

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

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



Mémoire de fin d'études  
Master



4/110.723

Spécialité : Chimie Physique

*Présenté par : ARIBI Akila*

---

---

**ETUDE PAR DOCKING MOLECULAIRE DE L'INHIBITION DES  
LIPOXYGENASES**

---

---

Sous la Direction de :

**Dr. DJEMIL Rayenne**

**Juin 2018**

## Remerciements

En premier lieu, Je tiens à remercier notre Dieu, qui m'a donné la force pour accomplir ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements à ma promotrice, Mme :DJEMIL Rayenne pour m'avoir dirigé tout au long de ce travail, et pour ses explications, remarques judicieuses et conseils qui m'ont été précieux pour la réalisation de ce travail.

Je présente mes chaleureux remerciements aux membres de jury qui ont consulté notre travail et aussi aux enseignants pour leur aide et orientation durant mes études.

Un grand remerciement à Mme :LAACHI Nadia de m'avoir guidé à travers ces discussions et ces précieux conseils

J'ai le plaisir d'exprimer ma profonde gratitude à Pr. NIGRI Soraya pour son aide dans la correction du mémoire

Sans oublier Melle CHERJET Mouna pour son aide précieuse, sa patience et sa disponibilité.

Mes derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.

## *Dédicaces*

*TOUT D'abord je remercie le bon dieu qui m'a donné le courage  
pour arriver à ce stade.*

*Je dédie ce modeste travail :*

*Mme DJEMIL RAYENNE pour encadrer*

*Mme : laachi Nadia et Melle ChreitMouna pour explications et dirigé*

*A ma plus belle étoile qui puisse exister dans l'univers ma*

*Chère mère "Najete ghamoude".*

*A mon meilleur ami : mon père, le plus beau et bon de tout les*

*Pères" AbedAlhamideribi".*

*A mes chères frères: Younes*

*A mes chères sœurs Meriem, aya, lidya*

*A tous mes amis sans exception, et tous ceux qui m'ont aidé à*

*Réaliser ce modeste travail.*

*A TOUT MA FAMILLE SANS EXPTION*

*A. AKILA*

# Sommaire

---

Sommaire.....	I
Liste des Figures.....	V
Liste des Tableaux.....	VII
Liste des Abréviations.....	VIII
Introduction générale.....	1

## Chapitre 1 : Docking Moléculaire

1-Généralités.....	2
2-Docking.....	3
3-Principe du docking.....	4
4-Outils de docking moléculaire.....	5
4.1-Ligand.....	5
4.2-Récepteur.....	6
4.3-Programme.....	6
5- Algorithme de recherche conformationnelle.....	7
5.1-Recherche systématique.....	7
5.2-Recherche aléatoire.....	8
5.3-Méthodes de simulation.....	8
6-Scoring.....	8
6.1-Les fonctions de score basées sur un champ de force.....	9
6.2-Les fonctions de score empiriques.....	9
6.3-Les fonctions de score basées sur des connaissances statistiques.....	9
6.4-Les fonctions consensus.....	9
7-Applications de Docking.....	10
8-Logiciel.....	11
8.1-AutoDock Vina.....	11
8.2-Algorithme.....	11
8.3-Fonctions de score.....	11
Références.....	12

## Chapitre 2 : Voie de la Lipoxgénase

1-Généralités.....	16
--------------------	----

# Sommaire

---

2-Définition.....	17
3-Nomenclature et classification.....	17
4-Structure.....	18
4.1-Domaine N-terminal.....	20
4.2- Domaine C-terminal.....	21
4.3- Centre catalytique.....	22
5-Structure et stabilité.....	23
6-Rôle.....	23
7-Réactifs et spécificité.....	24
8-Mécanisme réactionnel.....	24
9-Inhibition de la lipoxigénase.....	26
9-a Les inhibiteurs non spécifiques .....	27
9-b Les inhibiteurs spécifiques.....	27
9.1- Inhibiteurs des lipoxigénases végétales.....	27
9.1.1-Lcs agents chélateurs.....	27
9.1.2-Les antioxydants.....	28
9.1.3-Les analogues de substrats.....	28
9.2- Inhibiteurs des lipoxigénases animales.....	28
9. 2.1- les antioxydants.....	28
9.2.2- les analogues de substrats.....	28
9.2.3- Antagonistes compétitifs des récepteurs aux lipoxigénase.....	29
Références.....	30

## **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

1- Méthodologie de travail .....	34
2- Présentation des molécules étudiées.....	34
2.1- Les inhibiteurs .....	34
2.2-Récepteur.....	36

# Sommaire

---

3- Fiabilité de programme utilisé.....	36
3.1- Test RMSD .....	36
3.2- Analyse visuelle.....	38
4- Démarche de Docking moléculaire.....	39
4.1-Préparation des protéines .....	39
4.2-Préparation des ligands.....	40
4.3-Boite de AutoDock vina.....	40
5- Etude des interactions du 4RPE.....	40
5.1-Interactions avec le ligand naturel.....	41
5.2-Interactions avec $\alpha$ -tocopherol.....	41
5.3-Interactions avec $\beta$ -tocopherol.....	42
5.4-Interactions avec $\delta$ -tocophérol .....	42
5.5-Interactions avec $\gamma$ -tocophérol .....	43
5.6-Interactions avec 2-phenyl-4-chromanol .....	44
5.7-Interactions avec (-)- épigallocatechine gallate .....	44
5.8-Interactions avec Hydrohytyrosol.....	45
5.9-Interactions avec Acétate d' $\alpha$ -tocophéryl.....	46
6- Etude des interactions du 4QWT.....	47
6.1-Interactions avec son Ligand naturel.....	47
6.2-Interactions avec $\alpha$ -tocopherol.....	47
6.3-Interactions avec $\beta$ -tocopherol.....	48
6.4-Interactions avec $\delta$ -tocopherol.....	49
6.5-Interactions avec $\gamma$ -tocopherol.....	49
6.6-Interactions avec 2 phenyl-4-chromanol .....	50
6.7-Interactions avec (-)-épigallocatechi ne gallate .....	51
6.8-Interactions avec Hydrohytyrosol.....	51
6.9-Interactions avec Acétate d' $\alpha$ -tocopherol.....	52

# Sommaire

---

7- Affinités des ligands.....	53
Conclusion .....	56
Annexe.....	i
Résumé	

# Liste des figures

## Chapiter 01

N°	Titre	Page
Figure1-1	Représentation schématique du Docking	3
Figure1-2	Principe générale d'un programme de Docking	4
Figure1- 3	Positionnement optimal d'une molécule, dite ligand, dans le site actif d'une cible biologique	5
Figure 1-4	Les fonctions de score les plus connues (en vert) et les exemples(en bleu) les plus fréquemment cités dans la littérature	10

## Chapiter 02

N°	Titre	Page
Figure 2-1	Régiospécificité réactionnelle des lipoxygénases végétales et animales	18
Figure 2-2	Structure générale des lipoxygénases	19
Figure 2-3	Structure tridimensionnelle de la LOX1 de soja	20
Figure 2-4	Conservation du domaine PLAT chez les LOX et les lipases	20
Figure 2-5	Domaine C-terminal de la LOX1 de soja, et zoom sur les hélices centrales	21
Figure 2-6	Les cavités internes de la LOX1 de soja	21
Figure 2-7	Coordination de l'atome de fer catalytique de la LOX1 de soja	22
Figure 2-8	Représentation schématique du complexe de coordination de l'atome de fer non hémunique (A) et ligands autour de l'atome de fer des lipoxygénases (B).	23
Figure 2-9	Schéma du mécanisme réactionnel de la lipoxygénase	25
Figure 2-10	Oxydation de l'atome de fer de la lipoxygénase au cours de la réaction catalytique	26

## Chapiter 03

N°	Titre	page
Figure 3-1	Résultats du test RMSD	38
Figure 3-2	Visualisation des différents complexe de RMSD	39
Figure 3-3	Mode d'interaction 4RPE-ligand(acide linoléique)	41
Figure 3-4	Mode d'interaction 4RPE- $\alpha$ -tocophérol	41
Figure 3-5	Mode d'interaction 4RPE- $\beta$ -tocophérol	42
Figure 3-6	Mode d'interaction 4RPE- $\delta$ -tocophérol	43
Figure 3-7	Mode d'interaction 4RPE- $\gamma$ -tocophérol	43
Figure 3-8	Mode d'interaction 4RPE-2-phenyl-4-chromanol	44
Figure 3-9	Mode d'interactions 4RPE(-)- épigallocatechine gallate	45
Figure 3-10	Mode d'interaction 4RPE- Hydrohytyrosol	46
Figure 3-11	Mode d'interaction 4RPE- Acétate d' $\alpha$ tocophérol	46
Figure 3-12	Mode d'interaction 4QWT Ligand(acide arachidonique)	47
Figure 3-13	Mode d'interaction 4QWT- $\alpha$ -tocophérol	48
Figure 3-14	Mode d'interaction 4QWT- $\beta$ -tocophérol	48
Figure 3-15	Mode d'interaction 4QWT- $\delta$ -tocophérol	49

## Liste des figures

---

Figure 3-16	Mode d'interaction 4QWT- $\gamma$ -tocophérol	50
Figure 3-17	Mode d'interaction 4QWT-2-phenyl-4-chromanol	50
Figure 3-18	Mode d'interaction 4QWT-(-)-épigallocatechine gallate	51
Figure 3-19	Mode d'interaction 4QWT- Hydrohytyrosol	52
Figure 3-20	Mode d'interaction 4QWT- Acétate d' $\alpha$ -tocophéryl	52

# Liste des tableaux

---

## Chapitre 01

N°	Titre	Page
Tableau 1-1	Les principaux programmes de Docking moléculaire	7

## Chapitre 03

N°	Titre	Ppage
Tableau 3-1	Structures des inhibiteurs	35
Tableau 3-2	Résultats obtenue de RMSD des complexes protéines-ligands	37
Tableau 3-3	RMSD de quelques complexes proteine-ligand	38
Tableau 3-4	Centre et dimension de chaque code	40
Tableau 3-5	Classement des résultats de docking avec 4RPE	53
Tableau 3-6	Classement des résultats de docking avec 4QWT	54

## Liste des Abréviation

AA	acide arachidonique
ADH	l'alcool déshydrogénase
AM1	Austin Model 1
ATE	acide eicosatétraénoïque
Ala	Alanine
Asp	Acide Aspatique
CFEA	champ de forces empirique Amber
ETYA	l'acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque
ILE	Isoleucine
GLN	Glutamine
GLU	Acide Glutamique
GLY	Glycine
IIETE	Acide hydroxyeicosatétraénoïque
HPETE	Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque
HPOD	Hydroperoxyoctadécadiénoïque
HPL	l'hydroperoxyde lyase
HIS	Histidine
kDa	Kilodalton
KLB	know legde-based
LOX	Lipoxygénas
LT	Leucotriènes
LEU	Leucine
Lys	Lysine
PDB	Protéine Data Bank
PLAT	Polycystin-1, Lipoxygenase, $\alpha$ -Toxin

## Liste des Abréviation

---

PHE	Phényalanine
Pro	Proline
RMN	Résolution magnétique nucléaire
RMSD	RootMean Square Deviation
RX	Rayons X
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosine
Val	Valine
VDW	van der Waals
3D	Tridimensionnelle

# *Introduction générale*

# Introduction générale

---

Les lipoxygénases (LOXs) sont des enzymes qui catalysent l'oxydation des acides gras libres insaturés en hydroperoxyde. Les LOXs sont responsables de l'arôme de plusieurs produits de plantes telles que l'huile d'olive et les produits de leur oxydation qui influencent considérablement sur la qualité de produits notamment de l'huile d'olive.

Le processus d'inhibition est d'une importance capitale afin de conserver ces produits. Comprendre la façon dont le ligand s'attache ou interagit avec une cible protéique afin de l'inhiber est primordiale dans la recherche pharmaceutique et l'industrie alimentaire.

Afin de modéliser le complexe ligand-récepteur ou inhibiteur et d'étudier les interactions mise en jeu et le mode d'inhibition compétitif avec le ligand naturel et la protéine, plusieurs approches théoriques ont été employées. Parmi lesquelles, nous avons choisi le Docking moléculaire en raison de son efficacité à prédire les structures des complexes ligand-protéine.

Il s'avère que le Docking moléculaire est le mieux adapté et le plus adéquat dans le domaine biologique, biochimique et pharmaceutique. En effet, il fournit un moyen d'étudier les interactions au niveau moléculaire entre une protéine et son substrat et définir les résidus mis en jeu permettant ainsi de prédire l'affinité entre les deux molécules. Dans ce travail, nous avons utilisé l'Auto-Dock vina, un logiciel très répandu en chimie computationnelle dont la fiabilité a été déterminée par un test RMSD et une analyse visuelle.

Dans cette étude, on s'intéresse à déterminer les modes d'interaction des complexes enzymes-ligands. Les affinités entre les deux partenaires ont été calculées et leurs stabilités ont été discutées.

Nous présenterons ce travail en trois chapitres :

**Le premier chapitre** sera consacré à l'étude bibliographique de l'utilisation des outils du docking moléculaire ;

Dans le **deuxième chapitre** sera présentée l'étude bibliographique des LOXs ;

Dans le **troisième chapitre**, on retrouvera les méthodes de calcul qui permettent d'évaluer l'affinité des molécules sélectionnées.

# *Chapitre 01: Docking Moléculaire*

**1- Généralités :**

Le Docking vise à prédire le positionnement le plus probable en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable entre l'entité constituée à partir d'une protéine et d'un ligand [1]. Il rend possible l'identification des interactions mis en jeu entre les deux partenaires

Historiquement, les premiers outils de Docking obéissaient au principe clef - serrure (lockand-key) selon lequel le ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure [2]. Les algorithmes de l'époque permettaient donc de simuler un processus complètement statique au cours duquel un ligand dans une conformation donnée était docké au sein d'une protéine rigide, on parlait alors de Docking «rigid-body »[3]. Depuis, il a été assez clairement établi que l'arrimage du ligand est un processus dynamique au cours duquel le ligand mais également la protéine sont susceptibles de subir des changements conformationnels importants [4]. Cette représentation a été améliorée par l'introduction de la flexibilité sur le ligand, permettant l'exploration des conformations adoptées par celui-ci lors de l'arrimage dans le site actif de la protéine.

Aujourd'hui, de nombreux programmes de Docking permettent d'inclure une certaine flexibilité sur le récepteur, mais l'augmentation du nombre de degrés de liberté que cela représente est synonyme d'un décuplement du temps de calcul. Pour contourner ce problème, le Docking ligand flexible-protéine rigide reste donc la méthode la plus souvent employée. En principe, un programme de Docking doit être capable de générer les modes de liaison attendus pour des ligands dont la position adoptée au sein du site actif est connue en général, via la structure cristallographique de la protéine co-cristallisée avec le ligand) dans un temps raisonnable. Pour cela, il est nécessaire que l'algorithme de recherche conformationnelle puisse explorer l'espace conformationnel le plus exhaustivement possible et de façon efficace. Classiquement, on juge de la qualité du Docking en mesurant le RMSD sur les atomes lourds entre la pose obtenue en Docking, et la pose observée expérimentalement si elle existe.

## 2-Docking :

Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme Docking seul est couramment employé pour désigner un « Docking protéine-ligand [5]. Le Docking moléculaire consiste à prédire la conformation optimale entre deux molécules afin de créer un complexe de molécules stable (figure 1). Il permet soit de découvrir de nouvelles molécules (par assemblage de deux ou plusieurs molécules), soit de comprendre la nature d'un complexe de molécules obtenu par cristallographie [6].

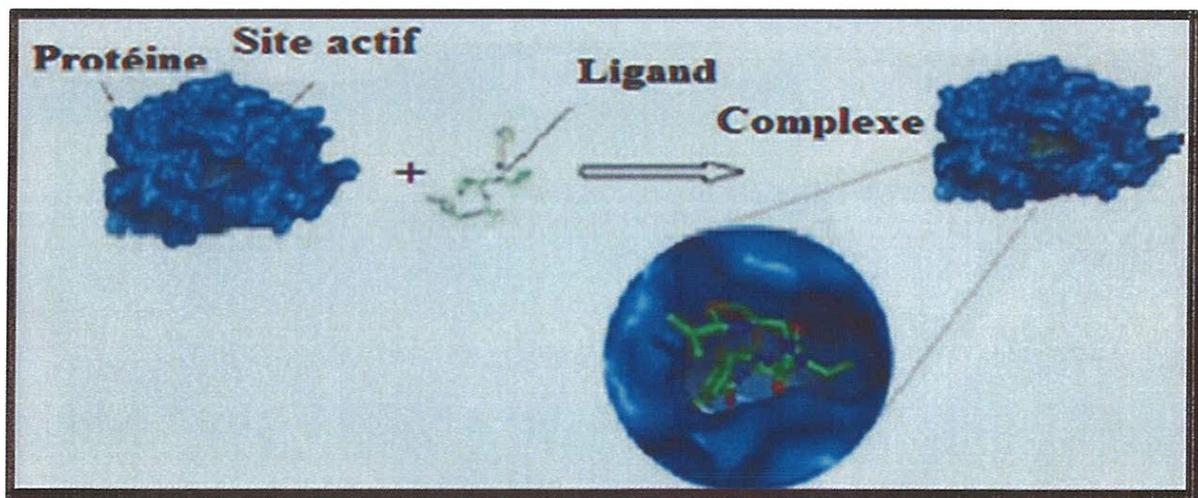


Fig1-1 : Représentation schématique du Docking

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** [7].

### 3-Principe du docking :

Une simulation de Docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring [8].

❖ La première est l'étape de sélection, consistant à rechercher et générer toutes les conformations possibles (poses) et donc générant les modes d'interaction possibles entre la protéine et le ligand. Cette étape doit parcourir au mieux l'espace conformationnel pour trouver l'énergie minimale globale.)

❖ 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.[9]

Ce score permettra de retenir la meilleure réponse parmi toutes celles proposées[10]

Le Docking rend possible l'identification des interactions qui existent dans l'entité constituée à partir d'une protéine et d'un ligand. Il vise à prédire le positionnement le plus probable en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable [11].

