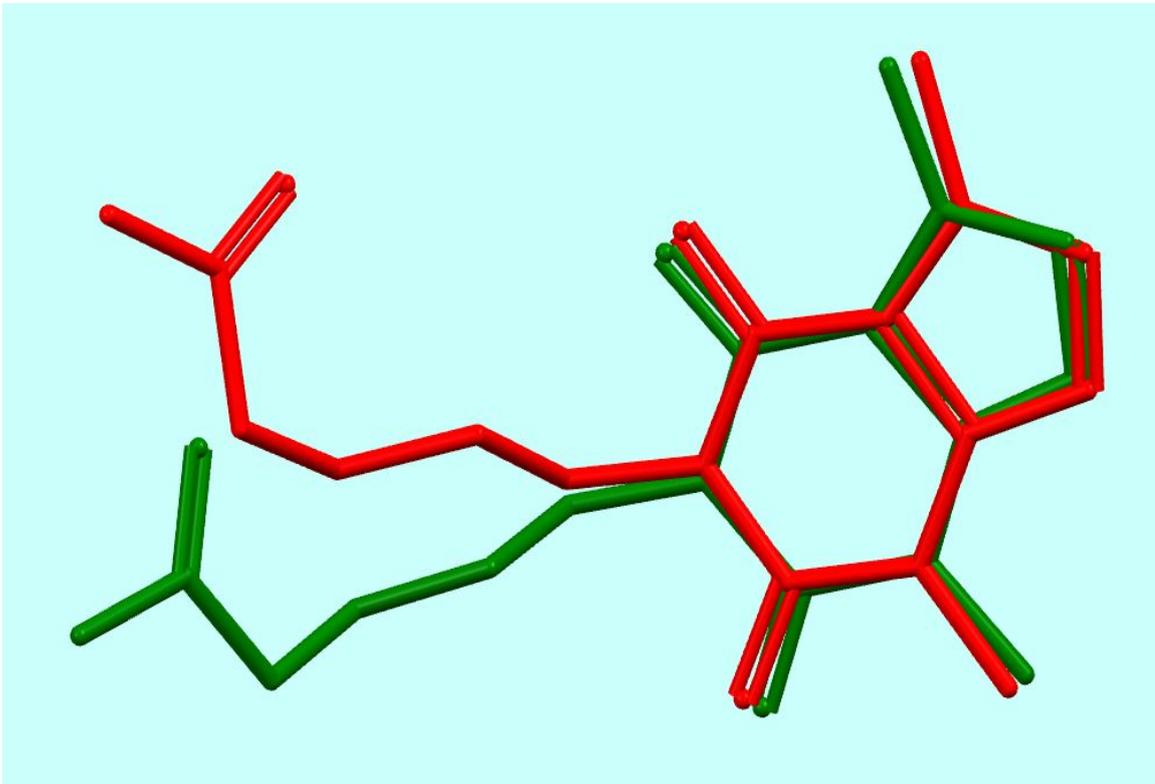


Figure 17. Superposition des géométries de l'inhibiteur Pentoxifylline donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb 2a3c. RMSD = 1.461 Å). Image générée par GOLD.

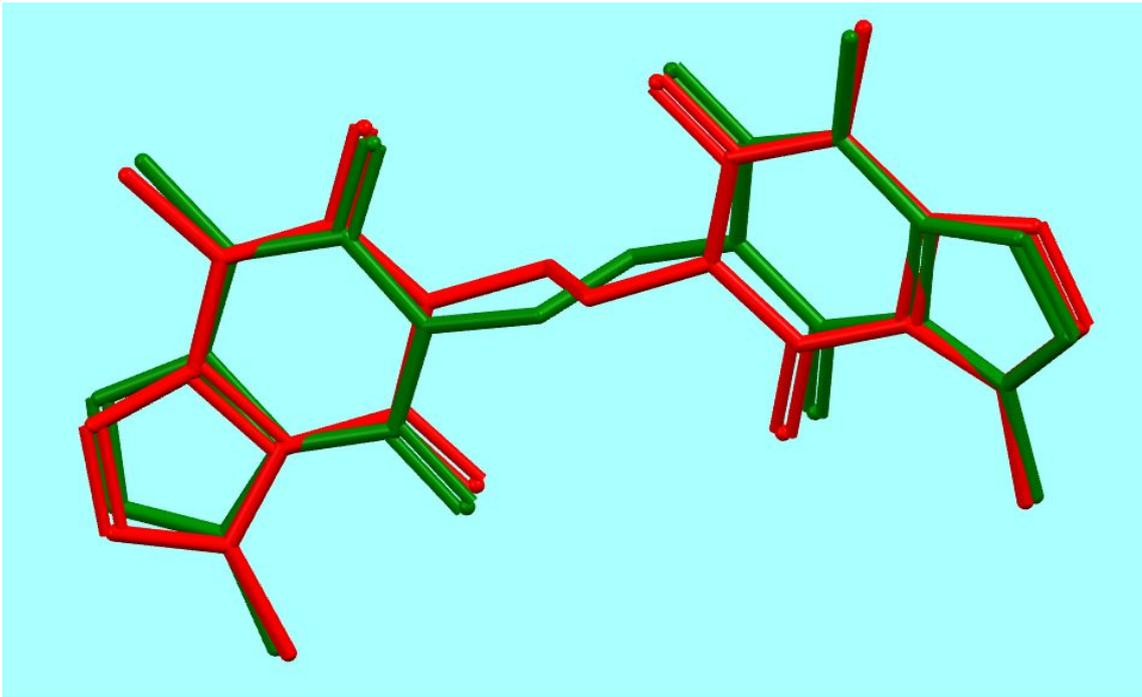


Figure 18. Superposition des géométries de l'inhibiteur **C2-Dicaffeine** donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb **2iuz**. RMSD= **0.611 Å**). Image générée par GOLD.