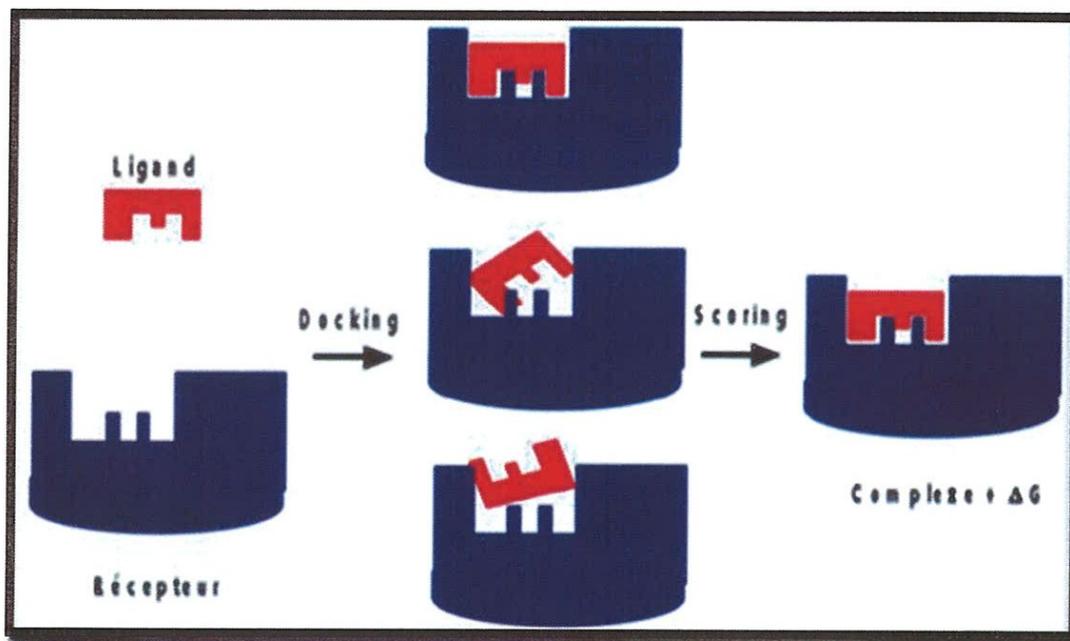


Figure1-2 : Principe générale d'un programme de Docking.

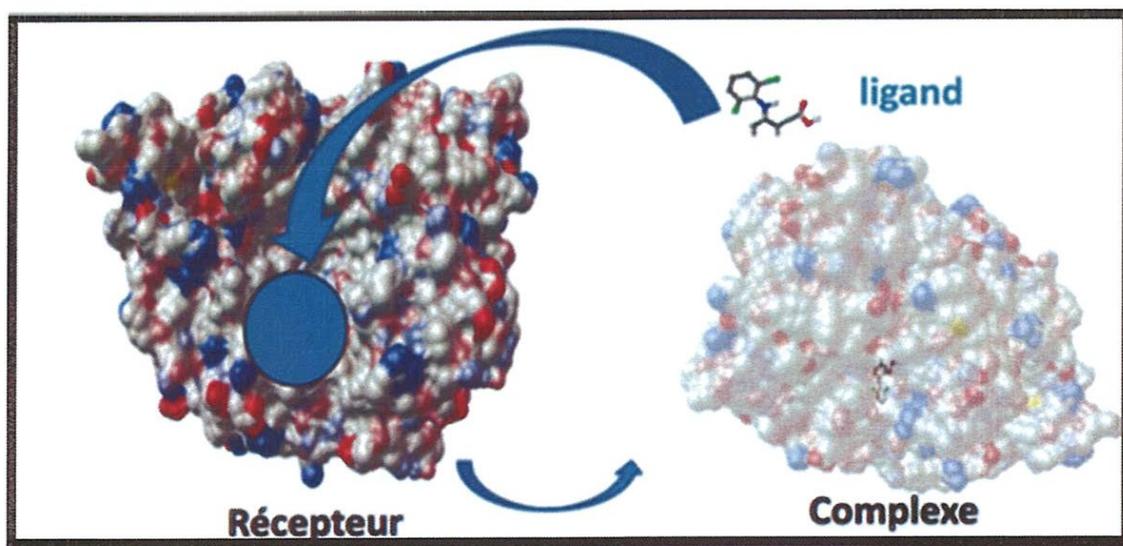
#### 4-Outils de docking moléculaire :

Les éléments indispensables pour pratiquer un Docking moléculaire se limitent en un récepteur macromoléculaire de nature protéique appelée : cible, une petite molécule appelée ligand et un programme de Docking qui prédit la conformation la plus favorable du ligand au sein du récepteur choisi [12]

##### 4.1-Ligand :

Ligand est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal.

A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné. Le premier souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de données de structures chimiques appelées chimiothèques ou espaces chimique. Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la « PDB » ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que ChemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl ...etc [13].



**Figure1- 3** : Positionnement optimal d'une molécule, dite ligand, dans le site actif d'une cible biologique

Un ligand peut être composée d'un ou de plusieurs fragments (groupements)[14] Il peut être :

- 1- Un substrat : Molécule qui se fixe au site actif de la protéine ou de l'enzyme pour subir une action : (décarboxylation, hydrolyse, déshydrogénation...).
- 2- Coenzyme : Molécule qui complète l'action de certaines enzymes.
- 3- Activateur : Composé chimique qui entraîne un changement de conformation du site actif de l'enzyme pour augmenter son affinité pour le substrat.
- 4- Inhibiteur : Contrairement à l'activateur, ce type de ligand modifie la structure électronique du site actif en diminuant l'affinité de l'enzyme pour son substrat

#### **4.2-Récepteur :**

Un récepteur est un organe, une cellule ou une molécule qui assure la réception d'information. Dans le cas d'une molécule, le récepteur est une protéine spécialisée capable de se lier spécifiquement et réversiblement à une autre molécule appelée ligand. Pour l'obtention des récepteurs, on utilise les structures 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de donnée PDB.

#### **4.3-Programme:**

Le Docking consiste à prédire à la fois la conformation active et l'orientation relative de chacune des molécules de la chimiothèque sélectionnée par rapport à la cible d'intérêt. Très généralement, la recherche se focalise sur le site actif pour former le complexe le plus stable. De nombreux programmes de Docking sont disponibles (voir le tableau) tels que Surflex et Gold sont devenus des outils utilisés régulièrement par les modélisateurs moléculaires. Un algorithme de Docking permettant au ligand d'adopter plusieurs conformations et plusieurs positions au niveau de son récepteur afin de retenir celle la plus favorable. Une fonction de score qui tant à coïncider avec l'énergie libre minimale globale du système cible-ligand et une méthode de recherche utilisée pour positionner l'interface de recherche dans laquelle le score est optimisé [15]

**Tableau 1-1** : Tableau - Les principaux programmes de Docking moléculaire

	<b>Editeur</b>	<b>Site internet</b>
AutoDock	Scripps	<a href="http://www.Scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/">http:// www. Scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/</a>
AutoDock Vina	Scripps	<a href="http://autodock.scripps.edu/">http:// autodock.scripps.edu/</a>
Dock	UCSF	<a href="http://www.dock.compbio.ucsf.edu/">http:// www. dock.compbio.ucsf.edu/</a>
Flex X	BioSolveIT	<a href="http://www.biosolveit.de/FlexX">http:// www. biosolveit.de/FlexX</a>
Fred	OpenEyes	<a href="http://www.Eyesopen.com/product/application/fred.html">http:// www. Eyesopen.com/product/application/fred.html</a>
Glide	Schrodinger	<a href="http://www.Schrodinger.com/produits/glide.html">http://www. Schrodinger.com/produits/glide.html</a>
Gold	CCDC	<a href="http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/">http:// www. ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/</a>
ICM	Molsoft	<a href="http://www.molsoft.com/products.html">http://www.molsoft.com/products.html</a>
Ligand Fit	Accelry	<a href="http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html">http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html</a>
SurFlex	Biopharmcis	<a href="http://www.biopharmcis.com/products.html">http://www.biopharmcis.com/products.html</a>

### 5-Algorithmes de recherche conformationnelle :

L'utilisation d'un algorithme de recherche efficace, permettant d'atteindre un bon compromis entre l'espace conformationnel couvert et le temps de calcul nécessaire est indispensable. A cette fin, différents algorithmes d'optimisation ont été utilisés au fil des années, tels que Monte Carlo, le recuit simulé, les algorithmes génétiques et bien d'autres encore [16]. Il existe trois types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du ligand

#### 5.1-Recherche Systématique :

Dans la recherche systématique, le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs ancrés sont définies. Dans un premier lieu, un [17] ou plusieurs [18].

Les méthodes basées sur les techniques de simulation par mécanique moléculaire ou dynamique moléculaire sont séduisantes, mais elles sont coûteuses du point de vue computationnel et leur capacité à franchir des barrières d'énergie libre élevée est très limitée [19].

Néanmoins, la recherche peut être améliorée en abaissant ces barrières, via une réduction des composantes répulsives des interactions électrostatique et de VDW [20].

### **5.2-Recherche aléatoire «stochastique » :**

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure 3D du ligand. Un des principaux algorithmes stochastiques est la méthode par algorithme génétique. Cette méthode a été implémentée dans plusieurs programmes dont AutoDock et GOLD [21]

### **5.3-Méthodes de simulation**

Reposent sur la dynamique moléculaire et la minimisation d'énergie. La dynamique moléculaire est actuellement la plus courante, malgré le fait qu'elle n'atteigne généralement que des minima locaux. Quant à la minimisation d'énergie, elle est rarement utilisée seule, mais plutôt intégrée en complément des techniques précédemment citées.

## **6-Scoring**

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à leur association sous forme de complexe [22] 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.

Les différentes fonctions de score implémentées dans les programmes de docking ont fait l'objet de nombreuses publications [23]. Elles sont généralement classées quatre catégories

**6.1-Les fonctions de score basées sur un champ de force :**

Le champ de force est une fonction mathématique qui exprime l'énergie d'un système par la somme de divers termes issus de la mécanique moléculaire. L'utilisation de champ de force dans le calcul de l'énergie libre d'un système. Dans ce type de fonctions, le score est la somme de l'énergie interne du ligand et de l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine, l'énergie interne de la protéine étant négligeable lorsque la conformation de celle-ci ne varie pas. Les énergies sont calculées à partir d'un terme de type VDW.

**6.2-Les fonctions de score empiriques :**

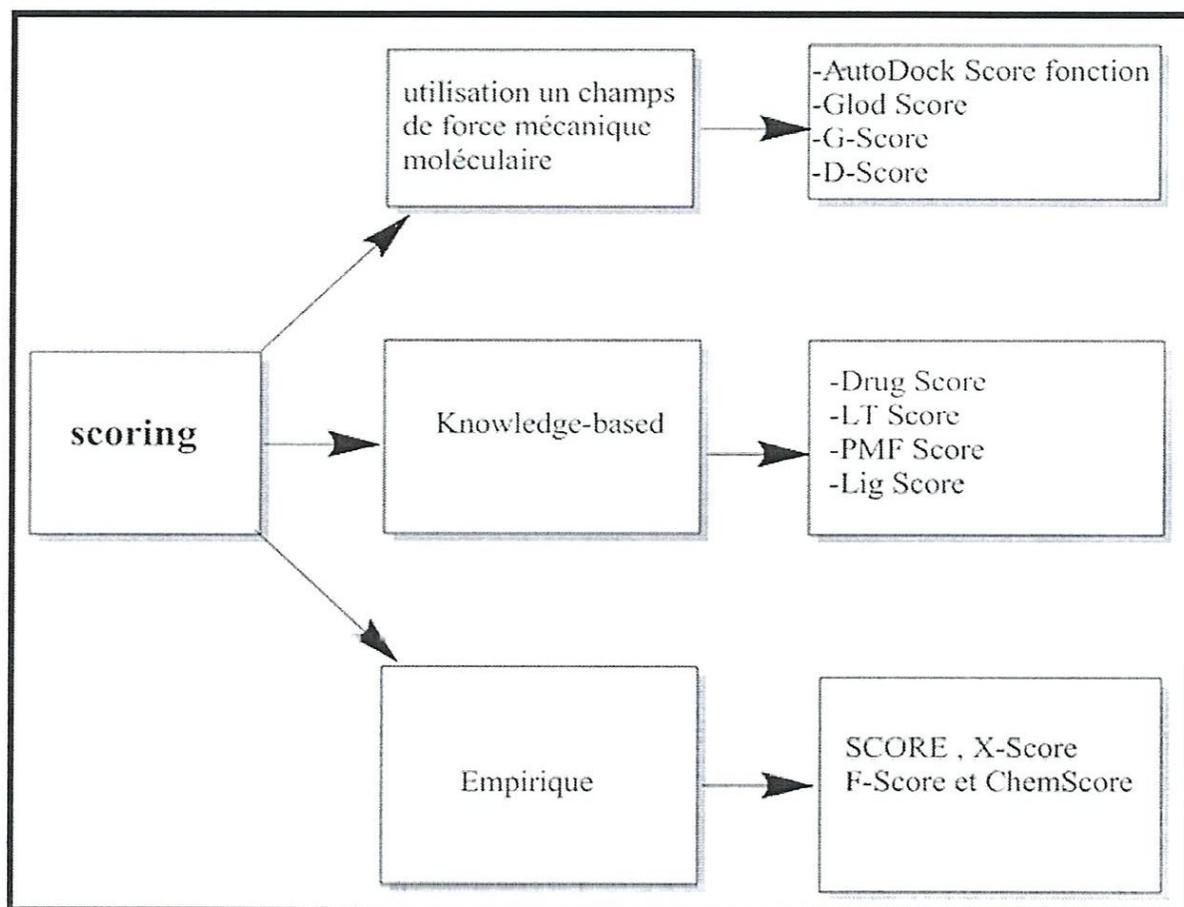
Ces fonctions de score se basent sur un décompte du nombre d'interactions dans le système protéine-ligand comme par exemple le nombre de liaison hydrogène, les contacts hydrophobes, les contacts hydrophiles, les contraintes de torsion dues à la formation du complexe protéine- ligand, etc. [24] La plupart des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité en termes de rapport précision/rapidité [25]

**6.3-Les fonctions de score basées sur des connaissances statistiques (knowledge-based)**

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

**6.4-Les fonctions consensus :**

Ces fonctions hybrides combinent les résultats issus de diverses fonctions de score. On estime qu'il est possible de compenser partiellement les faiblesses intrinsèques de chacune des fonctions de score employées, évitant leurs erreurs individuelles et ainsi d'augmenter la probabilité d'identifier des composés actifs [26].



**Figure 1-4 :** Les fonctions de score les plus connues (en vert) et les exemples(en bleu) les plus fréquemment cités dans la littérature [27]

## 7-Applications de Docking :

Il y a au moins deux applications principales au programme de Docking.

1- La plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction [28] qui consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur [29].

2-L'autre utilisation consiste à optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur.

Le Docking moléculaire a été appliqué avec succès sur un certain nombre de cibles thérapeutiques (protéines) dont la structure 3D en complexe avec le ligand a été parallèlement

déterminée. Actuellement, un bon nombre de médicaments mis sur le marché proviennent d'une conception rationnelle basée sur des stratégies de criblage virtuel

## 8-Logiciel

### 8.1-AutoDock Vina

AutoDock Vina est un programme de Docking dérivé d'AutoDock4 comme son nom l'indique, qui a également été développé par le groupe de Arthur J. Son principal objectif est l'augmentation de la vitesse d'exécution tout en conservant des résultats à la hauteur voire meilleurs qu'AutoDock4.

### 8.2-Algorithmes

L'algorithme de positionnement des ligands de Vina est une application globale d'une recherche de type itérative locale ("Iterated Local Search global optimizer")[30]

Ce type d'algorithme a comme intérêt de permettre de sortir des minima locaux qui ne permettent plus d'améliorer la conformation. Pour ce faire, l'algorithme est relancé à partir d'une structure géométrique légèrement différente.

### 8.3-Fonctions de score

La fonction de score de Vina est d'un type hybride entre une fonction de score empirique et une "KLB". Elle s'inspire de X-Score [31], et comme cette dernière, elle a été calibrée sur "PDB bind" [32] une base de données qui regroupe les valeurs d'affinités expérimentales dont les structures des complexes sont connues dans la PDB. Elle est cependant très peu documentée [33].

**REFERENCES**

- [1]-Corbeil.C.R., Englebienne. P., Moitessier. N., Docking Ligands Into Flexible And Solvated Macromolecules-1. Development And Validation Of Fitted 1.0. Journal Of Chemical Informatic Modelling, (2007), 47, 435-449.
- [2]-Yuriev. E., Agostino M., Ramsland P.A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. J. Mol. Recognit. (2011). 24, 149-164.
- [3]-Dias R., de Azevedo W.F.J.. Molecular docking algorithms. Curr Drug Targets,(2008) 9, 1040-1047.
- [4]-Ying Z., Tojo H., Komatsubara T., Nakagawa M., Inada M., Kawata S., Matsuzawa Y., Okamoto M. Enhanced expression of group II phospholipase A2 in human hepatocellular carcinoma. Biochim. Biophys. Acta.(1994). 1226, 201-205.
- [5]-Gauchard P. A. Les interactions de faible énergie. [Enligne].[http://www.umvf.biomedicale.univparis5.fr/.../gauchard\\_pierre\\_alexis\\_P05.pdf](http://www.umvf.biomedicale.univparis5.fr/.../gauchard_pierre_alexis_P05.pdf).
- [6]- Beautrait A., Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel. Thèse de Doctorat : chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. (2008).122p
- [7]- Ay A., Jain N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. Journal Comput Aided Mol Des. (2007). 21.,281– 306
- [8]- Warren G. L., Andrews C.W., Capelli A. M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H.,...and Head M. S. A CriticalAssessment of Docking Programs and Scoring Functions. Journal of MedicinalChemistry. (2006). 49., 5912-5931
- [9]- Kerrouch L. Etude in silico de l'inhibition de la dihydroorotatedeshydrogenase de plasmodium falciporumdansle cas du paludisme. Mémoire de Master : Université constantine1.Algérie. (2011). 31
- [10]-Warren G. L., Andrews C.W., Capelli A. M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H.,

---

Lindvall M., Nevins N., Semus S. F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J. M.,

Peishoff C. E., Head M. S. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring

Functions. *Journal of Medicinal Chemistry*. (2006). 49,5912-5931.

[11]-Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*. (2004). 3, 935-949.

[12]- Mokrani. E. H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. (2012). 75

[13]- Mokrani. E., Thèse de magister. Université Mentouri. Algérie. (2012).

[14]- Richards, F.M. The protein folding problem. *Sci. Amer*. (1991). 264(1), 34-41.

[15]-J. Dréo, A. Pétrowski, P. Siarry, É. Taillard, Métaheuristiques pour l'optimisation difficile, Ouvrage Eyrolles coordonné par Patrick Siarry. (2003).

[16]-Ewing T. J., Makino S., Skillman A. G., Kuntz I. D., DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases., *J. Comput. Aided. Mol. Des.*(2001). 15, 411-428.

[17]-Welch W., Ruppert J., Jain A. N., Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites., *Chem. Biol*. (1996).3 ,449-462.

[18]-Cho A.E., Wendel J.A., Vaidehi N. et al, The MPSim-Dock hierarchical Docking algorithm: application to the eight trypsin inhibitor cocrystals., *J. Comput. Chem*. (2005). 26 ,48-71.

[19]-WU G., Robertson D. H., Brooks C. L., Vieth M., Detailed analysis of gridbased molecular docking: A case study of CDOCKER-A CHARMM-based MD docking algorithm., *J. Comput. Chem*. (2003). 24 ,1549-62.

[20]- Vieth M., Hirst J. D., Kolinski A., Brooks C. L., Assessing energy functions for flexible docking., *J. Comput. Chem*. (1998).19 ,1612-1622

---

- [21]-Ones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology.*, (1997).267,727-48.
- [22]-Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S.F., Senger S.et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions.*J. Med. Chem.* (2006). 49, 5912-5931.
- [23]-Gohlke H.; Klebe G., Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* (2002). 41(15), 2644-2676.
- [24]-Kramer B., Rarey M., Lengauer T., Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins: Struct, Funct, Genet.*(1999).37(2), 228-241.
- [25]- Chikhi A., Bensegueni A. Comparative Study of the Efficiency of Three Protein-Ligand Docking Program. *Journal of Proteomics and Bioinformatics.* (2008). 1,161-165.
- [26]- Ay A., Jain N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *Journal Comput Aided Mol Des.* (2007).21,281–306.
- [27]-Charifson P. S., Corkery J. J., Murcko M. A., Walters W. P., Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from Docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J. Med. Chem.*(1999). 42 (25), 5100-5109
- [28]-De Oliveira. E., B., Thèse de doctorat. Université Lorraine. France. (2009). 187.
- [29]-Chikhi K., Oumeima A. Inhibition in silico de l'ARN polymérase NS5B pour combattre le virus de l'hépatite C. Mémoire présenté du Diplôme de Master. *Biochimie Moléculaire et Santé.* Université Frères Mentouri de Constantine. (2016).
- [30]-Boutrif C., Merdassi A. Etude in silico de la 5-lipoxygénase en tant qu'enzyme impliquée dans les maladies inflammatoires. *Chimie Organique .université de tlemcen.* (2014).
- [31]-Baxter, J. Local optima avoidance in depot location, *Journal of the Operational Research Society.* (1981). 815–819

[33]- Trott O, Olson A. J., AutoDockVina : improving the speed and accuracy of do cking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading,Journal of Computational Chemistry. (2010). 31,455–461

## ***Chapitre 02: Lipoxygénase***

**1-Généralités :**

La voie de la LOX est une voie métabolique retrouvée chez de nombreux organismes. Chez les animaux, elle mène à la formation de composés impliqués dans les processus inflammatoires, ou encore les processus de cancérisation.

Chez les végétaux, les composés issus de cette voie ont des rôles physiologiques variés (croissance, sénescence,...) et sont impliqués dans la réponse aux blessures ou aux pathogènes.

Ce sont notamment des composés volatils aux rôles antimicrobiens, antifongiques, et responsables de saveurs regroupées sous le nom de « note verte ». Celle-ci est très recherchée dans les industries agroalimentaires et cosmétiques pour les propriétés aromatisantes et antibactériennes des molécules qui la composent.

La « note verte » est retrouvée dans de nombreux fruits et légumes et dans des produits de consommation tels que l'huile d'olive. L'étude de la composition de l'arôme de l'huile d'olive a permis de montrer que des enzymes de la voie de la lipoxygénase sont les principales responsables de la production de cet arôme, notamment la LOX et HPL.

La voie de la lipoxygénase est une voie de biosynthèse présente dans différents tissus chez les plantes comme dans les feuilles et les fruits et fait intervenir différentes réactions enzymatiques [1]. Elle permet de produire des molécules d'aldéhyde et d'alcool à six carbones à partir d'acide linoléique et d'acide linoléique.

Cette voie implique une série d'enzymes qui oxydent et clivent les acides gras polyinsaturés pour produire des aldéhydes. Ces derniers sont réduits en alcools qui sont à leur tour estérifiés pour produire les esters [2].

La LOX, HPL et ADH sont les enzymes responsables de la synthèse des composés volatils contribuant à la note verte herbacée et à la note fraîche dans les fruits [3]. et les tissus verts [4]. Ces composés sont très utilisés dans les parfums et la technologie alimentaire [5]. Chez les animaux, elle mène à la formation de composés impliqués dans les processus inflammatoires, ou encore les processus de cancérisation

**2-Définition :**

La lipoxygénase est un type de protéine enzymatique, dioxygénase non hémique, qui catalyse l'oxydation des acides gras ou autres alcènes [6][7]. Elle entre notamment en jeu dans le métabolisme de l'arachidonate ATE pour sa transformation en eicosanoïdes linéaires : les leucotriènes (dans les leucocytes, les poumons, le cœur, le cerveau et la rate), qui sont impliqués dans les réactions d'anaphylaxie. Elles sont largement représentées dans le règne animal et végétal [8]. Mais également chez les champignons et certaines espèces de bactéries. Elles sont constituées par une seule chaîne polypeptidique dont la masse moléculaire varie de 94 à 104 kDa. L'oxydation des acides gras polyinsaturés par les lipoxygénases produit l'hydroperoxyde entre dans divers processus cellulaires selon l'acide gras initial et la lipoxygénase considérés.

**3-Nomenclature et classification :**

Les lipoxygénases ont été mises en évidence tout d'abord chez des espèces végétales et animales, ce sont les plus étudiées [9]. Par la suite, elles ont été identifiées chez plusieurs espèces de bactéries [10] et chez les champignons.[11] Selon leur origine, végétale ou animale, les LOXs ont des substrats différents. Par ailleurs, des isoformes distinctes existent dans chacun des deux règnes, historiquement classées selon leur spécificité de position de l'oxygénation de leur substrat principal.

Plusieurs nomenclatures ont été proposées pour classer les LOX. La première a été proposée dans les années 1980[12], classant les lipoxygénases en fonction de leur pH optimum. La seconde classification proposée par [13] se base sur leur localisation intracellulaire. Une dernière manière de classer les LOX se base sur leur spécificité réactionnelle dans la production d'acides gras oxydés. Les LOX végétales sont ainsi classées en fonction de la position du carbone de l'acide linoléique qui porte le groupement hydroperoxyde (Figure 2-1), l'oxygène pouvant être inséré sur le carbone 9 (9-LOX) ou sur le carbone 13 (13-LOX), conduisant ainsi à la formation de 9- ou de 13-hydroperoxydes d'acide linoléique (appelés acide 9-hydroperoxyoctadécadiénoïque ou acide 13-hydroperoxyoctadécadiénoïque, respectivement 9-HPOD et 13-HPOD) [14]. En ce qui concerne les LOX animaux, cette classification s'appuie de la même manière sur la position d'oxygénation préférentielle de l'acide arachidonique, qui peut être le carbone 5, 8, 9, 11, 12 ou 15, et donnant respectivement les 5-LOX, 8-LOX, 9-LOX, 11-LOX, 12-LOX et 15-

LOX[15]. Outre cette régiospécificité, la nomenclature fait parfois apparaître la notion de stéréospécificité dans le nom donné aux LOX [21] : les lipoxygénases formant des 9-hydroperoxydes de configuration S sont appelées 9S-LOX, celles formant des 13-hydroperoxydes de configuration R sont appelées 13R-LOX. Il en va de même pour les LOX animales agissant sur l'AA

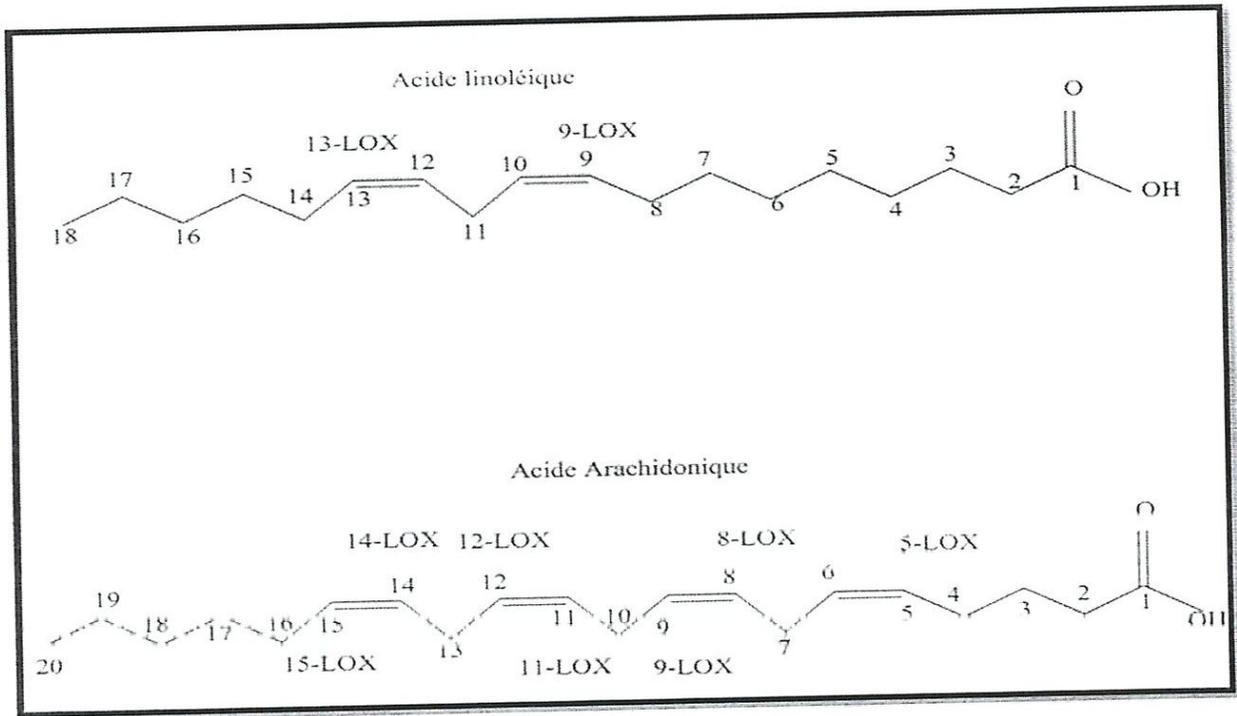
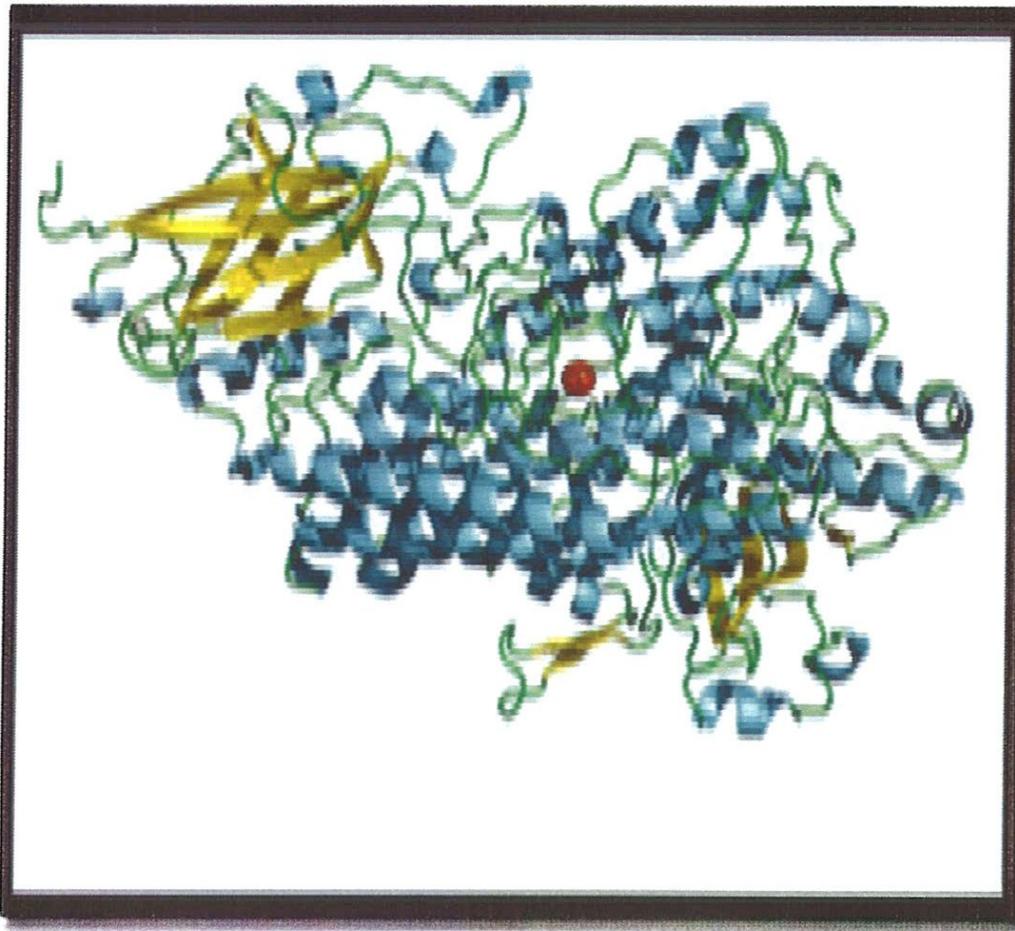


Figure 2-1: Régiospécificité réactionnelle des lipoxygénases végétales et animales

**4-Structure :**

Les lipoxygénases sont des dioxygénases contenant un atome de fer non hémique [15]. Ce sont des monomères formés en moyenne de 900 résidus d'acides aminés, pour une masse moléculaire de 94 à 104 kDa chez les plantes. Leur séquence est plus courte chez les animaux d'environ 150 à 900 résidus, pour une masse moléculaire de 75 à 80 kDa [15]. La lipoxygénase 1 de soja (n° PDB : 1YGE) est la plus étudiée. Sa structure a servi de base à l'établissement d'une structure type commune à la famille des lipoxygénases (Figure2.2)



**Figure 2-2 :** Structure générale des lipoxygénases

Actuellement, 22 structures de LOXs ont été résolues par RX et sont répertoriées dans la banque de données PDB

Bien que les lipoxygénases animales et végétales présentent peu de similarités dans leurs séquences en acides aminés (environ 10%), leurs structures sont assez semblables, organisées en deux domaines distincts : un domaine N-terminal composé essentiellement de feuillets organisés en tonneau, et un domaine C terminal composé essentiellement d'hélices  $\alpha$ . Ce domaine contient l'atome de fer catalytique [16]

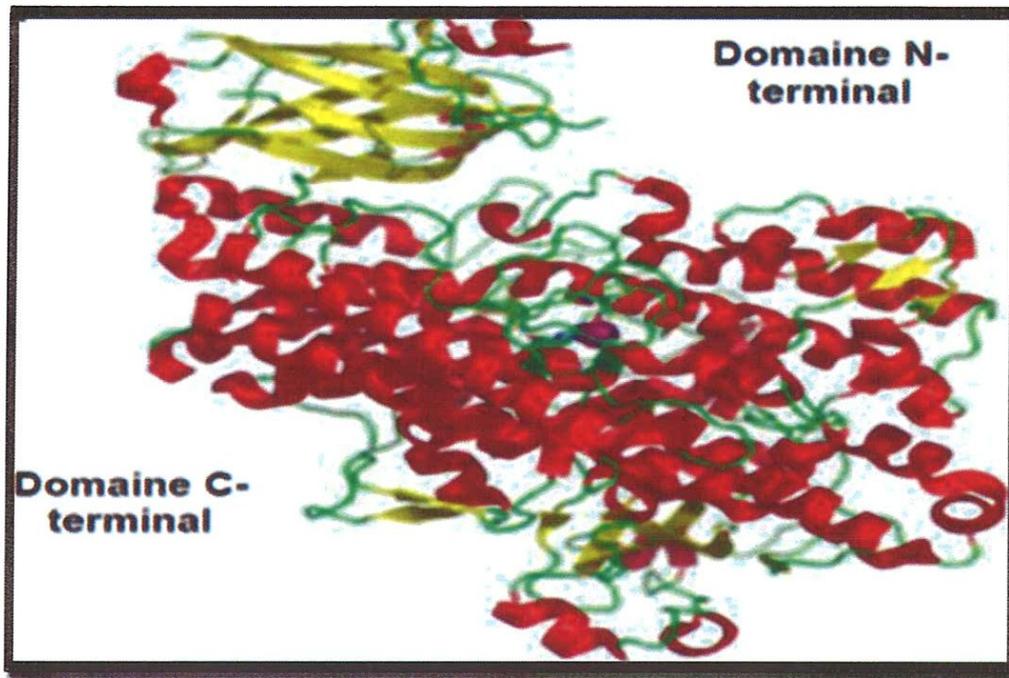


Figure 2-3: Structure tridimensionnelle de la LOX1 de soja

#### 4.1-Domaine N-terminal :

Il est formé de deux couches de quatre feuillettes antiparallèles, composé en majorité de résidus hydrophobes et aromatiques [16]. Il présente 23 % d'identité de séquence en acides aminés avec celui-ci, contre 11% avec celui des LOXs végétales. [17] Il jouerait un rôle dans l'interaction de la protéine avec les membranes lipidiques. [18] Remarquons que ce domaine en  $\beta$ -sandwich est un des membres définissant la famille de domaines PLAT. [19]

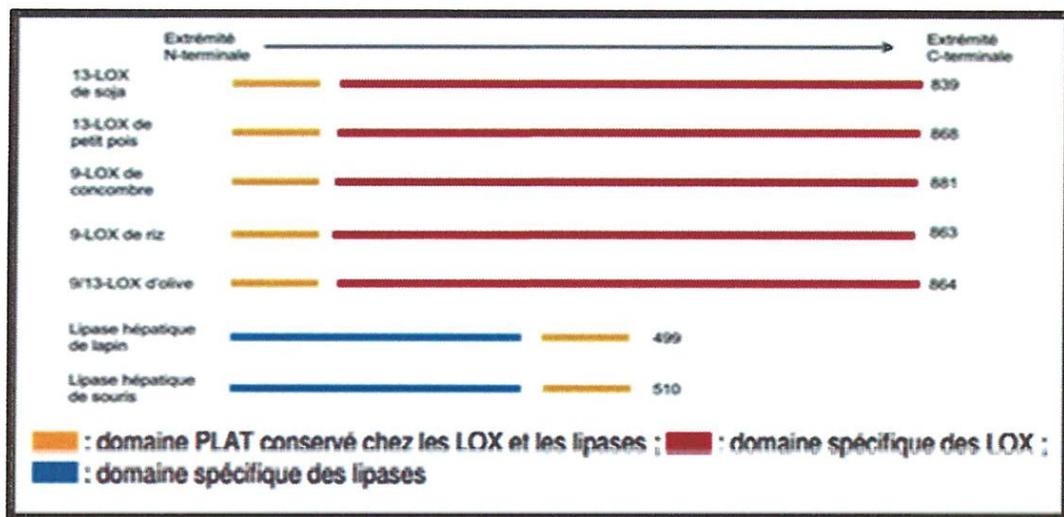


Figure 2-4: Conservation du domaine PLAT chez les LOX et les lipases

#### 4.2- Domaine C-terminal :

Le domaine C-terminal est principalement formé de 23hélices et contient l'atome de fer non héminique, essentiel à l'activité des LOXs. Deux longues hélices se trouvent au centre de ce domaine catalytique. Elles ont la particularité de présenter deux segments adoptant une conformation d'hélice  $\pi$  (résidus495-506 et 685-690 chez la LOX1 de soja[20])