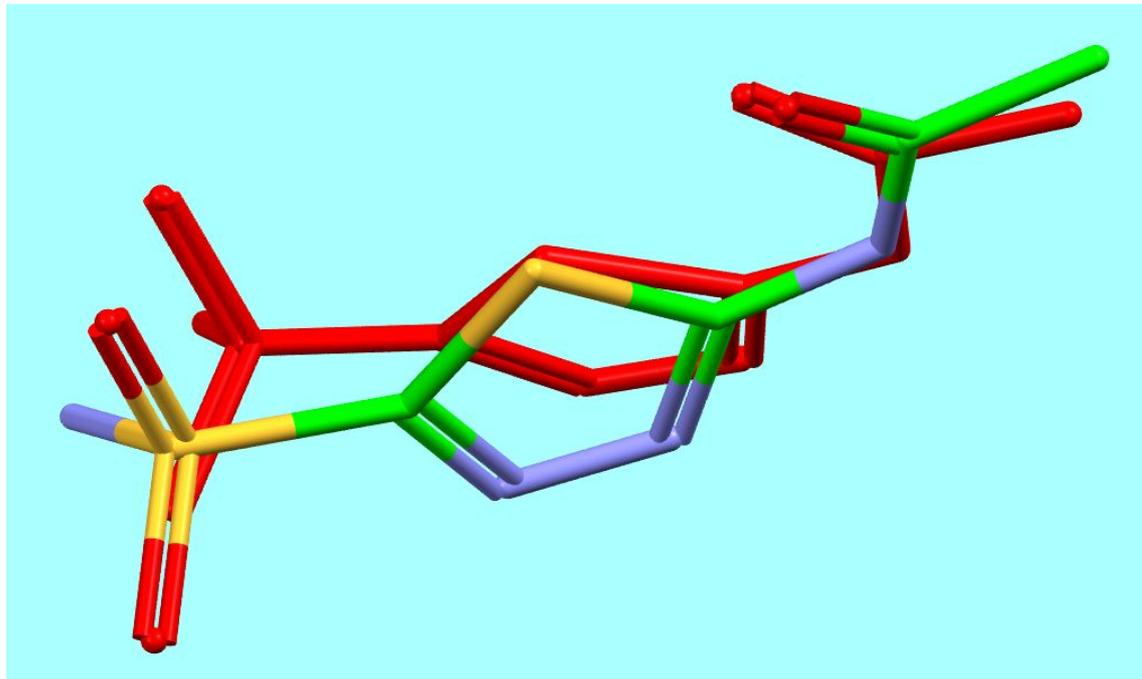


Figure 19. Superposition des géométries de l'inhibiteur **Allosamidine** donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb **2xtk**. RMSD= **1.467 Å**). Image générée par GOLD. Image générée par GOLD.

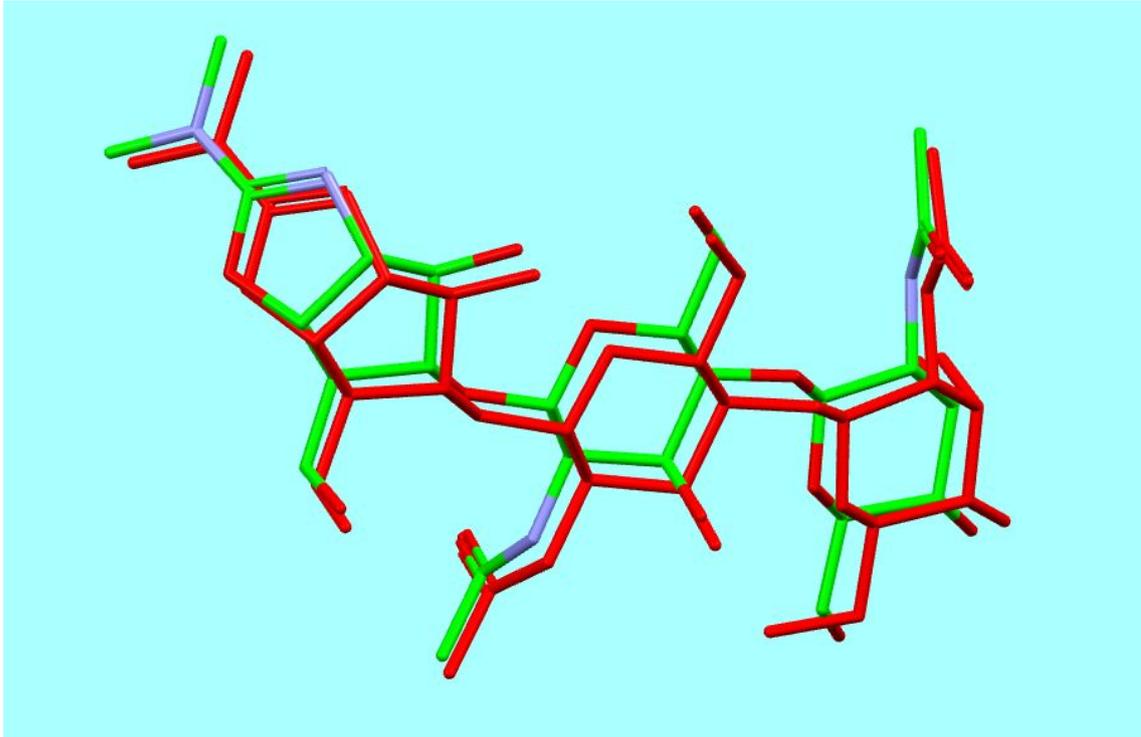


Figure 20. Superposition des géométries de l'inhibiteur Allosamidine donnée par rayons X (coloré en vert) et par docking avec GOLD (coloré en rouge). (Code pdb 2A3E. RMSD= 0.558 Å). Image générée par GOLD.

Conclusion :

En effet, l'analyse visuelle par GOLD réalisée sur les quatre complexes chitinase fongique-inhibiteurs cités plus haut montre que les modèles des ligands simulés par GOLD sont correctement placés dans le site actif de la chitinase fongique. Ils présentent des conformations spatiales très proches voir même superposables à celles déterminées expérimentalement par cristallographie qu'on retrouve dans la PDB.

2. Le docking des diverses molécules sur le récepteur 2IUZ par GOLD

2.1. Le complexe chitinase-inhibiteur (C2-Dicaffeine)

Notre démarche consiste d'abord d'étudier l'interaction avec C2-Dicaffeine, inhibiteur de la cible.

A l'aide du programme *Pymol*, nous avons pu définir les résidus de la cavité catalytique de la chitinase fongique (2IUZ) en visualisant ceux entourant l'inhibiteur C2-Dicaffeine dans un périmètre de 5Å.

La figure (21) montre les résidus du site actif de la chitinase fongique en complexe avec l'inhibiteur C2-Dicaffeine, ces résidus sont : TRP52 PHE76 GLY136 TRP137 THR138 TYR139 ASP175 GLU177 MET243 TYR245 ASP246 TYR299 ARG301 TRP384.

L'inhibiteur (figure 22) est en représentation de différents couleurs, et les acides aminés du site actif de l'enzyme sont représentés en orange.