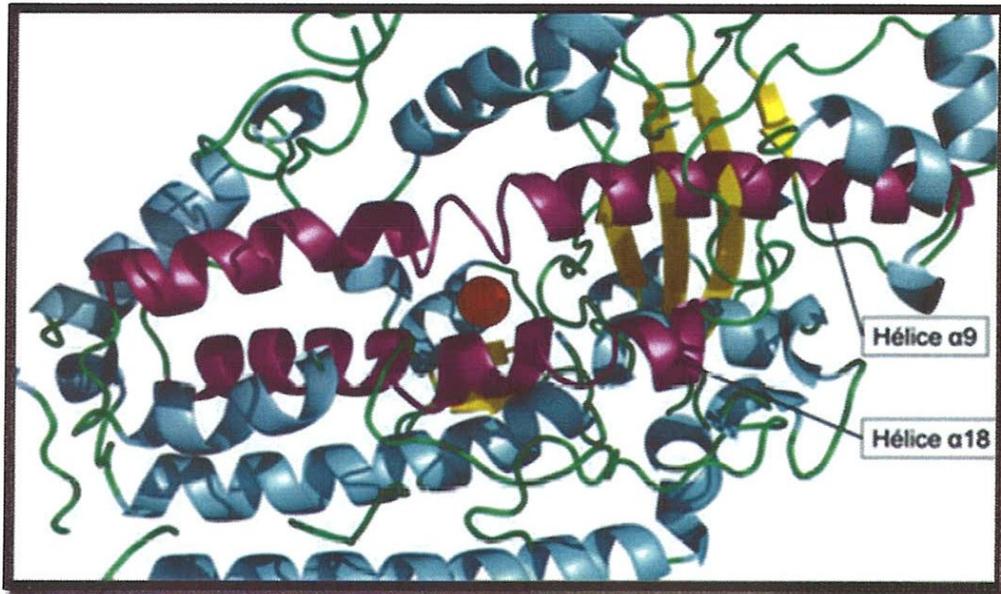


Figure 2-5 : Domaine C-terminal de la LOX1 de soja, et zoom sur les hélices centrales

Elles ont la particularité de présenter deux segments adoptant une conformation d'hélice  $\pi$ . Le site actif se trouve au milieu de cet ensemble d'hélices : il est décrit comme un assemblage de deux cavités, proches de l'atome de fer catalytique

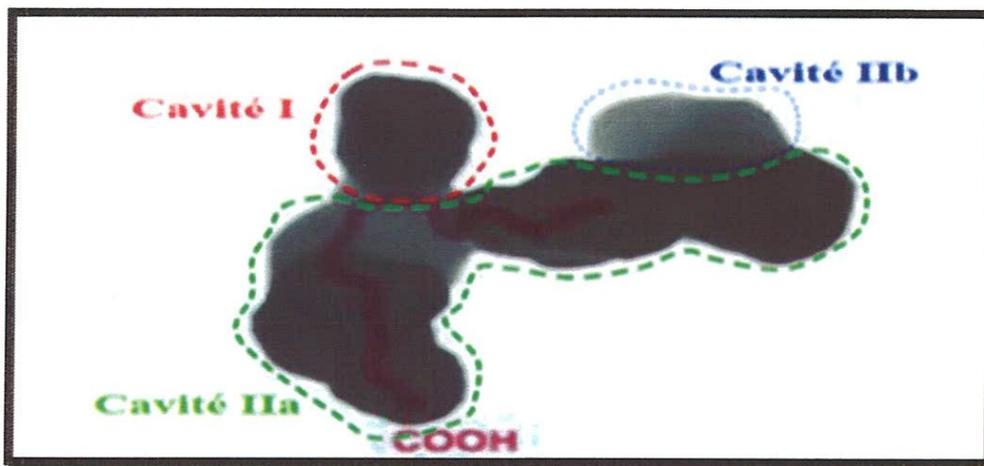
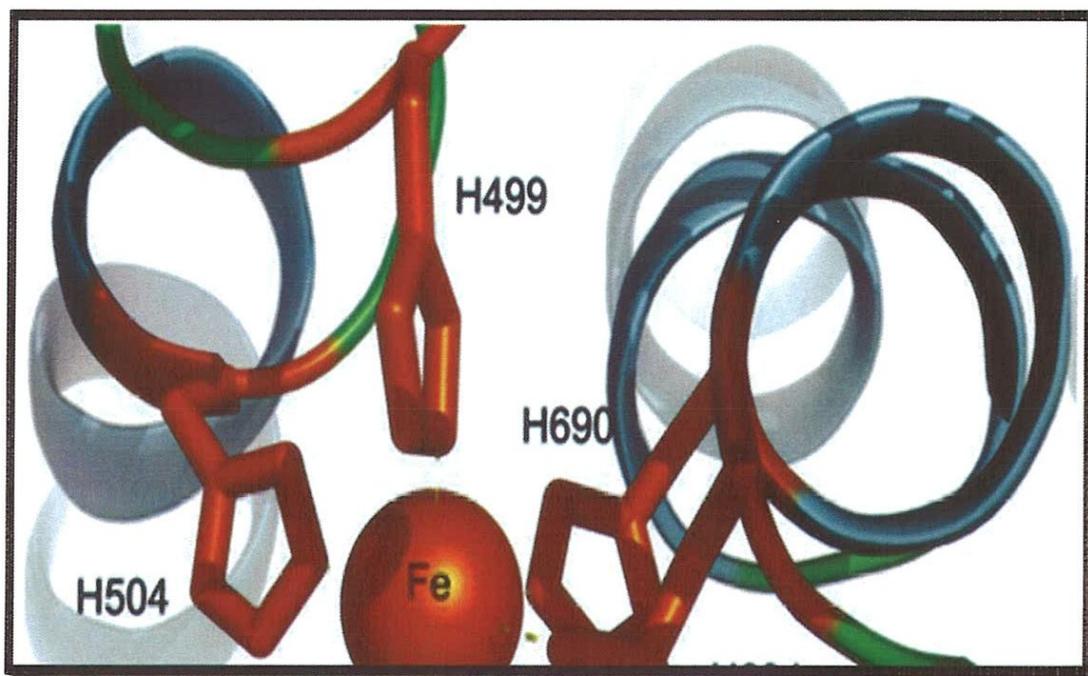


Figure 2-6: Les cavités internes de la LOX1 de soja.

### 4.3. Centre catalytique :

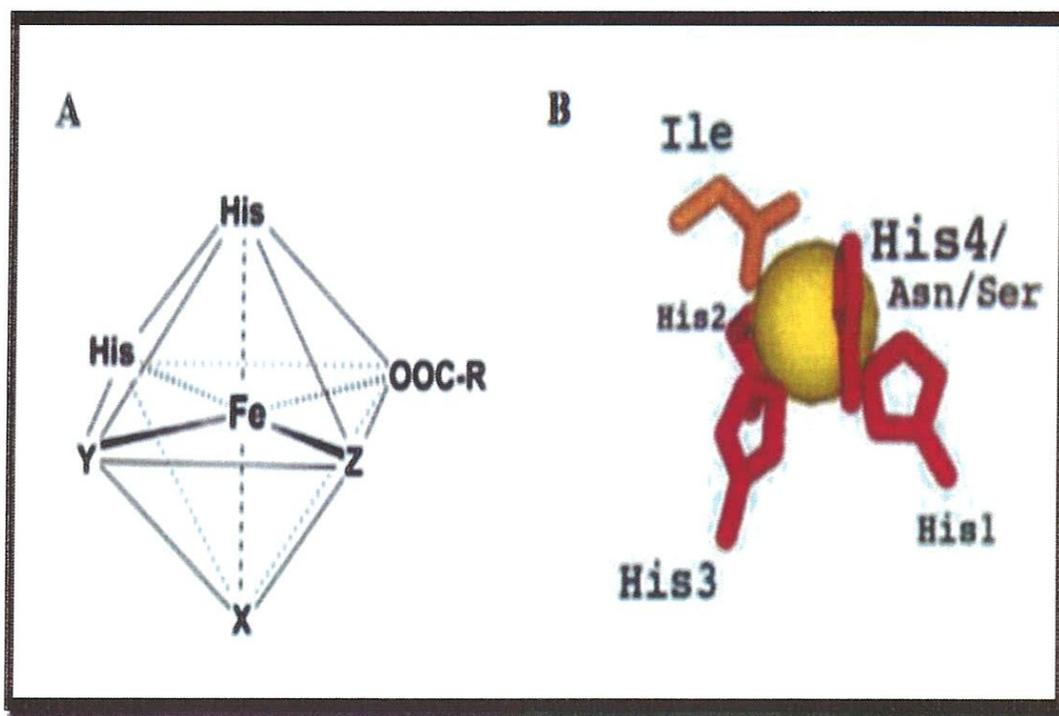
**Atome de fer** Les lipoxygénases possèdent en général un atome de fer non hémique. Cet atome de fer existe sous les formes ferreuse et ferrique, et seule la forme ferrique permet à la réaction enzymatique de se produire [21]. Une lipoxygénase contenant un atome de manganèse à la place de l'atome de fer a également été cloné à partir d'un champignon et caractérisée.



**Figure 2-7 :** Coordination de l'atome de fer catalytique de la LOX1 de soja

Il est ancré au sein du site actif grâce à un motif structural dit de triade faciale 2-His-1carboxylate. Le carboxylate correspond à la chaîne latérale d'un résidu acide, tel l'aspartate ou le glutamate. Chez les LOXs, par contre, c'est le groupement carboxylate du résidu C-terminal (une isoleucine, conservée dans toutes les isoformes) qui coordonne l'atome de fer.

Deux des trois sites de coordination X, Y, Z sont occupés par une histidine et une asparagine chez les LOXs végétales et deux histidines chez la 15-LOX de lapin. Le dernier site de chélation peut être occupé par un ligand exogène, comme une molécule d'eau, un inhibiteur chélateur ou encore le substrat.



**Figure 2-8:** Représentation schématique du complexe de coordination de l'atome de fer non hémunique (A) et ligands autour de l'atome de fer des lipoxygénases (B).

### 5-Structure et stabilité :

La plupart des données concernant la structure et le mécanisme d'action de la LOX proviennent de la LOX1 de soja qui constitue la principale source de LOX[22]. La température optimale de la lipoxygénase varie entre 30°C et 40°C [23]. La lipoxygénase est considérablement labile à des températures supérieures à 35°C [24]. Elle présente un maximum d'activité à pH 6.0 et garde une activité assez importante à pH compris entre 5.0 et 6.5 alors que ont signalé que le pH optimum de la LOX de pulpe d'olives est de l'ordre de 5 Les deux isoformes de la LOX de soja sont actifs à pH 6 ou 9 [25].

### 6-Rôle :

Les LOXs catalysent la dioxygénation régio et stéréospécifique des acides gras, polyinsaturés contenant un système (1Z,4Z)-pentadiène, l'acide linoléique, l'acide  $\alpha$ -linoléique ou l'acide arachidonique pour produire les hydroperoxydes correspondants [24]. Ces composés sont très réactifs et toxiques pour les cellules [26], ils constituent le point de départ pour plusieurs réactions qui forment une variété de composés à courte chaîne carbonylée[27]. En plus, les LOXs participent à la synthèse de plusieurs composés comme le

traumatin, l'acide abscissique, . Les LOXs sont aussi responsables de la production d'un nombre de substance comme les composés aromatisants impliqués dans le développement des arômes. Ces composés peuvent influencer, positivement ou négativement, la flaveur ou l'arôme de plusieurs produits de plantes[28]. Les LOXs de plantes ont été associées à des processus physiologiques variés sur la base d'une expression différente des gènes.

### 7-Réactifs et spécificité

Les LOXs des plantes sont classées selon la position spécifique de l'oxygénation de l'acide linoléique qui est oxygéné au niveau du carbone 9 (9-LOX) ou du carbone 13 (13-LOX) de l'hydrocarbone du pivot de l'acide gras [29]. Cette spécificité peut être modifiée en fonction des conditions de pH et de la concentration en O<sub>2</sub> du milieu. La spécificité de position d'une LOX n'est pas directement prévisible d'après sa séquence primaire, même si certains éléments structuraux reliés à cette propriété sont connus. Chez les végétaux, les substrats préférentiels de l'enzyme sont l'acide linoléique (C18:2) et l'acide linoléique (C18:3), deux constituants majeurs des membranes cellulaires [30].

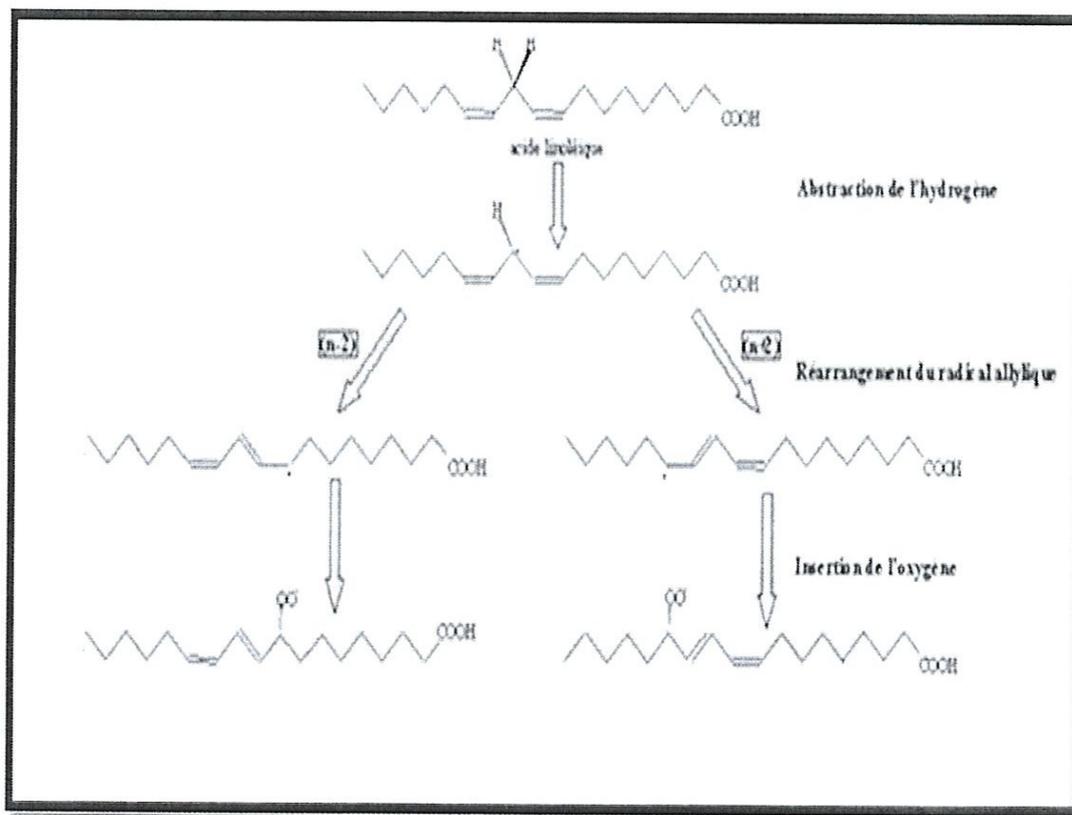
### 8-Mécanisme réactionnel :

Les différentes étapes conduisant à la production d'hydroperoxydes à partir d'acides gras polyinsaturés portant un système (1Z,4Z)-pentadiénique par l'intermédiaire des lipoxygénases sont maintenant relativement bien identifiées. En revanche, les mécanismes qui peuvent expliquer les différences de régiospécificité et stéréospécificité entre les différentes lipoxygénases demeurent à ce jour mal connus.

**Etape 1** : consiste en l'abstraction stéréospécifique d'un atome d'hydrogène à partir du centre méthylénique du système pentadiénique. Cette étape limitante, chez la LOX de soja, correspond à un transfert couplé d'électron et de proton .L'atome de fer sous forme oxydée Fe<sup>3+</sup> est lié à l'ion hydroxyde HO<sup>-</sup> qui occupe la 6 place de la sphère de coordination. Dans le même temps, un électron est arraché au substrat par un phénomène de « tunneling » et est dirigé jusqu'à l'atome de fer, ainsi réduit, et le proton est déplacé du substrat à l'ion hydroxyde pour former une molécule d'H<sub>2</sub>O. Chez les LOX végétales, seul le carbone 11 prochiral de l'acide linoléique et de l'acide linoléique est attaqué. Le radical intermédiaire formé par l'abstraction de l'hydrogène sur le carbone central est décrit comme un radical pentadiényl sur lequel la densité électronique serait répartie sur l'ensemble des cinq carbones.

- **Etape 2** : réarrangement radicalaire du radical pentadiényle formé Le radical pentadiényle subit une redistribution de ses électrons, dans la direction de l'extrémité soit méthylène [+2], soit carboxylique [-2]. Cette étape est également fonction de la position du substrat au sein du site actif.
- **Etape 3** : insertion stéréospécifique d'oxygène moléculaire L'insertion stéréospécifique de l'O<sub>2</sub> conduit à la formation d'un radical hydroperoxy intermédiaire qui est ensuite réduit en l'acide HPETE correspondant. Les étapes d'abstraction d'un atome d'hydrogène et d'insertion d'oxygène moléculaire sont antarafaciales, c'est-à-dire qu'elles ont lieu sur des faces opposées du substrat.

Ces intermédiaires instables peuvent ensuite être convertis en acide HETE correspondant, soit de manière non enzymatique, soit par l'action d'une peroxydase. Les produits issus de la voie des LOXs, aussi bien dans le règne animal que végétal, sont principalement de stéréochimie S. Cependant, des produits de stéréochimie R ont déjà été observés, notamment dans des invertébrés aquatiques, des plantes et aussi chez l'homme [31].



**Figure 2-9:** Schéma du mécanisme réactionnel de la lipoxygénase

Parallèlement à ce mécanisme réactionnel, l'atome de fer du site actif de l'enzyme est impliqué dans un cycle d'oxydo-réduction (Figure 2-10).

Dans la forme inactive des LOXs, l'atome de fer est réduit ( $\text{Fe}^{2+}$ ). L'oxydation de l'atome de fer sous sa forme ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) est nécessaire pour que la catalyse commence. Puis, l'arrachement de l'hydrogène du groupement méthylène allylique conduit à la formation d'un radical pentadienyl et d'un proton (Figure 2-10 étape A). Parallèlement à l'abstraction du proton, se produit l'abstraction d'un électron. L'électron réduit l'atome de fer sous sa forme  $\text{Fe}^{2+}$ . L'insertion antarafaciale, c'est-à-dire sur la face opposée du substrat, d'une molécule d'oxygène génère un radical hydroperoxide réduit en anion par l'oxydation simultanée de l'atome de fer sous sa forme ferrique (Figure 2-10 étape B). Un proton est capté pour former l'hydroperoxide (Figure 2-10 étape C). L'enzyme est alors capable de recommencer un cycle de réaction.

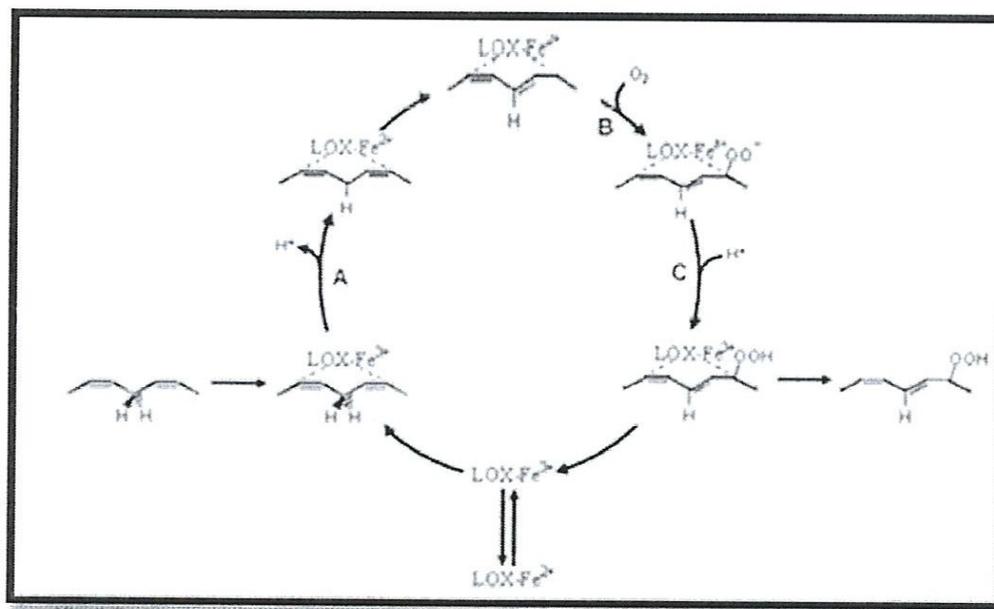


Figure 2-10 : Oxydation de l'atome de fer de la lipoxygénase au cours de la réaction catalytique

### 9-Inhibition de la lipoxygénase

L'inhibition de la LOX est la méthode la plus complète de la suppression des composants I.T et lipoxine de la cellule ou le système animal. Contrairement à diverses stratégies antagonistes, l'inhibition complète de la conversion du substrat par la LOX bloque l'action de l'ensemble des médiateurs puissants obtenus à partir le LTA4. Un certain nombre

de classes d'inhibiteurs ont été inventés qui inhibent l'enzyme. Ceux-ci peuvent être largement tenir représenter par deux catégories [32]

### **9-a Les inhibiteurs non spécifiques :**

Les inhibiteurs de cette classe inhibent la LOX par une interaction sur d'autre domaine que le site actif,

### **9-b Les inhibiteurs spécifiques (Compétitifs):**

Les inhibiteurs pharmacologiques de la LOX peuvent être classés en trois groupes: (1) les composés redox-actifs qui réduisent le Fer du site actif, (2) les chélateurs de Fer, et (3) les inhibiteurs du type non-redox qui interfèrent probablement avec les sites putatifs liant les acides gras .Les derniers agissent directement sur le site actif de la LOX

Il existe une grande ressemblance entre la classification des inhibiteurs des lipoxygénases végétales et celle des inhibiteurs des lipoxygénase animales. De plus, de nombreuses molécules se révèlent comme étant inhibitrices de l'activité lipoxygénasique à la fois dans le règne animal et végétal.

## **9.1-Inhibiteurs des lipoxygénases végétales**

Comme l'a décrit Andrianarison [1991] , les inhibiteurs des lipoxygénases végétales peuvent être classés en trois grands groupes :

### **9.1.1-Les agents chélateurs :**

La conception d'inhibiteurs capable de chélater l'atome de fer au sein de la lox s'est avérée être une démarche intéressante. De nombreux inhibiteurs de lox ont présenté dans un premier temps, une fonction acide hydroxamique un ligand de métaux les plus puissant. bien que ces composés possèdent un pouvoir inhibiteur in vivo pour donner le carboxylate correspondant inactif.[33]

La lipoxygénase de type 1 de soja peut former des complexes avec des molécules possédant un ou plusieurs noyaux catéchols [34]. Il s'en suit une inhibition de l'activité lipoxygénasique.

### 9.1.2-Les antioxydants :

Ces inhibiteurs interagissent avec la fonction pseudo-péroxydase dans la LOX. Ils forment également des complexes avec la lipoxygénase ; et en plus, ils réduisent le fer de l'enzyme de son état ferrique à son état ferreux inactif. ( $Fe^{2+}$ ) et maintiennent l'enzyme à son état inactif bloquant ainsi la formation de produits par l'intermédiaire des mécanismes antioxydants.

C'est le cas par exemple du 2-méthyl-6-(3-hydroxy-4 méthyl phényl) -2-heptène-4-one ou turméroneol A et du 2-méthyl-6-(2-hydroxy-4 méthyl phényl) -2-héptène-4-one ou turméroneol B [34]. Les polyhydroxyflavones, et en particulier la quercétine, sont également à classer parmi les antioxydants [35]

### 9.1.3-Les analogues de substrats

Certains analogues des acides gras insaturés peuvent inhiber les lipoxygénases végétales. Ainsi, un analogue de l'acide arachidonique : l'acide ETYA peut inhiber la lipoxygénase de soja. Il est qualifié de substrat suicide [36].

Il existe d'autres inhibiteurs qui ne peuvent pas être considérés comme appartenant à l'un de ces trois groupes, c'est le cas de l'acide 12-iodo-cis 9-octadécénoïque qui est un inhibiteur irréversible de la lipoxygénase de soja [35]

## 9.2- Inhibiteurs des lipoxygénases animales

### 9.2.1- les antioxydants :

Dans ce groupe, nous retrouvons les flavonoïdes [36], l'acide curcumique [36] et l'acide caféique [38] ce ne sont que quelques exemples parmi tant d'autres .

### 9.2.2- les analogues de substrats

Ce sont surtout des analogues de l'acide arachidonique qui ont été étudiés. Ainsi , l'acide 11,12-déhydroarachidonique et l'acide 5,6- déhydroarachidonique sont des inhibiteurs des lipoxygénases animales , et plus particulièrement de la 5- lipoxygénase. L'acide 5 ,8,11,14- eicosatétraénoïque est également un inhibiteur de la 5 lipoxygénase [37]

**9.2.3- Antagonistes compétitifs des récepteurs aux lipoxygénase**

Le MK886 est un puissant inhibiteur de la synthèse leucotriènes en effet, il est capable de se fixer sur le récepteur de la 15- lipoxygénase au niveau de la « FLAP » et de déplacer celle- ci de son récepteur. Or, la 5-lipoxygénase n'est active que lorsqu'elle est liée à son récepteur [38]

---

**REFERENCES**

- [1]- Gargouri. M., Ben Akacha.N.,Kotti. F., Ben Rejeb. I. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement.* (2008). 12 ,185-202.
- [2]- Conde. C., Deltrob. S., Gerosa. H. *Journal of Plant Physiology.* (2008).165,1545-1562.
- [3]- Yilmaz.E., Tandon. K.S., Scott. J.W., Baldwin. E.A., Shewfelt. R.L. *Journal of Plant Physiology.* (2001). 158,1111-1116.
- [4]- Gargouri. M., Ben Akacha. N., Legoy. M.D. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology.* (2004). 119,171-180.
- [5]- Gargouri. M., Drouet. P., Legoy. M. D. *Journal of Biotechnology.* (2004).111,59-65.
- [6]- Delattre, J.; Beaudoux , J-L. ; Bonnefort-Rousselot,. D. *Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques.* Tec & Doc Lavoisier : LondresParis – New York.(2005).
- [7]-Leake, D.S. Isoflavonoids as inhibitors of lipid peroxidation and quenchers of singlet oxygen . In *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C.A.; Packer, L.; Eds. Marcel Dekker: New York. (1998). 295 302.
- [8]- SiedowJ.N. plant lipoxygenase : structure and function.*Annu.Rev.PlantPhysiol.Plant Mol.Biol.* (1991).42,145-188
- [9]- SiedowJ.N.*Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* (1991).42,145-188
- [10]- Vidal-Mas, J., Busquets, M., et Manresa, A. Cloning and expression of a lipoxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *Antonie Van Leeuwenhoek.* (2005). 87, 245-251.
- [11]-Plagemann, I., Zelena, K., Arendt, P., Ringel, P.D., Krings, U., et Berger, R.G. LOXP sa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* (2013).
- [12]- Galliard, T., Chan, H.W.-S. Lipoxygenases. In *The Biochemistry of Plants*,P.K. Stumpf, et E.E. Conn, cds. (New York :Academic), (1980), 131-161.

- [13]- Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D., Bell, E. Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter*. (1994). 12, S41-S42
- [14]- Liavonchanka, A., Feussner, I. Lipoxygenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol*. (2006). 163, 348-357.
- [15]- Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A., et Brash, A.R. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chemistry & Biology*. (2007). 14, 473-488.
- [16]- Boyington. J. C., Gaffney. B. J., Amzel. L. M. *Journal of Science*. (1993). 260, 1482-1486.
- [17]- Gillmor .S.A., Villaseñor .A., Fletterick. R., Sigal. E., Browner. M.F. *Nature Structural Biology*. (1997). 4, 1003-1009
- [18]- Chen. X. S., Funk. C. D. *Journal of Biological Chemistry*. (2001). 276, 811-818.
- [19]- Bateman. A., Sandford. R. *Current Biology*. (1999). 9, 588-590.
- [20]- Groot. J.J.M.C., Veldink. G.A., Vliegthart. J.F.G., Boldingh. J., Wever. R., van Gelder. B.F. *Journal of Biochimica and Biophysica Acta - Enzymology*. (1975). 377, 7179.
- [21]- Salas. J. J., Sanchez. J. *Plant Science*. (1999). 143, 19-26.
- [22]- Daglia. M., Aceti. C., Giorgetti. S., Papetti. A., Gazzani. G. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (2005). 53, 6448-6454.
- [23]- Williams, M., Salas, J.J., Sanchez, J., Harwood, J.L. Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). *Phytochemistry*. (2000). 53, 13-19
- [24]- Daglia, M., Aceti, C., Giorgetti, S., Papetti, A., Gazzani, G. Purification and Characterization of Soluble *Cichorium intybus* Var. *silvestre* Lipoxygenase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (2005). 53, 6448-6454
- [25]- Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L., Sanchez, J. Lipoxygenase Activity in Olive (*Olea europaea*) Fruit. *JAOCS*. (1999). 76, 1163-1168
- [26]- Mene-Saffrane, L., Esquerre-Tugaye, M. T., Fournier, J., Beffa, R., Grosjean-Cournoyer, M. C. Lipoxygénase overexpression in plants and reduction in plant sensitivity to diseases and

attacks from pathogenic organisms. World Intellectual Property Organisation (WO/2002/099112). (2002).

[27]- Sanchez. J., Harwood. J. L. European Journal of Lipid Science and Technology. (2002). 104, 564-573

[28]- Coffa. G., Brash. A.R. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. (2004). 101, 15579-15584.

[29]- Kühn. H., Borchert. A., Free Radical Biology and Medicine. (2002). 33, 154-172.

[30]- Spaapen. L.J.M., Verhagen. J., veldink. G., vliegthart. J.F.G., propreitie of a complexe of Fe(3) soybean lipoxygenase -1- and 4-nitrocatechol Biochim. Biophys. Acta. (1980). 617, 132-140

[31]- Imai. S., Maimi .M., Furihata .K ., Hayakawa y . Hawos turmeronol A and turmerool B , New inhibitors of soybean lipoxygenase Agric. Biol. Chem. (1990). 54(9), 2367-2371

[32]- Takahama Uirreversible inhibition of prostagbandin and leukotriene biosynthesis from arrachodonic acid by 11,12-dehydro –and 5,6-dehydro arachidonic acids respectively phytochem. (1985) .241, 1443-1446.

[33]- Kuhn. H., Holshutter .H., Schewe T., The mechanism of inactivation of lipoxygenase by acetylenic Fatty acids Febs letters. (1984) 139, 577-583.

[34]- Rotenberg. S.A., Gradizio. A.M., Selzer. A.T., Chap. H.C. In activation of soybean lipoxygenase -1-by-12-iodo-cis-9-octa decenoic acid Biochemistry. (1988) 27, 8813-8818.

[35]- Wheller. E.L., Berry. D.L. In vitro inhibition of mouse epidermal cell lipoxygenase by flavonoids: structure-activity relationships carcinogenesis. (1986). 7(1), 33-36.

[36]- koshihara. y., tomohiro N. SEI-ITSUM., AI-NA-LAO yasuko. F., takashi T. Caffeic acid is selective inhibitor for leukotrienres biosynthesis biochem .biophys .acta. (1984). 792, 92-97.

[37]- Corey. E.J., Lansbury P.T., Irreversible inhibition of prostagbandin and leukotriene biosynthesis from arrachodonic acid by 11,12-dehydro –and 5,6-dehydro arachidonic acids respectively J. Am. Chem. Soc. (1983) .105, 4093-4094.

[38]-Rouzer. C.A., Ford-Hutchinson A.W., Morton H.E., Gillard J.W. MK886 a potent and specific LT biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenge leukocytes *J.Biol.Chem.* (1990) .265,1436-1442.

## *Chapitre 03: Résultats et discussion*

### **1- Méthodologie de travail :**

L'objectif principal de notre travail est de modéliser les interactions entre des molécules inhibitrices (ligands) et deux protéines cibles appartenant à la famille des LOXs (4RPE et 4QWT). Ces enzymes jouent le rôle de catalyseurs dans l'oxydation des acides gras libres insaturés.

Pour cela nous avons procédé comme suit :

En premier lieu, pour vérifier si le protocole que nous venons de développer est correcte, nous avons jugé utile d'évaluer d'abord la performance du programme AutoDock vina par le test :

- d'écart quadratique moyen ou le RMSD (root mean square deviation).
- d'analyse visuelle.

En second lieu, nous avons appliqué la technique du docking moléculaire afin de rationaliser et modéliser le mode d'interaction entre les inhibiteurs (ligands) et les deux isoformes de la LOX d'une part, et l'évaluation de l'énergie de complexes obtenus d'autre part.

### **2 -Présentation des molécules étudiées :**

L'inhibition de LOX par diverses molécules a fait l'objet de cette partie dont le but principal est une meilleure compréhension de ce phénomène.

Ces molécules peuvent être classées selon leur origine en deux catégories : synthétiques et naturels

#### **2.1- Les inhibiteurs :**

Dans cette partie, nous sommes attachés à l'étude des inhibiteurs naturels tels que les tocophérols et les polyphénols

Tableau 3-1: structures des inhibiteurs

CODE CID	Structure
$\alpha$ -tocophérol	
$\beta$ -tocophérol	
$\delta$ -tocophérol	
$\gamma$ -tocophérol	
Acétat d' $\alpha$ -tocophéryl	
2-phenyl-4-chromanol	
(-)-épigallocatechine gallate	
Hydrohytyrsol	

### 2.2-Récepteur :

Parmi les complexes proposés par la PDB, nous avons choisi le code 4RPE et 4QWT, car il s'agit des structures correctement définies.

- **4RPE** : Ce code représente la structure 3D de la Lipoxygénase constituée d'une seule chaîne (A) dans laquelle se trouve le seul ligand qui est le [(2R)-3-{{(S)-(2-aminoethoxy) (hydroxy) phosphoryl} oxy}-2-(tetradecanoyloxy) propyloctadecanoate ] ; avec une résolution de 1,60Å.
- **4QWT** : Ce code présente la structure 3D de la Lipoxygénase constituée des 4 chaînes (A, B, C, D) dont la seule chaîne C a un ligand qui est l'**acide arachidonique**, avec une résolution de 2Å.

### 3- Fiabilité de programme utilisé :

#### 3.1-Test RMSD :

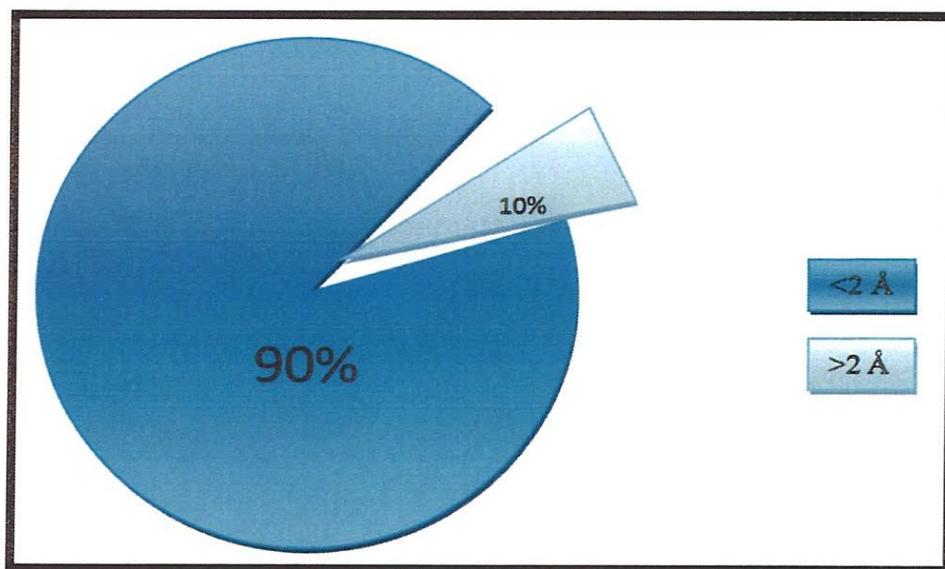
La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé par écart de la déviation quadratique moyenne « RMSD » de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB. La prédiction est acceptable si sa valeur RMSD est inférieure à 2Å. La performance du logiciel Vina a été évaluée sur 100 complexes protéines-ligands tirés de façon aléatoire de la PDB. Les écarts quadratiques moyens entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles du ligand amarré par vina, ont été calculés.