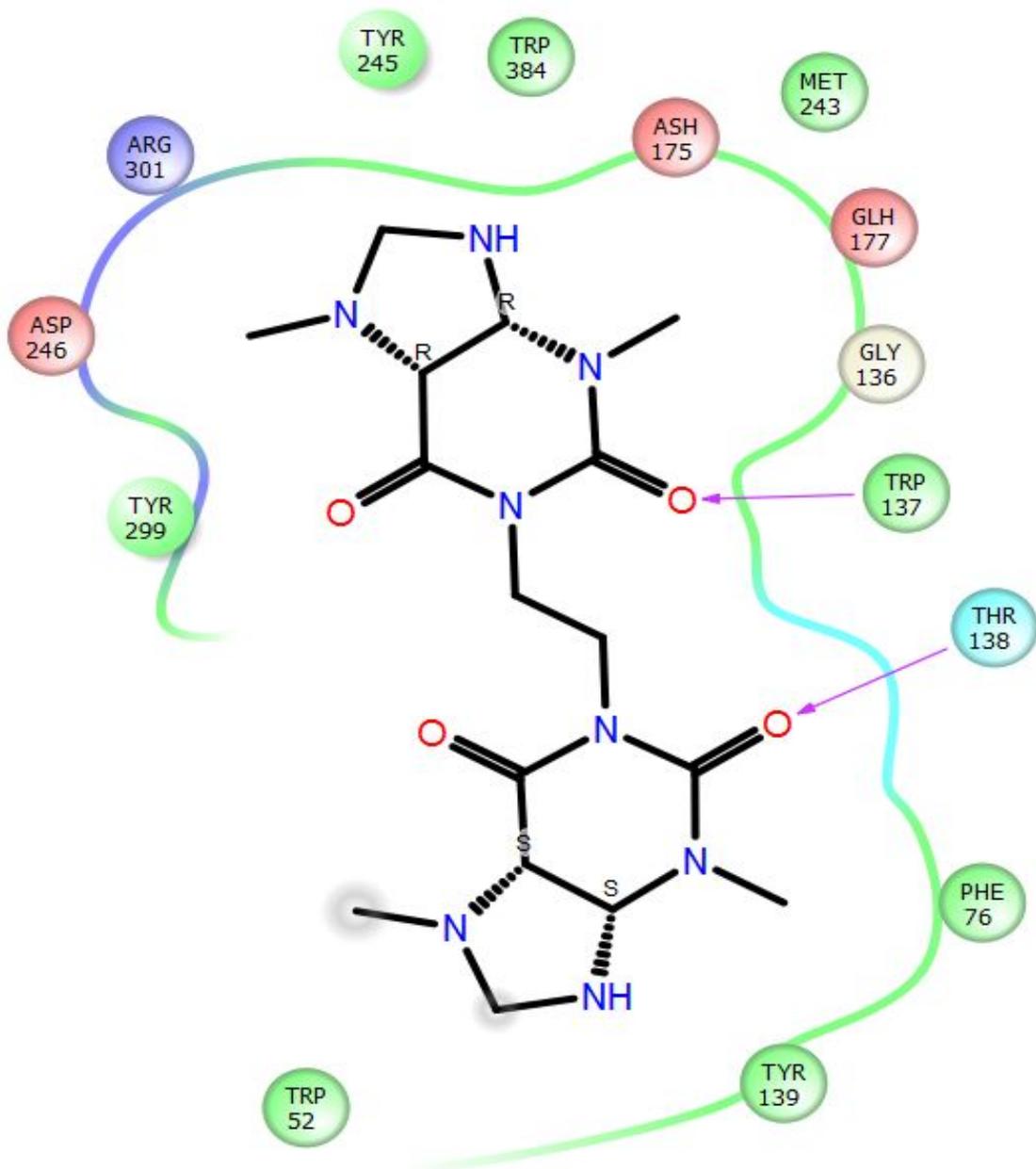


Figure 21. Diagramme d'interaction de l'inhibiteur C2-Dicaffeine avec la chitinase fongique (2IUZ).

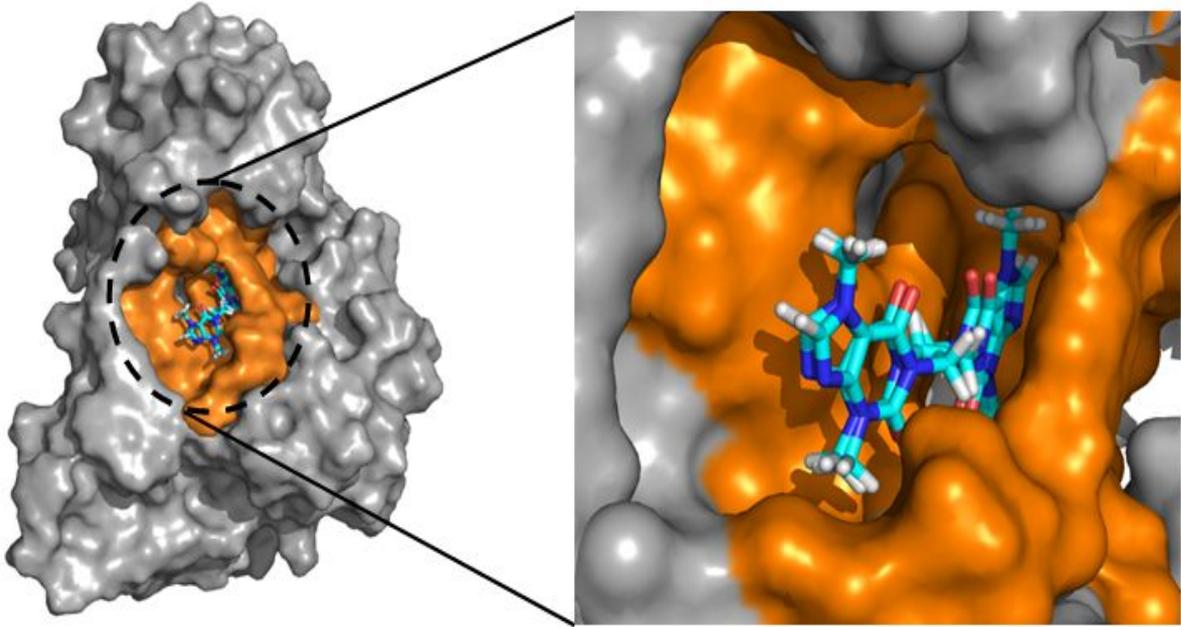


Figure 22. Emplacement de C2-Dicaffeine dans le site actif de la chitinase fongique (code PDB : 2IUZ). Image générée par *Pymol*.

L'analyse visuelle réalisée par GOLD montre que C2-Dicaffeine est bien placée dans le site actif de la chitinase fongique où il est stabilisé par quatre liaisons hydrogènes grâce aux acides aminés suivant : TRP137, THR138, TYR139. (Tableau 8 ; figure 23)

Tableau 8: les interactions hydrogènes entre la chitinase fongique et le C2-Dicaffeine.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
TRP137 (N)	O	3.036
THR138 (N)	O	2.799
TYR139 (N)	C	2.865
TYR139 (N)	C	2.829