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

Tableau 3-2: Résultats obtenus des RMSD des complexes protéines-ligands

N°	CODE	RMSD (Å)	N°	CODE	RMSD (Å)	N°	CODE	RMSD (Å)
1	1TRM	0.35	34	4NRE	1.76	67	2P9A	1.25
2	4OXY	1.50	35	4OTY	0.45	68	1X1M	0.67
3	2Q71	1.12	36	1AQ1	2.70	69	3GCU	0.44
4	3A37	2.88	37	1JNQ	1.09	70	2WIH	0.95
5	5HVX	0.69	38	1R50	1.83	71	1LOK	2.10
6	1C23	1.66	39	1VIJ	5.10	72	1KQO	1.62
7	1R19	1.92	40	1VIK	0.96	73	1FT7	1.50
8	2O9B	1.29	41	2X7S	2.00	74	1CP6	1.00
9	1SFY	1.50	42	2X7T	1.04	75	1MT3	2.50
10	2O9C	1.28	43	2X7U	1.07	76	2B3H	1.80
11	2ZSC	0.84	44	3BKK	0.60	77	2UG6	1.43
12	3V8K	0.90	45	3S7S	0.54	78	2P98	1.66
13	4R9J	3.07	46	3V8I	0.90	79	2EVO	1.28
14	4YDQ	3.80	47	3ZMS	0.72	80	3VH9	0.40
15	5G26	1.44	48	4EEQ	0.85	81	4G1F	0.64
16	1CX2	0.85	49	4GL5	1.19	82	4GLW	0.32
17	3LN1	0.69	50	4LH7	1.15	83	1QIT	1.97
18	3NT1	0.73	51	1EQG	0.69	84	1B59	0.80
19	1CK6	5.90	52	1EQH	0.63	85	1IKI	1.01
20	1EC3	1.25	53	1HT5	1.20	86	3NK2	1.35
21	1QPT	4.93	54	3DJK	1.37	87	4UYU	1.79
22	1SEU	1.73	55	3KK6	1.03	88	2WYZ	0.98
23	1T8I	0.56	56	3N8W	1.11	89	3QBJ	0.59
24	1TCX	0.98	57	3N8X	1.12	90	2I3Z	0.89
25	2BPY	2.20	58	4FM5	1.09	91	4COX	1.50
26	2BQV	1.57	59	4M10	0.35	92	4OTY	1.00
27	8A3H	0.71	60	1HT5	1.20	93	2ONC	0.89
28	5IE3	1.39	61	6COX	0.59	94	3GOG	1.20
29	3C34	1.00	62	3KWF	0.51	95	3GOC	1.00
30	5K7X	1.25	63	1YVM	0.36	96	3RUG	0.93
31	2IIV	0.53	64	1YW8	0.57	97	1HU9	0.37
32	4C32	1.01	65	2AIE	1.51	98	1NO3	0.42
33	4M11	0.25	66	2AI7	1.04	99	4RPE	1.50
100	4QWT	0.93						

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



**Figure 3-1:** Résultats du test RMSD

Ce graphe montre que 90% des valeurs sont inférieures ou égales à 2Å, alors que 10% seulement sont supérieures à 2Å. De tels résultats apportent la preuve que le programme vina reproduit bien les données expérimentales et peut être utilisé en toute confiance pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

### 3.2- Analyse visuelle

L'analyse visuelle par vina est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD (tableau3-3). Pour cela il suffit de comparer, par simple superposition la conformation du même ligand calculé par vina (en vert) à celle obtenue expérimentalement que l'on retrouve dans la PDB (en rouge). Les schémas sont représentés sur la figure3-2.

**Tableau 3-3 :** RMSD de quelques complexe protéine-ligand

Cod PDB	Code des ligands	RMSD (Å°)
5COX	S58	0.32
8A3H	HEM	0.71
1TRM	BEN	0.35
1YVM	TMG	0.36
3VH9	HQY	0.40
2I3Z	LIR	0.89
4RPE	8PE	1.50
4QWT	ACD	0.91

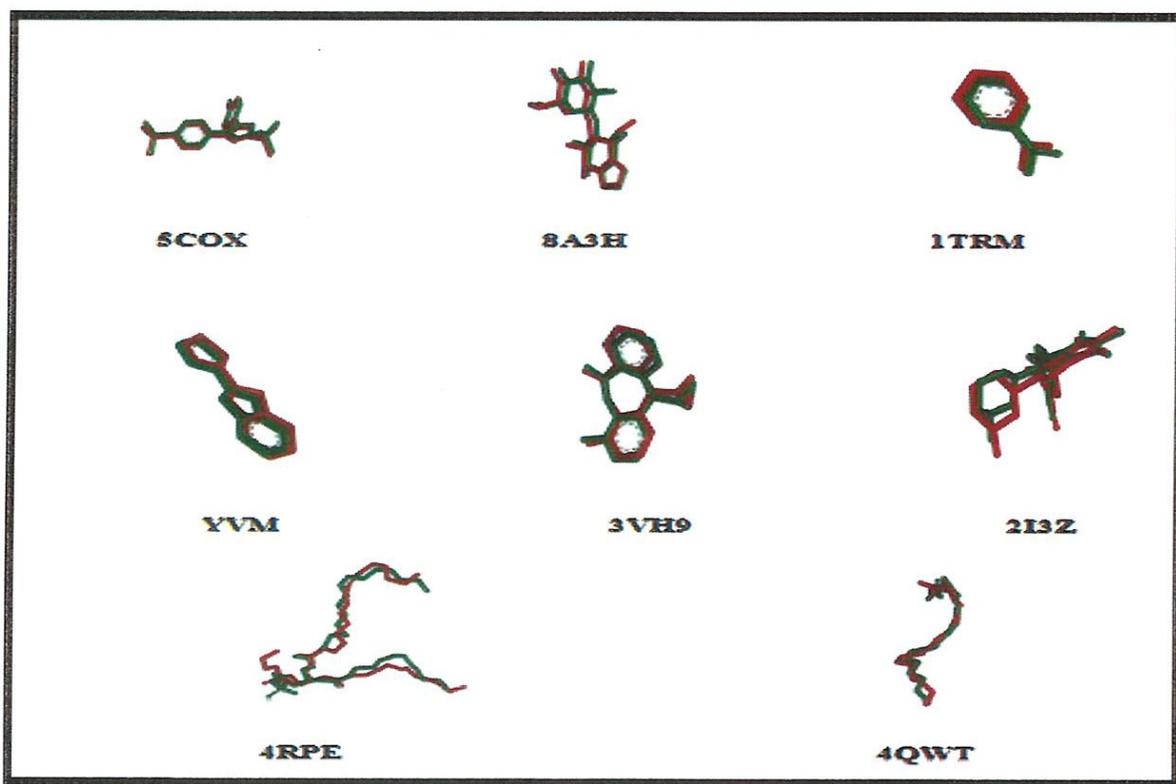


Figure 3-2: Visualisation des différents complexes de RMSD

A la lumière des résultats obtenus par le RMSD et l'analyse visuelle, nous pouvons conclure qu'on peut utiliser le vina par le docking moléculaire de LOX ainsi que son inhibition.

#### 4-Démarche de Docking moléculaire :

##### 4.1-Préparation des protéines :

Le fichier du récepteur utilisé par AutoDock Vina doit être sous format mol2 ou pdb. Avant son utilisation par Vina, le récepteur est préparé après élimination des molécules d'eaux en définissant les charges partielles de ses atomes par l'intermédiaire du sous-programme AutoTools qui attribue des charges de type "Kollman" calculées avec le champ de forces empirique Amber.

Il est aussi nécessaire de rajouter à ce récepteur les hydrogènes dits polaires c'est-à-dire « essentiels ». Le fichier de la protéine ainsi préparée est converti par Vina au format pdbqt qui correspond aux données des charges. Enfin, on intègre dans ce fichier les paramètres de solvatation des atomes avant de l'enregistrer dans le format pdbqt (format propre à AutoDock).

#### 4.2-Préparation des ligands

Les ligands utilisés dans ce travail sont dessinés avec le logiciel Chem3D, en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome et du type de liaison simple, double ou triple. Une étape d'optimisation de la géométrie devient alors nécessaire. Pour cela, nous avons appliqué la méthode semi-empirique Austin Model 1 (AM1). Les molécules ainsi obtenues sont enregistrées en format pdb. La phase finale de préparation du ligand est réalisée par le sous-programme vina. Ce dernier a pour rôle de contrôler les mouvements du ligand, en définissant les atomes aromatiques, les liaisons flexibles et les angles de torsion. La molécule finale est enregistrée en format pdbqt avant son utilisation par AutoDock 1.5.6.

#### 4.3-Boîte d'AutoDock vina :

Le site actif a été défini manuellement de manière à englober la totalité de l'espace couvert par le ligand de référence dans la structure d'origine (4RPE et 4QWT). Le centre de la boîte et les dimensions englobent largement le site actif de LOX en permettant la libre rotation des ligands étudiés dans cet éventuel site. Pour le docking avec vina, les paramètres par défaut ont été utilisés, (tableau 3-4).

**Tableau 3-4:** Centre et dimension de chaque code

	Ligand naturel	chaines	Centre de la boîte	Dimensions de la boîte
4RPE	8PE	A	X = 16.479 Y = 4.107 Z = 14.575	X = 30 Y = 30 Z = 30
4QWT	ACD	C	X = 6.047 Y = -3.196 Z = 63.275	X = 18 Y = 18 Z = 18

## 5- Etude des interactions du 4RPE

### 5.1-Interactions avec le ligand naturel :

L'analyse d'insertion du ligand naturel dans la lipoxigénase 4RPE montre qu'il pénètre dans le site actif en formant cinq interactions hydrophobiques avec les résidus PHE, LEU, ILE, et HIS (Annexe1).

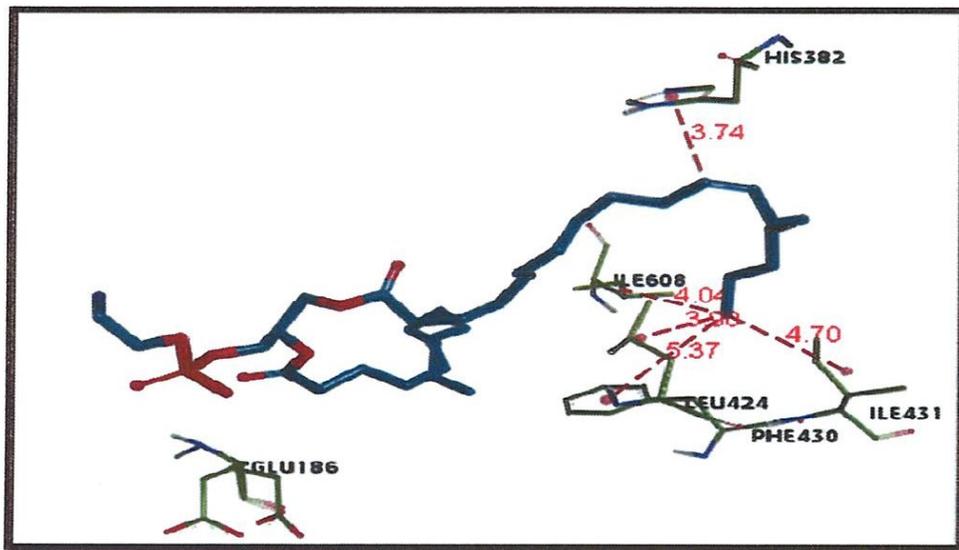


Figure 3-3: Mode d'interaction 4RPE-ligand (acide linoléique)

### 5.2-Interactions avec $\alpha$ -tocophérol

Le docking moléculaire du complexe 4RPE- $\alpha$ -tocophérol a fourni les modes d'interaction illustrés dans la figure 3-4. Le complexe formé est stabilisé par des liaisons hydrophobes établies entre le ligand et les résidus ILE, LEU, PHE, VAL et TRP (Annexe1).

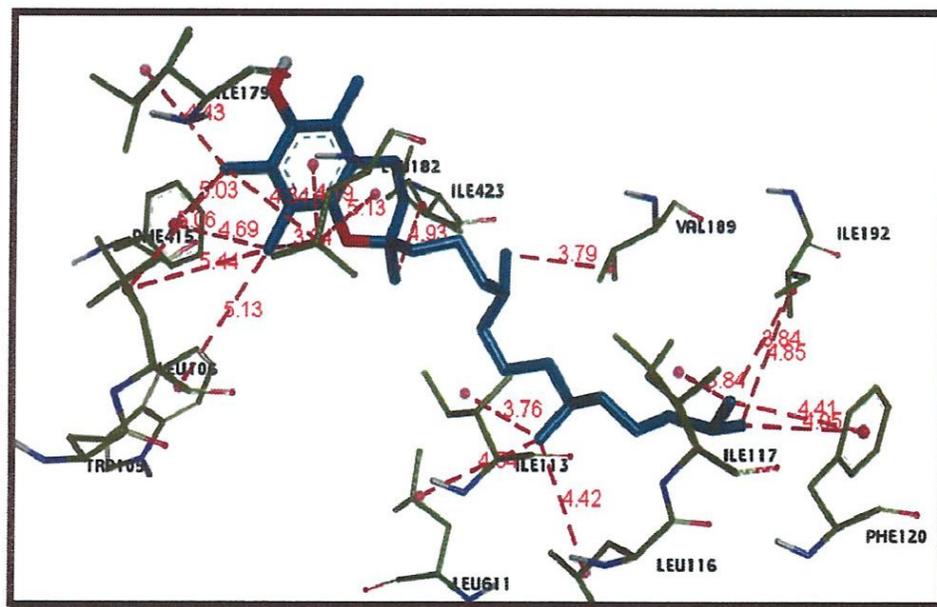


Figure 3-4: Mode d'interaction 4RPE- $\alpha$ -tocophérol



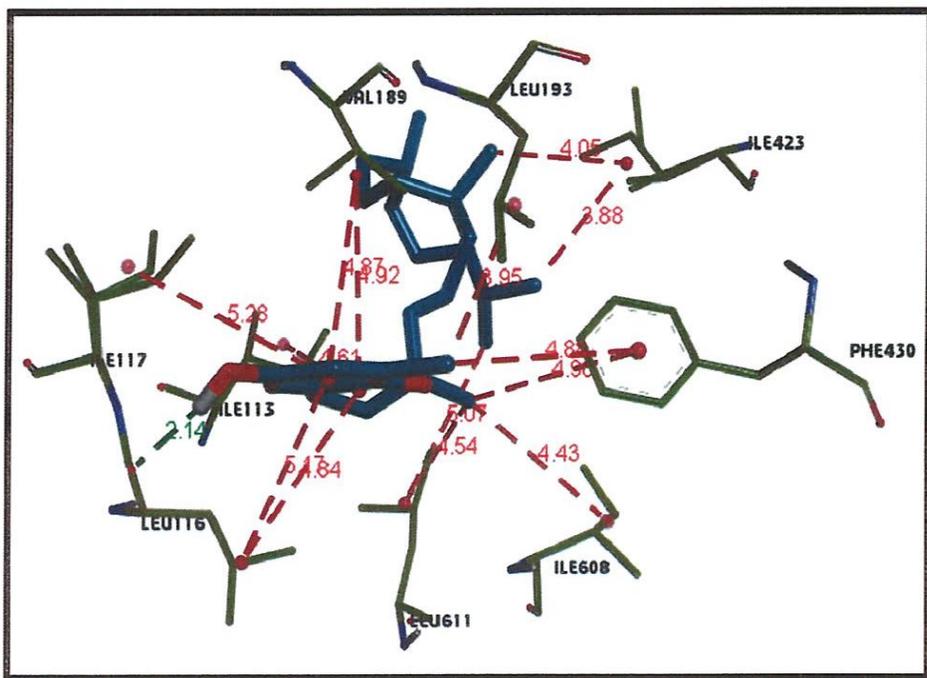


Figure 3-6: Mode d'interaction 4RPE- $\delta$ -tocophérol

### 5.5-Interactions avec $\gamma$ -tocophérol

L'amarrage du complexe 4RPE- $\gamma$ -tocophérol fourni les modes d'interaction est illustré dans la figure 3-7. D'après les résultats, nous remarquons que l'inhibition de 4RPE par les  $\gamma$ -tocophérol est établie par les interactions du type hydrophobiques avec les résidus ILE, LEU, PHE, VAL (Annexe1)..

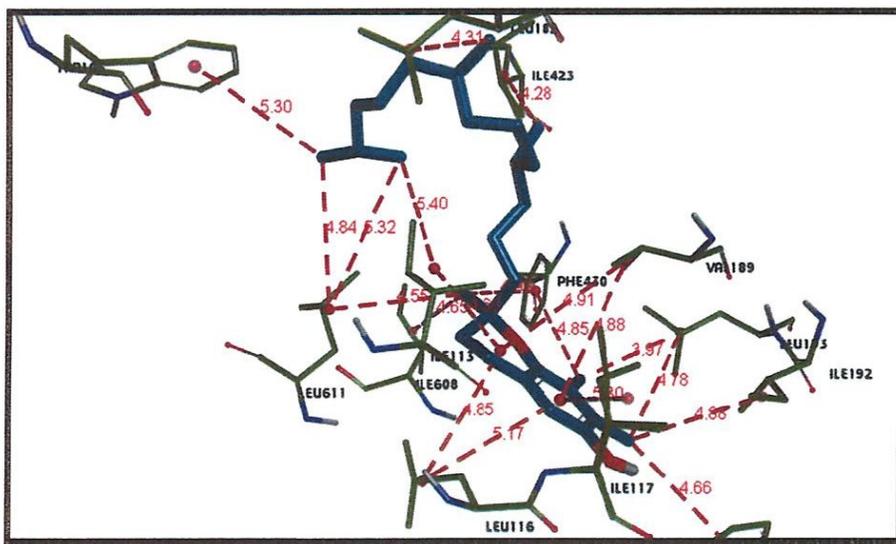


Figure 3-7: Mode d'interaction 4RPE- $\gamma$ -tocophérol

### 5.6-Interactions avec 2-phenyl-4-chromanol

Le 2-phenyl-4-chromanol appartient à la famille des polyphénols. Ce ligand a été étudié comme inhibiteur de 4RPE. D'après l'analyse visuelle du complexe 4RPE-2-phenyl-4-chromanol (figure 3-8 ) on constate l'établissement de plusieurs liaisons hydrophobiques avec les résidus LEU, ILE et VAL.