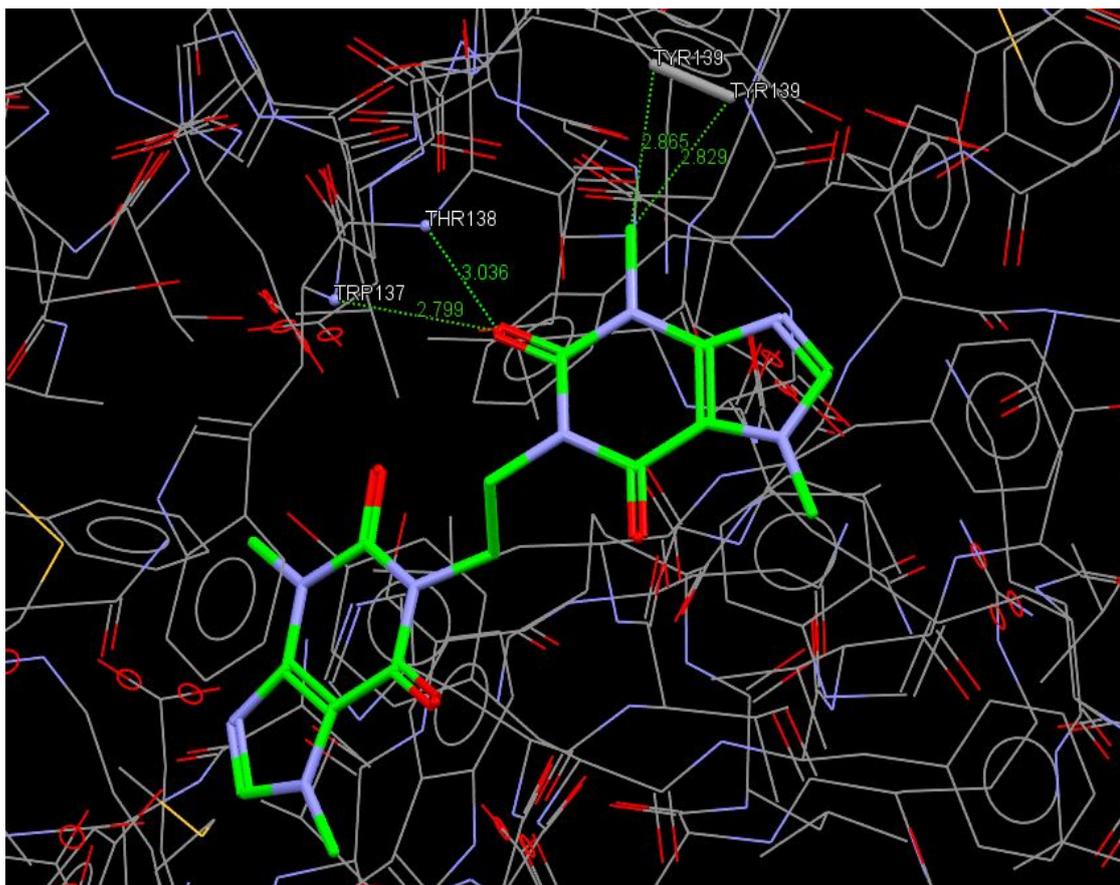


Figure 23. Mode de liaison de la C2-Dicaffeine avec le site actif de la chitinase fongique (code pdb : 2IUZ). Image générée par GOLD.

2.2. Le docking des différents flavonoïdes sur le récepteur 2IUZ :

Le docking de 15 flavonoïdes est effectué sur la structure de la protéine Cocrystallisée avec le C2-Dicaffeine

Nous avons jugé intéressant de tester ces flavonoïdes, de comparer leurs scores (GOLD score) par rapport au ligand cocrystallisé (**C2-Dicaffeine**), pour proposer le meilleur inhibiteur de l'enzyme chitinase fongique.

Les résultats de docking sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Résultats de docking avec le programme GOLD.

N	Molécules	GOLD score (Kcal/mol)
1	C2-Dicaffeine (Inhibiteur)	82.27
2	Gallocatéchine gallate	89.86
3	Curcumine	85.41
4	Silybinine	79.03
5	Myricétine	77.60
6	Quercétine	76.12
7	Isorhamnétine	75.47
8	Lutéoline	74.73
9	Epigallocatechine gallate	74.70
10	Kaempférol	73.40
11	Apigénine	72.97
12	Epicatéchine	72.05
13	Catéchine	68.20
14	Lépicatéchine gallate	72.04
15	Gallocatéchine	69.60
16	Epigallocatechine	69.47

Parmi les complexes qui figurent dans le tableau 9, nous avons retenu les meilleurs résultats uniquement. C'est-à-dire ceux qui présentent un meilleur score de docking (Valeur d'énergie d'interaction) supérieures à celles du ligand de référence (cocristallisé).

La majorité des flavonoïdes testés par le programme GOLD possèdent une énergie d'interaction proche à celle de ligand initial (inhibiteur).

La Gallocatéchine gallate et la Curcumine ayant des Goldscore excellents : 89.86 Kcal/mol et 85.41 Kcal/mol respectivement (le score d'inhibiteur cocristallisé (C2-Dicaffeine) est 82.27 Kcal/mol), pourraient avoir une activité potentielle très puissante contre la chitinase fongique.

2.2.1. Etude des interactions du Gallocatéchine gallate avec la chitinase fongique

Le mode d'interaction de ce composé avec la chitinase fongique a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle (figure 24 et 25) montre que le Gallocatéchine gallate forme quatre ponts hydrogène avec le site actif de la chitinase fongique. (Tableau 10).

Tableau 10 : Les ponts hydrogènes entre la chitinase fongique et le Gallocatéchine gallate.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
ARG57 (N)	O	2.907
ARG57 (N)	O	2.905
THR138 (N)	O	2.883
TYR139 (N)	O	2.892

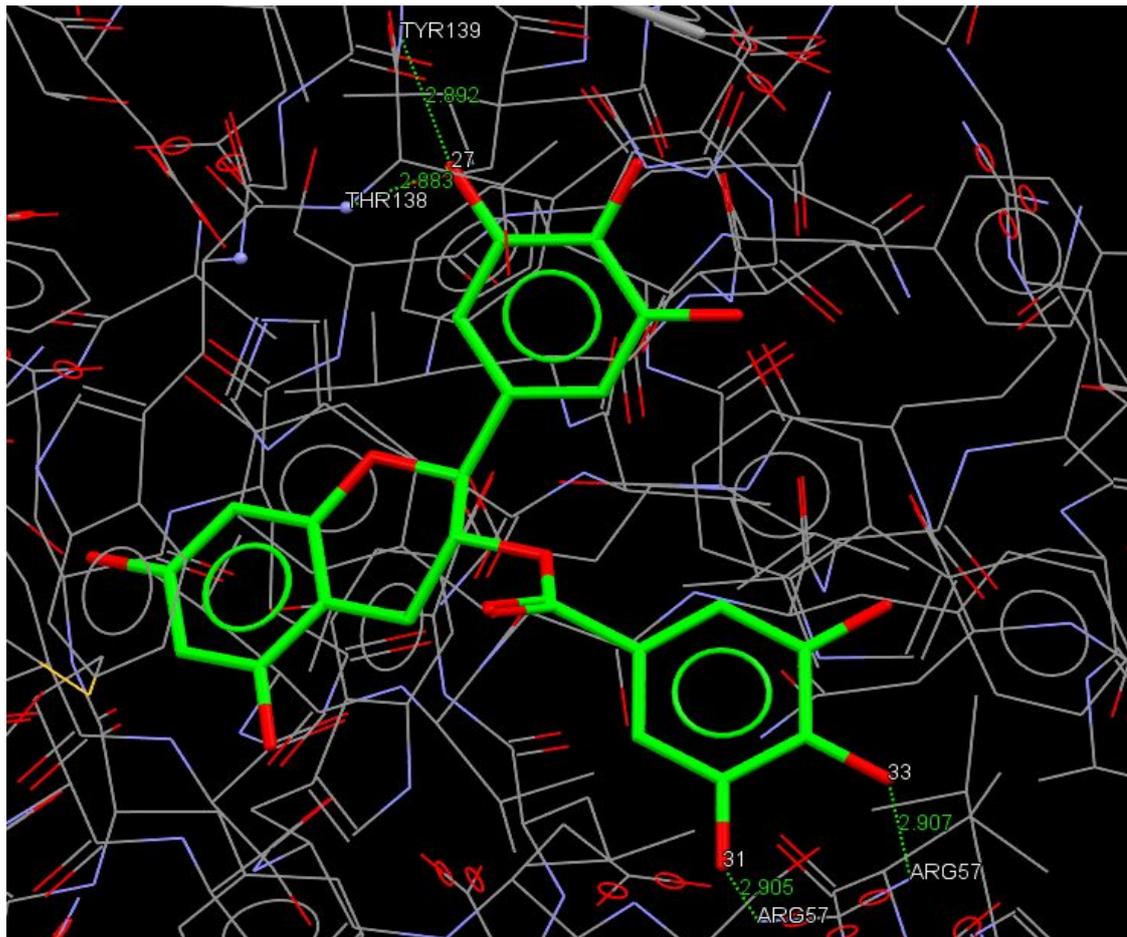


Figure 24. Représentation de liaison hydrogène formée par le Gallocatéchine gallate. Image générée par GOLD.

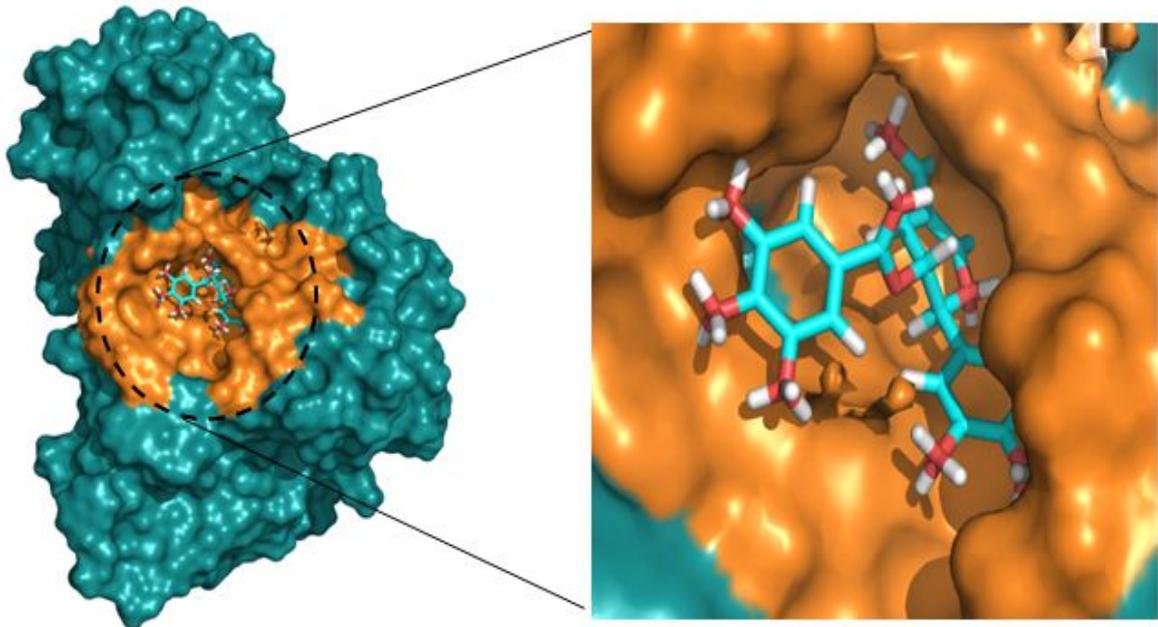


Figure 25. Emplacement de Gallocatéchine gallate dans le site actif de la chitinase fongique. Image générée par *Pymol*.

2.2.2. Etude des interactions du Curcumine avec la chitinase fongique

Le mode d'interaction de ce composé avec la chitinase fongique a été étudié avec GOLD. L'analyse visuelle (figure 26 et 27) montre que le Curcumine forme trois ponts hydrogène avec le site actif de la chitinase fongique. (Tableau 11).

Tableau 11 : Les ponts hydrogènes entre la chitinase fongique et la Curcumine.

Résidus impliqués	Atome du ligand	Distance (Å)
TRP137 (N)	O	2.224
TYR299 (N)	O	2.890
TYR299 (N)	O	2.800

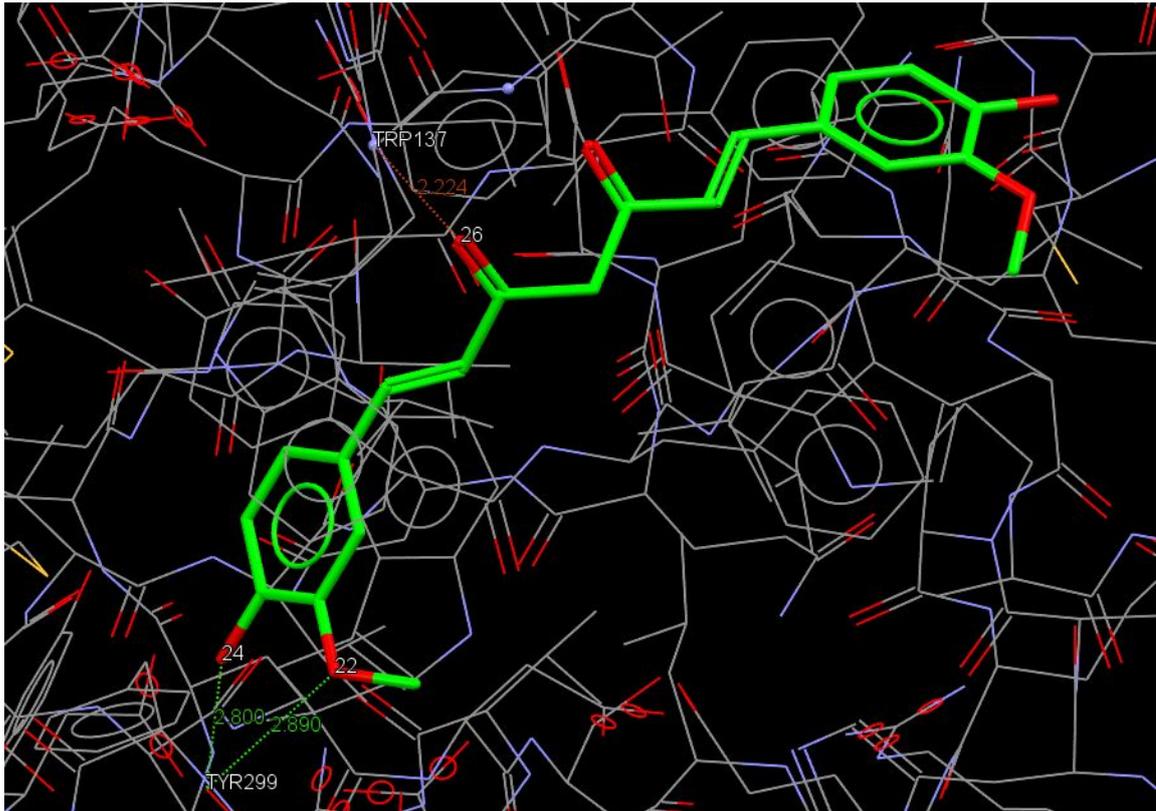


Figure 26. Représentation de liaison hydrogène formée par la Curcumine. Image générée par GOLD.