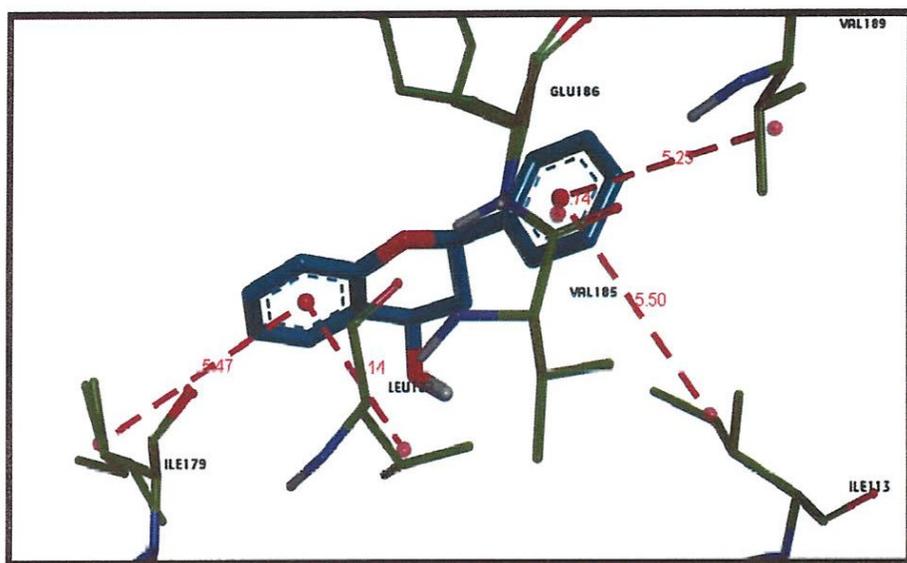


Figure 3-8: Mode d'interaction 4RPE-2-phenyl-4-chromanol

### 5.7-Interactions avec (-)- épigallocatechine gallate

Le complexe 4RPE-(-)- épigallocatechine gallate (figure 3-9) est stabilisé par sept liaisons hydrogènes : deux liaisons formées entre les H des groupements hydroxyles du ligand et O de groupement carbonyle de la fonction acide du LEU séparées par les distances  $d = 2.12 \text{ \AA}$  et  $d = 2.16 \text{ \AA}$  ; la troisième liaison établie entre O de la fonction acide du ligand et le H du résidu ASN102 distante de  $2.25 \text{ \AA}$  . Les autres liaisons hydrogènes sont établies entre O des groupements hydroxyles du ligand et les H des résidus GLN ; GLU ; THR et GLY avec les distances  $2.55$  ;  $2.45$  ;  $1.99$  et  $2.75 \text{ \AA}$  respectivement.

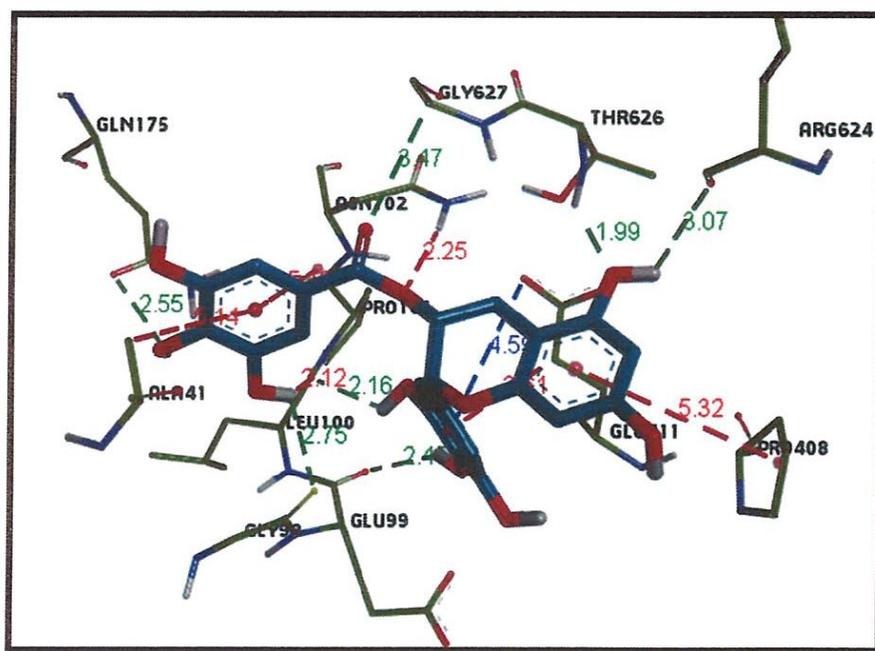


Figure 3-9: Mode d'interactions 4RPE(-)- épigallocatechine gallate

Ce complexe forme une liaison électrostatique entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU et le cycle carbonyle d'inhibiteur et des interactions hydrophobiques avec les résidus PRO et ALA.

### 5.8-Interactions avec Hydrohytyrosol

L'analyse visuelle du complexe 4RPE –hydrohytyrosol (figure 3-10) nous montre trois liaisons hydrogènes deux liaisons formées entre le O du carbonyle de la fonction acide du GLN et LEU et le même H de groupement hydroxyle de ligand avec les distances  $d=2.08\text{\AA}$  et  $d=2.77\text{\AA}$  et la dernière liaison entre le O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLu99  $d=2.69\text{\AA}$  et le ligand.

Ce complexe est stabilisé par une liaison électrostatique entre le O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU et le cycle carbonyle de ligand.

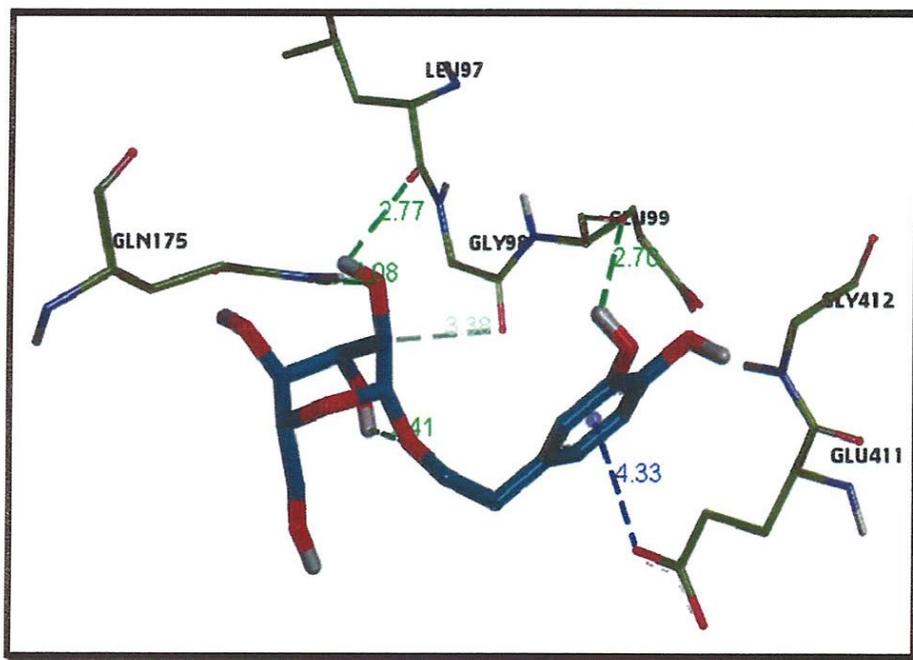


Figure 3-10: Mode d'interaction 4RPE-Hydroxytyrosol

### 5.9-Interactions avec Acétate d' $\alpha$ -tocophéryl

L'analyse visuelle du complexe 4RPE-Acétate d' $\alpha$ -tocophéryl (figure 3-11) nous montre plusieurs interactions hydrophobiques avec les résidus LEU, ILE, VAL, TRP et PHE (Annexe1).

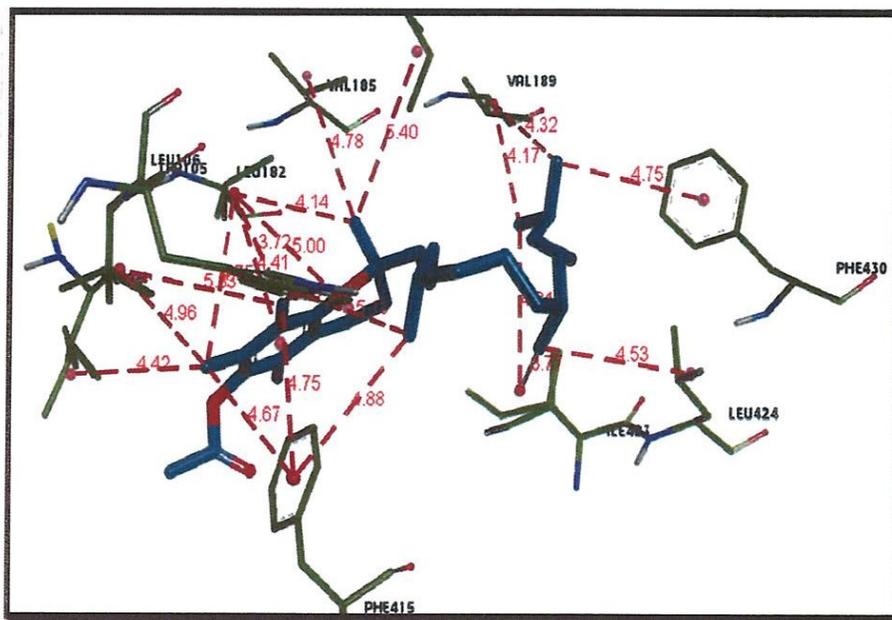


Figure 3-11: Mode d'interaction 4RPE-Acétate d' $\alpha$ -tocophéryl

## 6-Etude des interactions du 4QWT

### 6.1-Interactions avec son Ligand naturel

Le complexe 4QWT-ligand est stabilisé par deux liaisons hydrogènes formées entre la fonction amine du résidu GLN380 et l'oxygène de ligand «GLN380 :H...O-ligand » et «SER441 :H...O-ligand » séparée par les distances 2.34Å et 2.93Å, une liaison électrostatique avec TYR581 a été observée. Ce complexe forme aussi trois liaisons hydrophobiques avec les résidus ILE et LEU (figure 3-12).

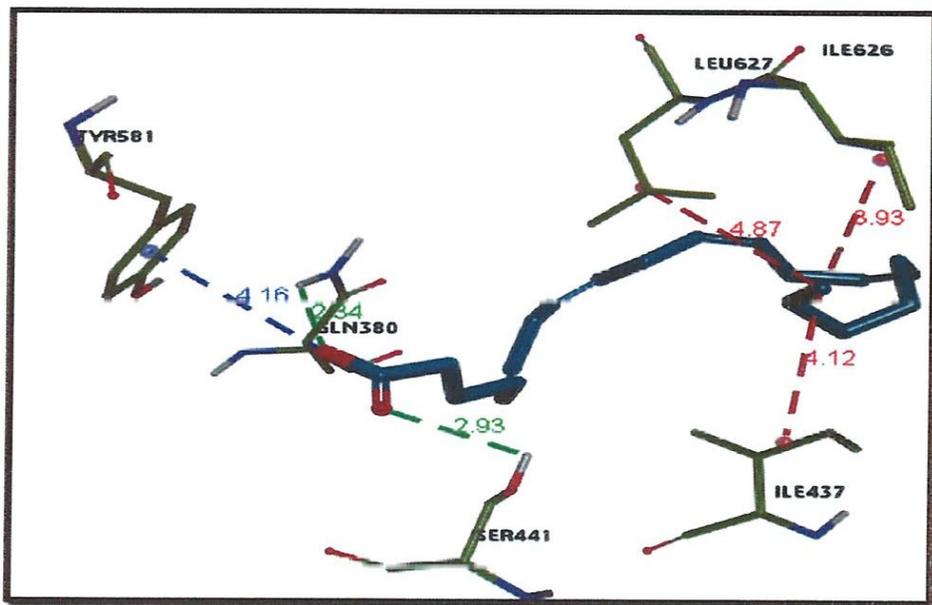


Figure 3-12: Mode d'interaction 4QWT-Ligand (acide arachidonique)

### 6.2-Interactions avec $\alpha$ -tocophérol:

L'analyse visuelle du complexe 4QWT- $\alpha$ -tocophérol est stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus : LEU, HIS, ALA, LYS, ARG, ILE et TYR. Le ligand est stabilisé aussi par une liaison hydrogène entre la fonction amine du résidu ARG182 et l'oxygène de ligand «ARG182 :H...O-ligand » par la distance 2.79Å et une interaction de type électrostatique avec le résidu ARG182 (figure 3-12). (Annex02)

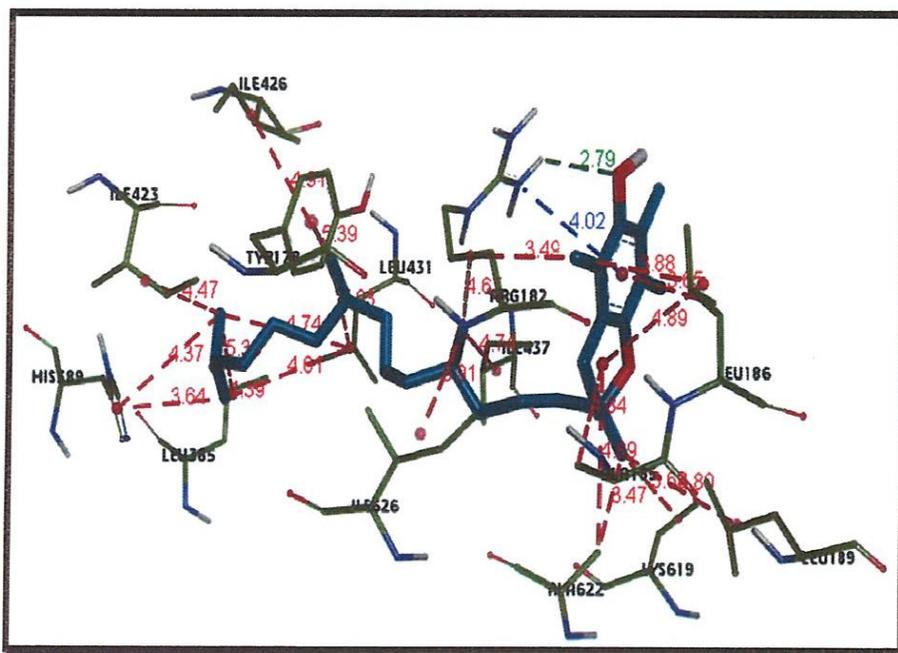


Figure 3-13: Mode d'interaction 4QWT- $\alpha$ -tocophérol

### 6.3-Interactions avec $\beta$ -tocophérol:

L'analyse visuelle du complexe 4QWT-  $\beta$ -tocophérol est stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus LEU, HIS, ILE, TYR et LYS (figure 3-14). (Annexe2)

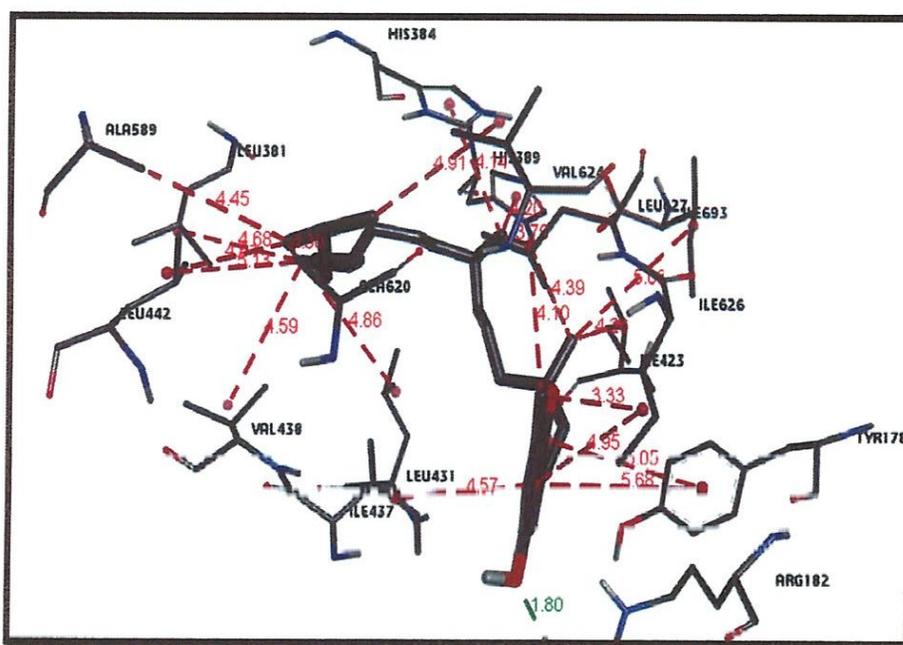


Figure 3-14: Mode d'interaction 4QWT- $\beta$ -tocophérol





### 6.7-Interactions avec (-)-épigallocatechine gallate :

les modes d'interaction qui régissent la formation du complexe 4QWT – (-)-épigallocatechine gallate (figure 3-18) présente trois liaisons hydrogènes : deux liaisons établies entre les H des groupements hydroxydes du ligand et les O de groupement carbonyle de la fonction acide du ILE423 et ASP 424 avec les distances ( $d = 2.35\text{\AA}$  et  $1.83\text{\AA}$ ) et la dernière liaison hydrogène entre le H de la fonction amine du résidu ARG428 et l'oxygène de ligand séparée par une distance de  $2.88\text{\AA}$  et les liaisons hydrophobes avec les résidus ILE, LEU, GLY et HIS. Ce complexe forme aussi une liaison électrostatique avec le résidu ILE (Annexe 2).

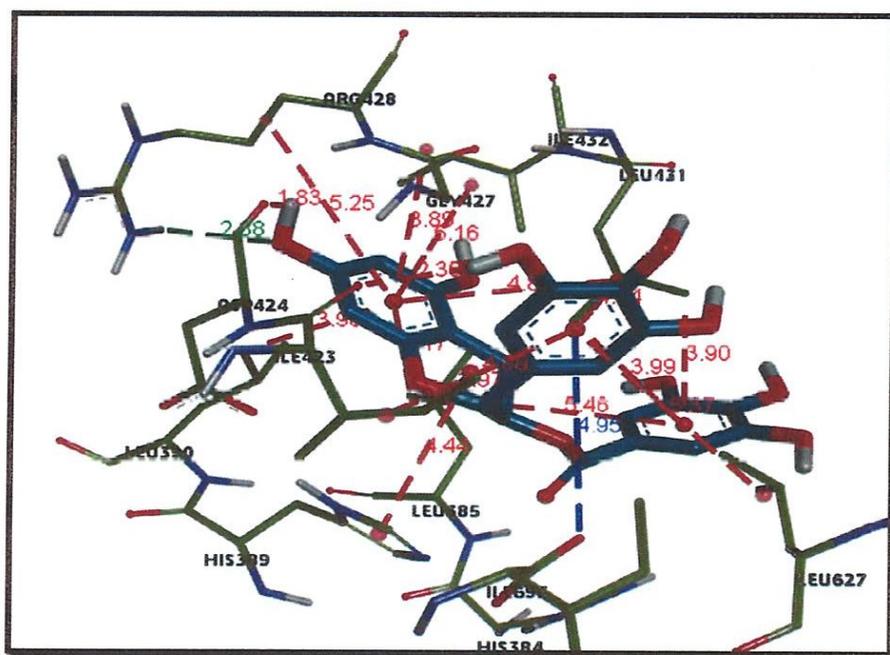


Figure 3-18: Mode d'interaction 4QWT-(-)-épigallocatechine gallate

### 6.8-Interactions avec Hydrohytyrosol :

L'analyse visuelle montre que le complexe formé entre 4QWT -Hydrohytyrosol est stabilisé par des interactions hydrophobiques avec les résidus LEU et par une liaison hydrogène entre H de groupement hydroxyle du ligand et O de groupement carbonyle de la fonction acide de GLN«GLN380 :O..H-ligand »  $d = 2.89\text{\AA}$  ce composé formé aussi une liaison électrostatiques avec IIS (figure 3-19).