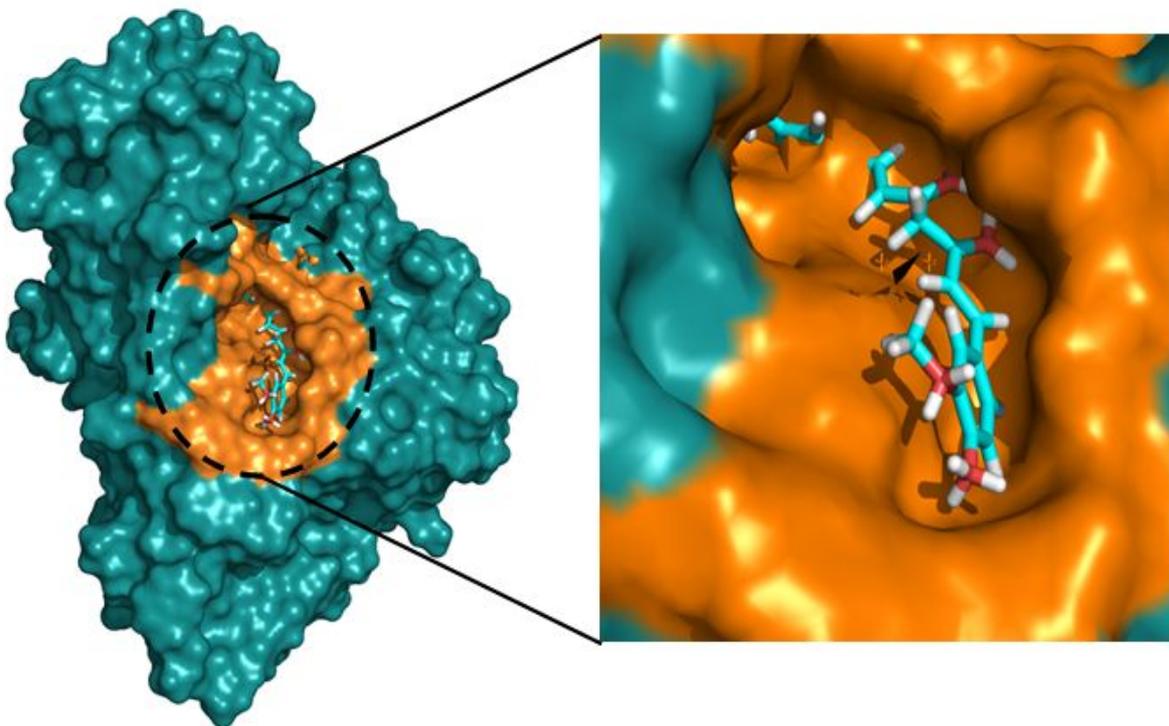


Figure 27. Emplacement de la Curcumine dans le site actif de la chitinase fongique. Image générée par Pymol.

3. Application de la règle 5 du Lipinski:

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 2 flavonoïdes étudiés précédemment. Les résultats sont présentés dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : Propriété pharmacocinétique des flavonoïdes (La Gallocatéchine gallate, la Curcumine).

	PM	Donneur de H	Accepteur de H	Liaisons rotatable	Log P
Gallocatéchine gallate	458.375	8	11	4	2.25
Curcumine	368.385	2	6	8	2.30

À l'issu de ce test, les 02 flavonoïdes (La Gallocatéchine gallate et la Curcumine) peuvent être proposés comme étant de nouveaux inhibiteurs théoriques de chitinase fongique, pouvant être administrés par voie orale, ce conformément à la règle de Lipinski.

La discussion :

Les chitinases fongiques possèdent de multiples fonctions, elles participent largement au métabolisme trophique et sont également impliquées dans le développement, la morphogenèse et les d'interactions symbiotiques et d'infestations parasites. Les champignons pathogènes utilisent leurs chitinases pour faciliter leur pénétration dans l'hôte ou pour en exploiter les sucres et les acides aminés issus de la dégradation de la chitine (Cohen-Kupiec *et al.*, 1998).

Aspergillus fumigatus est un champignon du genre *Aspergillus*, responsable d'infections sévères chez les humains et chez les oiseaux. Chez les humains, il est responsable de maladies comme l'aspergillose broncho-pulmonaire et

l'aspergillome, chez les oiseaux il est responsable de l'aspergillose aviaire (Aaron, 2012).

Dans la présente étude, nous avons évalué l'affinité de 15 flavonoïdes vis à vis des chitinase fongique sur la base de leurs énergies de liaison.

D'après les résultats de docking, nous avons constaté que les meilleures conformations pour la **Gallocatéchine gallate** et la **Curcumine** dans le site actif de la chitinase fongique simule parfaitement celle observée par l'inhibiteur (C2-Dicaffeine).

Nous avons observé la formation de 4 liaisons hydrogènes entre l'inhibiteur (C2-Dicaffeine) et les résidus TRP137, THR138, TYR139 de la chitinase fongique. En revanche Nous avons observé la formation de 4 liaison hydrogènes entre la **Gallocatéchine gallate** et les résidus ARG 57, THR138, TYR139 de la chitinase fongique et 3 liaison hydrogènes entre la **Curcumine** et les résidus TYR 299, THR137 de la chitinase fongique.

Nous avons remarqué que les résidus THR138, TYR139 de la chitinase fongique forment des liaisons hydrogènes aussi bien avec l'inhibiteur (C2-Dicaffeine) qu'avec la **Gallocatéchine gallate**, et la **Curcumine** partage un seul résidus (TRP137) avec l'inhibiteur (C2-Dicaffeine). Ce explique la différence d'énergie enregistrées entre les deux flavonoïdes, sachant que les ponts hydrogènes jouent un rôle très important dans la stabilité de l'interaction entre la protéine et son ligand.

Les résultats montrent que la **Gallocatéchine gallate** et la **Curcumine** présentent les meilleures affinités (89.86 Kcal/mol et 85.41 Kcal/mol respectivement) vis à vis la chitinase fongique. Nos résultats confirment les études expérimentales, qui montrent que les flavonoïdes sont de puissantes molécules antifongiques. Il a été rapporté par Bagre *et al.* (2006) que le screening phytochimique de *Thonningia sanguinea* indique la présence de composés polyphénoliques en abondance, de saponines et de flavonoïdes qui pourrait être à la base de l'action antifongique observée. En effet, les polyphénols sont reconnus comme des molécules antibactériennes et antifongiques.

Conclusion et perspectives

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 **GOLD** afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la chitinase fongique et traiter de manière plus efficace l'aspergillose broncho-pulmonaire et l'aspergillome. Pour atteindre cet objectif nous avons réalisé plusieurs étapes :

- La première étape : a permis de tester la fiabilité du programme **GOLD** par l'application du test de calcul des valeurs du RMSD de 04 complexes protéines-ligands téléchargés de la PDB et les résultats étaient satisfaisantes. Ce test nous apporte la preuve que le programme **GOLD** est hautement performant et de conclure qu'il peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions des inhibiteurs de la chitinase fongique.
- La deuxième étape : consiste à comprendre les mécanismes d'interaction entre un ligand et son récepteur, en l'occurrence la chitinase fongique et son inhibiteur. Le docking moléculaire avec **GOLD** nous a permis de constater que parmi les 15 flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation étudiés, la Gallocatéchine gallate et la Curcumine, sont les meilleurs inhibiteurs de la chitinase fongique avec des scores égaux à 89.86 Kcal/mol et 85.41 Kcal/mol respectivement.
- Enfin, l'application de la règle de 5 de Lipinski nous a renseignés de manière positive sur les propriétés ADME des 2 flavonoïdes qui se présentent comme de nouveaux inhibiteurs théoriquement plus affines vis-à-vis de la chitinase fongique.

Pour l'avenir et comme perspectives, il conviendrait de prolonger de cette étude et de tester l'activité biologique des 2 flavonoïdes nouvellement proposés par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* pour confirmer les résultats théoriques obtenus *in silico*.