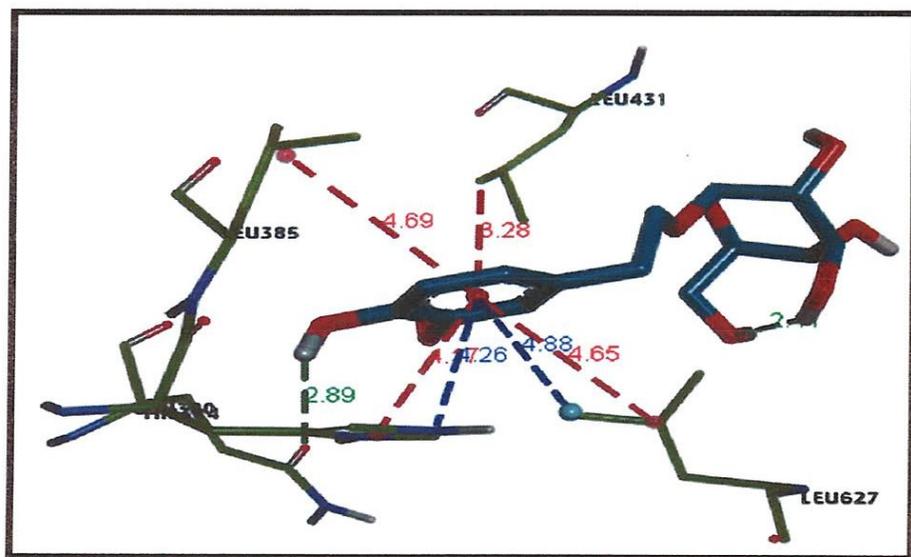


Figure 3-19: Mode d'interaction 4QWT-Hydroxytyrosol

### 6.9-Interactions avec Acétate d' $\alpha$ -tocophérol :

Le complexe 4QWT -Acétate d'  $\alpha$ -tocophérol est stabilisé par deux liaisons hydrogènes entre les fonctions amine du résidu ARG, GLN et l'oxygène de ligand séparée par des distances de 2.58Å et 2.59Å (figure 3-20). Ce complexe forme aussi les liaisons hydrophobiques avec les résidus ILE, LEU et HIS (Annexe 2).

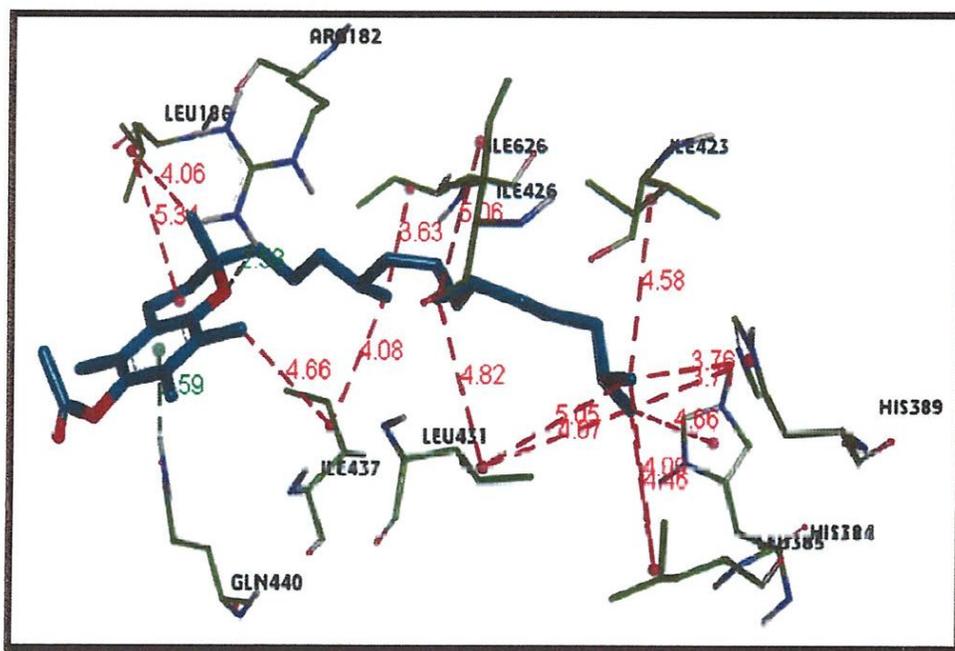


Figure 3-20: Mode d'interaction 4QWT-Acétate d'  $\alpha$ -tocophéryl

D'après l'analyse réalisée sur les complexes protéine-ligand, on constate que la stabilité de ces complexes est assurée par plusieurs types d'interactions en l'occurrence celles hydrophobiques établies entre les résidus hydrophobes ( LEU, ILE,...) qui constituent la cavité de la protéine.

### 7-Affinités des ligands

Cette procédure est basée sur l'amarrage de l'acide linoléique et tous les inhibiteurs pour pouvoir les classés par ordre d'affinité décroissante. Les résultats de docking sont présentés dans le tableau ci-dessous

**Tableau 3-5** : Classement des résultats de docking avec 4RPE

Classement	Structure	Affinité	Nombre de liaisons H	Nombre de liaisons électrostatiques	Nombre de liaisons hydrophobiques
1	$\gamma$ -tocophérol	-11.6	0	0	20
2	$\alpha$ -tocophérol	-11.1	0	0	20
3	(-)- épigallocatechine gallate	-10.	7	1	3
4	$\beta$ -tocophérol	-10.4	1	0	14
5	$\delta$ -tocophérol	-10.2	1	0	20
6	Acétate d' $\alpha$ - tocophérol	-9.9	0	0	21
7	2-phenyl-4- chromanol	-9.8	0	0	5
<b>8</b>	<b>Ligand naturel</b>	<b>-8.9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>
9	Hydrohytyrosol	-7.9	3	1	0

Les résultats du docking montrent que les tocophérols et polyphénols ont des affinités supérieures à celle de l'acide linoléique à l'exception de Hydrohytyrosol. Ces composés présentent une meilleure activité inhibitrice. Le  $\gamma$ -tocophérol forme le complexe protéine-ligand le plus stable. Il présente donc un meilleur effet inhibiteur. Hydrohytyrosol présente la plus basse affinité envers LOX parmi la série des inhibiteurs étudiés et par conséquent, il forme le complexe le moins stable.

Cette stabilité peut être due au nombre d'interactions hydrophobiques établies entre l'inhibiteur et la protéine. En effet, le complexe le plus stable présente un nombre important de liaisons hydrophobes et le moins stable ne présente aucune interaction de ce type. A l'exception de l'acétate d'  $\alpha$ -tocophérol.

Le complexe du (-)-épigallocatechine gallate présente une affinité remarquable qui peut être expliquée par l'établissement de plusieurs liaisons hydrogènes malgré un faible nombre de liaisons hydrophobes qui a été observées

**Tableau 3-6:** Classement des résultats de docking avec 4QWT

Classement	Structure	Affinité	Nombre de liaisons H	Nombre de liaisons électrostatiques	Nombre de liaisons hydrophobiques
<b>1</b>	<b>Ligand naturel</b>	<b>-8.5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>3</b>
2	$\alpha$ -tocophérol	-7.9	1	1	22
3	(-)-épigallocatechine gallate	-7.6	3	1	14
4	2-phenyl-4-chromanol	-7.5	1	0	7
5	$\delta$ -tocophérol	-7.4	2	0	20
6	Acétate d' $\alpha$ -tocophérol	-6.9	2	0	15
7	$\gamma$ -tocophérol	-6.3	1	0	22
8	$\beta$ -tocophérol	-5.6	1	0	23
9	Hydrohytyrosol	-1.3	1	2	4

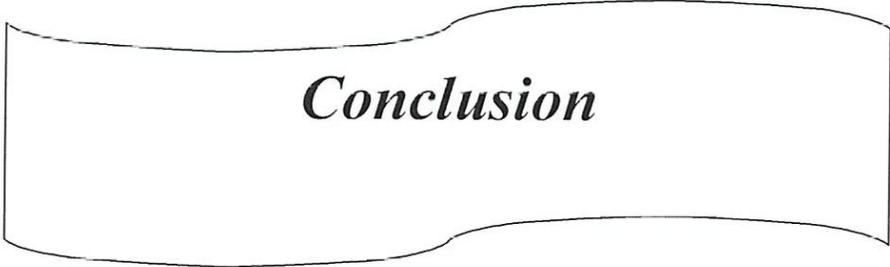
Les résultats de docking montrent que tous les tocophérols et polyphénols testés présentent une affinité inférieure à celle du ligand naturel qui est l'acide arachidonique. Donc, cette série de composés présentent une faible activité inhibitrice.

Le complexe le plus stable est obtenu avec le  $\alpha$ -tocophérol et le moins stable avec le Hydrohytyrosol, pour ces deux complexes la stabilité peut être expliquée par le nombre de liaisons hydrophobiques établies entre la protéine et l'inhibiteur.

Malgré que le  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ - tocophérols présentent un nombre important d'interactions hydrophobiques supérieur ou égale à celui établie avec le  $\alpha$ -tocophérol. La stabilité de ce

dernier est renforcée par deux liaisons H et une liaison de type électrostatique. Tandis que, les autres tocophérols  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  ne présentent aucune liaison électrostatique.

Le complexe du (-)-épigallocatechine gallate est stabilisé par des liaisons hydrophobiques et des liaisons H.



*Conclusion*

# Conclusion

---

L'objectif de notre travail est de nous initier aux outils de la simulation informatique et en particulier en Docking moléculaire par **AutoDock Vina** afin d'étudier les interactions mise en jeu entre les LOXs (4RPE et 4QWT) et leurs inhibiteurs.

Pour atteindre ce but, nous avons réalisé plusieurs étapes:

**1- La première :** a permis de tester la fiabilité du programme **AutoDock Vina** par l'application d'un calcul des valeurs du RMSD de 100 complexes protéines-ligands téléchargés aléatoirement de la PDB. Les résultats ont montré que 90 complexes ont des valeurs RMSD inférieures à 2Å contre 10.

**2- La deuxième :** une analyse visuelle des composés issus de la simulation a montré plusieurs types d'interactions en l'occurrence celles hydrophobiques.

Les principales forces mises en jeu responsables de la stabilité de ces complexes sont : les forces hydrophobiques, les liaisons H et enfin les interactions électrostatiques classées par ordre décroissant.

Les résultats montrent que pour 4RPE inhibée par différents types de tocophérols et polyphénols ont des affinités supérieures à celle de l'acide linoléique à l'exception de Hydroxytyrosol. Le  $\gamma$ -tocophérol forme le complexe protéine-ligand le plus stable.

Cette stabilité peut être due au nombre d'interactions hydrophobiques établies entre l'inhibiteur et la protéine. Ces composés présentent une meilleure activité inhibitrice.

Pour la deuxième enzyme 4QWT, les résultats obtenus montrent que tous les tocophérols et polyphénols testés présentent une affinité inférieure à celle l'acide arachidonique.

# Annexe

## Annexe1 : Intéraction avec 4RPE

	Hydrogène	Electrostatique	Hydrophobe
Ligand naturel			8PE702:C3I-HIS382 8PE702 C3I-LEU424 8PE702 C3I-ILE431 8PE702 C3I-ILE608 PHE430-8PE702 C3I
$\alpha$ - tocopherol			LEU182-UNN0 ligand-ILE423 ligand-LEU106 ligand-LEU182 ligand-LEU106 ligand-ILE179 ligand-VAL189 ligand-ILE113 ligand-LEU116 ligand-LEU61-1 ligand-ILE192 ligand-ILE117 ligand-ILE192 ligand-LEU182 TRP105- ligand PHE120- ligand PHE120- ligand PHE145- ligand PHE145- ligand ligand-LEU182
$\beta$ -tocopherol	ligand-ILE179 :O 2.82 ligand-ILE179:O:B 2.74		ligand-LEU128 ligand-ILE423 ligand-VAL189 ligand-LEU116 ligand-ILE608 ligand-LEU611 ligand-ILE117 ligand-ILE192 ligand-VAL189 ligand-LEU193 TPR105-ligand PHE415-ligand ligand-LEU182 LEU182-ligand
$\delta$ -tocopherol	ligand-LEU116:O		ILE113- ligand ILE116- ligand VAL189- ligand ligand-LEU193 ligand-ILE608 ligand-LEU611 ligand-ILE423

# Annexe

			ligand-LEU611 ligand-ILE423 PHE430-ligand PHE430-ligand Ligand-LEU116 ligand-ILE117 ligand-VAL189
$\gamma$ -tocopherol			ILE113-ligand LEU116-ligand VAL189-ligand ligand-ILE192 ligand-LEU193 ligand-LEU193 ligand-ILE608 ligand-LEU611 ligand-ILE423 ligand-LEU182 ligand-LEU611 ligand-ILE113 ligand-LEU116 TPR105-ligand PHE120-ligand PHE430-ligand PHE430-ligand ligand-LEU116 ligand-ILE117 ligand-VAL189
2-phenyl-4-chromanol			VAL185:C,OGLU186:N-ligand ligand-ILE179 ligand-LEU182 ligand-ILE113 ligand-VAL189
(-) – épigallocatechine gallate	ASN102:HD22-ligand THR626:HN-ligand Ligand-GLY98: O Ligand-LEU100: O ligand-GLN175:OE1 Ligand-LEU100: O Ligand-GLU99: O Ligand-ARG624: O GLY627:CA-ligand	GLU411:OE2-ligand	GLU411:OE2-ligand ligand-PRO408 ligand-ALA41 PRO101:C,O;ASN102:N-ligand
hydroxytyrosol	GLN175:IEE21-ligand Ligand-GLU99: O Ligand-LEU97: O Ligand-UNN0: O Ligand-GLY98: O	GLU411:OE2-ligand	

# Annexe

Acétate d' $\alpha$ - tocophéryl			LEU182-ligand ligand-ILE113 ligand-LEU182 ligand-VAL185 ligand-LEU106 ligand-LEU182 ligand-LEU106 ligand-ILE179 ligand-LEU182 ligand-ILE423 ligand-LEU424 ligand-VAL189 ligand-VAL189 ligand-ILE423 TRP105-ligand TRP105-ligand PHE415-ligand PHE415-ligand PHE415-ligand PHE430-ligand ligand-LEU182
-------------------------------------	--	--	---

# Annexe

## Annexe 2 : Interaction avec 4QWT

	Hydrogène	Electrostatique	Hydrophobe
Ligand naturel	GLN380:H22- ACD715:O2 SER441:H-ACD715:O	ACD715:O2 – TYR581	ACD715:C22-ILE437 ACD715:C22-ILE626 ACD715:C22-LEU627
$\alpha$ -tocopherol	ARG182:HH21-ligand	ARG182 :NH2- ligand	LEU186 :C-ligand ligand-HIS389 ALA185-ligand LEU186-ligand ALA626-ligand ALA626-ligand ligand-LEU189 ligand-LYS619 ligand-ARG182 ligand-LEU186 ligand-ARG182 ligand-ILE437 ligand-ILE426 ligand-ILE426 ligand-LEU431 ligand-LEU385 ligand-ILE423 ligand-LEU431 ligand-LEU385 ligand-LEU431 TYR178- ligand HIS389- ligand
hydrohytyrosol	Ligand-GLN380:O	HIS384-ligand FE2701-ligand	LEU431:C2-ligand HIS384-ligand ligand-LEU385 ligand-LEU627
$\delta$ -tocopherol	ARG182 :NH-ligand TYR178:OH-ligand		TYR178-UNN0 ALA620-Ligand ALA589-ligand ligand-ILE626 ligand-LEU627 ligand-ILE423 ligand-LEU627 ligand-ILE693 ligand-LEU627 ligad-LEU381 ligand-LEU431 ligand-VAL438 ligand-LEU442 ligand-LEU442 ligand-VAL624 TYR178-ligand HIS384-ligand

# Annexe

			HIS389-ligand ligand-ILE437 ligand-ILE626
β-tocopherol	GLY427 :C-ligand		LEU431 :C2-ligand HIS389- ligand ILE423- ligand LEU431- ligand LEU627-ligand ligand-LEU627 ligand-LEU385 ligand-LEU431 ligand-ILE423 ligand-ILE426 ligand-ILE437 ligand-ILE626 ligand-LEU627 ligand-ILE437 ligand-ILE437 ligand-LYS619 ligand-ILE473 ligand-LYS619 TYR178- ligand HIS384- ligand HIS389- ligand ligand-LEU385 ligand-ILE423
2-phenyl-4-chromanol	ligand-GLN577 :O		GLN380 :C- ligand LEU431 :C1- ligand TYR581- ligand ligand-ALA589 ligand-ALA620 ligand-LEU385 ligand-VAL438
(-)- épiegalloctéchi ne gallate	ARG428:HH12- UNN0: O Ligand: H-ILE423: O Ligand: H-ASP424: O	ILE693:O- ligand	LEU385:C1-ligand LEU390 :C2- ligand LEU431 :C1- ligand LEU431 :C2- ligand GLY385- ligand HIS389- ligand ligand-ARG428 ligand-LEU431 ligand-ILE432 ligand-LEU385 ligand-ILE423 ligand-LEU431 ligand LEU627 GLY427 :C ,O :ARG428 :N- Ligand
γ-Tocopherol	ARG182:HH21-ligand		TYR178-ligand Ligand-ILE437

# Annexe

			Ligand-ILE626 ligand-ILE626 ligand-ILE627 ligand-ILE423 ligand-LEU627 ligand-ILE693 ligand-LEU627 ligand-LEU381 Ligand-LEU385 ligand-LEU431 ligand-VAL438 ligand-LEU442 ligand-LEU442 ligand-VAL624 Ligand-LEU627 TYR178-ligand HIS384- ligand HIS389- ligand ligand-ILE437 ligand-ILE626
Acétate d' $\alpha$ - tocophéryl	ARG182:HH21-ligand GLN440:H22-ligand		ligand-HIS389 ligand-HIS389 LEU186-ligand ligand-LEU186 ligand-ILE437 ligand-ILE437 ligand-ILE626 ligand-ILE426 ligand-LEU431 ligand-LEU385 ligand-ILE423 ligand-LEU431 ligand-LEU385 ligand-LEU431 HIS384- ligand



*Résumé*

# Résumé

---

Dans notre travail, nous nous sommes focalisé sur l'inhibition de la lipoxycgénase. Le programme d'AutoDock Vina a été utilisé pour docker les tocophérols et polyphénols comme inhibiteurs de LOXs.

Le Docking de 4RPE montre que les tocophérols et polyphénols ont des affinités supérieures à celle de l'acide linoléique, ces composés présentent une meilleure activité inhibitrice.

Tandis que leurs affinités est inférieure à celle du ligand naturel de 4QWT qui est l'acide arachidonique.

**Mot clés:** Lipoxycgénase, AutoDock Vina, Docking Moléculaire, Inhibiteurs.

---