Les références bibliographiques

Les références bibliographiques

- Aaron SD., Vandemheen KL., Freitag A., Pedder L., Cameron W., Lavoie A., Paterson N., Wilcox P., Rabin H., Tullis E., Morrison N., Ratjen F., 2012.** Treatment of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a randomized, placebo-controlled pilot study. *PLoS One*, 7(4) : 36077.
- Azzouz, F., 2001.** Identification moléculaire d'une chitinase CHT-1, sa localisation et son rôle chez le nématode *Caenorhabditiselegans*, in *Parasitologie*. Suisse: Neuchâtel.
- Bagre I., Bahi C., Meite S., Djaman A.J., Guede G.F., 2006.** Evaluation et amelioration *in vitro* de l'activite antifongique de *morinda morindoides* (baker) milne-redh (*rubiacaeae*) sur *cryptococcus neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. *J. sci. pharm. biol*, Vol.7, n°1: pp. 37-46.
- Baillet F., 2003.** Cancérologie Niveau DCEM3. Université Pierre et Marie Curie : 298p.
- Beautrait A., 2008.** Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine fat de kinase d'adhérence focale FAK. Thèse. Université Henri Poincaré–Nancy I : 241P.
- Bensegueni. A., 2007.** Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxycgénase et la cyclooxygénase. Thèse de Doctorat : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie : 91p.
- Blattner R, Gerard P et Spindler-Barth M ., 1997.** Synthesis and biological activity of allosamidin and allosamidin derivatives. *Pestic Sci*, **50**: 312-318.
- Bouchama S et Yazza S., 2014.** Index des métabolites secondaires végétaux, thèse, université kasdi mrbah, Ouargla : 46p.
- Bourotte M., 2004.** Synthèse d'inhibiteurs de protéines kinases: approches pharmacochimiques. Thèse. Université louis pasteur.

Brameld, W.A., 1998. Goddard, Substrate distortion to a boat conformationatsubsite _1 is critical in the mechanism of family 18 chitinases. *Am. Chem. Soc*, 120 : 3571–3580.

Brauer C., 2007. Les médiateurs et voies de signalisation intracellulaires impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale : nouvelles stratégies thérapeutiques en cancérologie. Thèse. Université Henri Poincaré-Nancy1 : 179p.

Bruneton J., 2009. Pharmacognosie-Phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. Paris: Edition Tec & Doc. Edition médicales internationales : 1292p.

Bruno D., Goms O., 2003. Étude d'une voie de signalisation intervenant dans la Toulouse : 155p.

Cabarrot E., 2008. Cancérogènes, développement tumoral, classifications cours de cancérologie Module 10. Facultés de médecine de Toulouse : 23p.

Cauvin L., 2015. Voies De Signalisation Impliquées Dans La Sensibilisation Des Tumeurs Mammaires Au Docétaxel Par Les Acides Gras Polyinsaturés N-3, Thèse, Université François – Rabelais De Tours : 218p.

Chikhi A., 2007. Calculs et modélisation de l'interaction peptide deformylase-substances antibactériennes à l'aide de techniques de docking (arrimage) moléculaire. Thèse. Université Mentouri Constantine, 9: 126p.

Cohen-kupiec et chet I., 1998. The molecular biology of chitin digestion cunopinbiotechnol, 9: 270-277.

Cupta ,V,K,A,K Misra,P,K Gaur P,K jain D Gaur ET S Sharma., 2010. Content stress. Offusarium wilt disease of gwava (psidiumguajaval) in india biotechnology, 9 : 176-195.

Cushnie T.P.T. and Lamb A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 : 343-356.

- Dacosta E.**, 2003. Les phytonutriments bioactifs, Yves Dacosta (Ed), Paris : 317p.
- Dahiya, N., R. Tewari, et G.S., Hoondal.**, 2005. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: areview.: Applied Microbiology and Biotechnology.
- Dixon MJ, Andersen OA, van Aalten DMF et Eggleston IM .**, 2005. An efficient synthesis of argifin: A natural product chitinase inhibitor with chemotherapeutic potential. *Bioorg MedChem Lett*, **15**: 4717-4721.
- Ehrlich H,K.**, 2007. monfred H Thomas S paul and K christiane et al first evidence of chitin in skeletons of marine sponges part 2 glass sponge J,EXP zool, B MOL devevol, 308 : 473-483.
- Elkaim J.**, 2011. Drug design in silico criblage virtuel de protéines a visée thérapeutique. Thèse. Université de bordeaux1 : 251p.
- Fusetti F, von Moeller H, Houston D, Rozeboom HJ, Dijkstra BW, Boot RG, Aerts JMFG et van Aalten DMF.**, 2002. Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *J Biol Chem*, **277** : 25537-25544.
- Gooday GW, Brydon LJ et Chappell LH.**, 1988. Chitinase in female *Onchocerca gibsoni* and its inhibition by allosamidin. *Mol Biochem Parasitol*, **29** : 223-225.
- Grayer R.J. et Harborne J.B.** 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants,1982-1993. *Phytochemistry*, 37 : 19-42.
- Harborne J.B., and Williams C.A.**, 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55 : 481-504.
- Havsteen BH.**, 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther.* 96(2-3):67-202.

- Herrera –estrella A et J chet ., 1999.** Chitinases in biological control EXP, 87 : 71-184.
- Houston DR, Shiomi K, Arai N, Omura S, Peter MG, Turberg A, Synstad B, Eijsink VG et van Aalten DM., 2002b.** High-resolution structures of a chitinase complexed with natural product cyclopentapeptide inhibitors: mimicry of carbohydrate substrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99** : 9127-9132.
- Itoh, Y., et al., 2003.** Family 19 Chitinase of *Streptomyces griseus* HUT6037 increases plantresistance to the fungal disease. *BioscienceBiotechnology and Biochemistry*, **67**(4) : 847-855
- Jérôme Pansanel., 2014.** Formation PyMOL – 11 et 12 décembre– Toulouse : 1/18p.
- Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. et Rodriguez-Garcia I., 2008.** Pterocarpan : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, **7** : 125-154.
- Kasprzewska,A., 2003.** Plant chitinases - Regulation and function. *Cellular & Molecular BiologyLetters*, **8**(3) : 809-824.
- Kato T, Shizuri Y, Izumida H, Yokoyama A et Endo M., 1995.** Styloguanidines, new chitinase inhibitors from the marine sponge *Stylotella aurantium*. *Tetrahedron Letters*, **36**: 2133-2136.
- Kim D, Lee IS, Jung JH et Yang SI., 1999a.** Psammaplin A, a natural bromotyrosine derivative from a sponge, possesses the antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and the DNA gyrase-inhibitory activity. *Arch Pharm Res* **22** : 25-29.
- Lagarde P., 2001.** Cancer, progrès de la prévention et du traitement, *Nutranews*, Science, Nutrition, Prévention et Santé : 16p.

Merzendorfer H et L zimoch., 2003. Chitin metabolism in insects structure, fuction, and regulation of chitin synthase and chitinases J,EXP boil, 206 : 4393-4412.

Mokrani E., 2012. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Mémoire .Biochimie. Université Mentouri Constantine : 121p.

Murray J. F., 2001. La tuberculose dans le monde : situation et perspective en l'an 2001. *Revue des Maladies Respiratoires*, **18** : 479-484.

Neuhaus, JM., 1999. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11) In: Datta SK et Muthukrishnan S, *Pathogenesis-Related proteins in plants* CRC Press, Boca Raton.

Omura S, Arai N, Yamaguchi Y, Masuma R, Iwai Y, Namikoshi M, Turberg A, Kolbl H et Shiomi K., 2000. Argifin, a new chitinase inhibitor, produced by *Gliocladium* sp. FTD-0668. I. Taxonomy, fermentation, and biological activities. *J Antibiotic*, **53** : 603-608.

PerrakiA,Wilson , KS chet J oppenheim A,B et vorgiase C,E ., 1993. Phylogenetic relationships of chitinase in chitin enzymology, edited by Muzzarelli R AA ancona: european chitin society : 217-232.

Politz, S.M. et M. Philipp., 1992. Caenorhabditis-ElegansAs A Model For Parasitic Nematodes A Focus On The Cuticle. *Parasitology Today*, **8**(1) : 6-12.

Rao FV, Houston DR, Boot RG, Aerts JM, Sakuda S et van Aalten DM., 2003. Crystal structures of allosamidin derivatives in complex with human macrophage chitinase. *J Biol Chem*, **278** : 20110-20116.

Rao FV., Andersen OA., Vora KA., Demartino JA., van Aalten DM., 2005. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding modes. *Chem Biol* . 12(9) : 973-80.

Sakuda S et Sakurada M ., 1998. Preparation of biotinylated allosamidins with stron chitinase inhibitory activities. *Bioorg Med Chem Lett*, **8** : 2987-2990.

Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S et Suzuki A ., 1987. Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J Antibiot*, **40** : 296-300.

Sami L, Pusztahelyi T, Emri T, Varcza Z, Fekete A, Grallert A, Karanyi Z, Kiss L et Poci I., 2001. Autolysis and aging of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin. *J Gen Appl Microbiol*, **47** : 201-211.

Sandor E, Pusztahelyi T, Karaffa L, Karanyi Z, Poci I, Biro S, Szentirmai A et Poci I., 1998. Allosamidin inhibits the fragmentation of *Acremonium chrysogenum* but does not influence the cephalosporin-C production of the fungus. *FEMS Microbiol Lett*, **164** : 231-236.

Schüttelkopf AW., Andersen OA., Rao FV, Allwood M., Lloyd C., Eggleston IM., van Aalten DM., 2006. Screening-based discovery and structural dissection of a novel family 18 chitinase inhibitor. *J Biol Chem*, **15**;281(37) : 27278-85.

Shirley B.W., 1996. Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*, **1** : 377-382.

Spindler-Barth M, Blattner R, Vorgias C et Spindler KD., 1998. Inhibition of two family 18 chitinases by various allosamidin derivatives. *Pestic Sci*, **52** : 47-52.

Spindler-Barth M., 1997. Quantitative determination of chitin biosynthesis. In: Peter RAAMaMG, *Chitin Handbook*.

Tabudravu JN, Eijsink VG, Gooday GW, Jaspars M, Komander D, Legg M, Synstad B et van Aalten DM., 2002. Psammaplin A, a chitinase inhibitor isolated from the *Fijian* marine sponge *Aplysinella rhax*. *Bioorg Med Chem*, **10** : 1123-1128.

Teniou S., 2012. Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Mémoire. Biochimie. Université Mentouri Constantine : 59p.

Terwissasha van scheltinga AC, hennig M et dykstra BW., 1996. the 1,8 Å^o resolution structure of hevamine, plant chitinase/lysosyme and analysis of the conserved hydrolase family 18, *J. Mol. Biol.* 262 : 243-257.

Tews, A.C. Terwisscha van Scheltinga, A. Perrakis, K.S. Wilson, B.W. Dijkstra., 1997. Substrate-assisted catalysis unifies two families of chitinolytic enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* : 119 7954– 7959.

Tigrine C., 2014. Effets anticancéreux et chimioprotecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de *Cléome arabica*, thèse, Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie : 113p.

Treutter D., 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology*, 7 : 581-591.

Tsujibo, H., et al., 2000. *Family 19 chitinases from Streptomyces thermoviolaceus OPC-520: Molecular cloning and characterization.* *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 64(11) : 2445-2453.

Van Aalten., D. Komander., B. Synstad, S., Gaseidnes, M.G., Peter, V.G.H., 2001. Eijsink, Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 : 8979– 8984.

Watanabe, T., Kanai R., Kawase T., Tanabe T., Mitsutomi M., Sakuda S., Miyashita K., 1999. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution. *Microbiology-Uk*, 145 : 3353-3363.

Yao G., Craven M., Drinkwater N., Bradfield CA., 2004 .Interaction networks in yeast define and enumerate the signaling steps of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor. *PLoS Biol* ; 2(3):E65.

Zeghad N., 2009. Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire. Université Mentouri Constantine : 130p.

Zhang H, Huang X, Fukamizo T, Muthukrishnan S et Kramer KJ., 2002. Site-directed mutagenesis and functional analysis of an active site tryptophan of insect chitinase. *Insect Biochem Molec*, **32** : 1477-1488.

Les sites bibliographiques

[1] Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). [En ligne]. <http://www.ccdc.cam.ac.uk>. Consulté le: [20/05/2017].

[2] Organisation mondiale de la Santé (OMS). Tuberculose faits et chiffres sur la tuberculose. [En ligne]. http://www.who.int/tb/features_archive/factsheet_tb_2010_fr.pdf. Consulté le: [20/03/2017].

Résumé

Les flavonoïdes les plus abondants dans l'alimentation (isolés à partir des sources naturelles) ont été prises en tant que ligands pour le docking moléculaire. Les cibles moléculaires, chitinase fongique dont la structure cristallographique est disponible sur la base de données PDB : **2IUZ**, a été utilisé pour l'analyse d'interactions en utilisant le programme GOLD. Les résultats du docking des ligands ont montré que la **Gallocatéchine gallate, la Curcumine**, présentent une bonne affinité envers la cible lié aux l'aspergillose bronchopulmonaire et l'aspergillome.

Les mots clés : Docking, chitinase fongique, GOLD, l'aspergillome, flavonoïdes.

Abstract

The most abundant flavonoids in the diet (isolated from natural sources) were taken as ligands for molecular docking. The molecular targets, fungal chitinase whose crystallographic structure is available on the basis of PDB data: **2IUZ**, was used for the analysis of interactions using the GOLD program. Ligand docking results have shown that **Galocatechin gallate, Curcumin**, exhibits good affinity towards the target associated with bronchopulmonary aspergillosis and aspergilloma.

Keywords: Docking, fungal chitinase, GOLD, aspergilloma, flavonoids.

المخلص:

باستعمال وسائل بيومعلوماتية Bioinformatic tools، ارتأينا في هذا البحث إجراء دراسة حول إمكانية تثبيت إنزيم الكيتيناز الفطري من طرف بعض الفلافونويدات الأكثر انتشارا في أغذية الإنسان. أين قمنا بإرساء Docking هذه الفلافونويدات في الموقع الفعال للإنزيم المستهدف بواسطة برنامج الإرساء الجزيئي **GOLD**، (Genetic Optimization of Ligand Docking). أظهرت النتائج المتحصّل عليها أن كل من المركبين: **Curcumine** و **Gallocatechine gallate**، على الترتيب يملكان ألفة عالية affinity نحو الموقع الفعال لإنزيم الكيتيناز الفطري، ما يُنبئ بإمكانية استعمالهما كمثبطات انتقائية بهدف علاج كل من داء الرّشاشيّات Aspergilloma و رّشاشيّات القصبيّة الرئوية الأرجية Bronchopulmonary aspergillosis

الكلمات المفتاحية: الإرساء الجزيئي، الكيتيناز الفطرية، الفلافونويدات، داء الرّشاشيّات، **GOLD**.