

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
Université 8 mai 1945 Guelma

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

Mémoire de fin d'études
Master



Spécialité : Chimie Physique

Présenté par : MEDDOUR Moufida
ROUAISSIA Hamida

Etude par Docking Moléculaire de l'activité inhibitrice
des Furanocoumarines Contenues dans le Jus de
Pamplemousse sur les Cytochromes CYP3A4

Sous la Direction de :
Dr. DJEMIL Rayenne
Dr. LACHI Nadia

2020

Remerciement

Nous tenons à remercier DIEU le tout puissant qui nous a donné la force et le courage pour pouvoir réaliser ce modeste travail, ainsi que toutes les personnes qui nous ont aidées avec leur savoir faire et leur encouragement durant cette période.

Ce travail est effectué au sein du laboratoire de chimie computationnelle et nanostructure (LCCN);

Université 8 mai Guelma.

Je remercie sincèrement, mon encadreur, Mme DJEMIL Rayenne.

J'exprime mes sincères gratitude à Mme LACHI Nadia et BENCHAIKH BOUCHRA, pour son aide à se familiariser avec le logiciel Auto dock Vina.

J'ai le plaisir d'exprimer ma profonde gratitude à CHERJET Mouna pour son aide.

Je tiens à remercier tout les enseignants du département des sciences de la matière..

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail à ...

Mes parents LAYACHI ET AKILA,

Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et les précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie.

A mon cher frère: BACHIR ;

Mon affection pour vous est sans limite, votre soutien a sans doute été important pour le bon déroulement de mes études.

A mes très chères sœurs: Amina, Amel, Sameh et Zahra ;

Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

À MES CHÈRES PETITS NEVEUX ET NIECES ;

Ahmed, Nihel, Maram, Anes, Islem, Younes, Youssef

Housseem, Walide, Yassin, Wissem, Nourhan.

A toutes les personnes ayant participé à ce travail, se serait-ce que par un petit mot d'encouragement ou même un petit sourire.

Rouaïssia Hamida



Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers,

Je cite :

Les parents les plus chers au monde, Mostpha et Houria, qui dieu les garde et les protège.

A mes frères Mohammed, Housseyn et Faride

A mes sœurs Sabrina, Ahlame.

A mes neveux et mes nièces.

A mon époux Soufien, et ses parents,

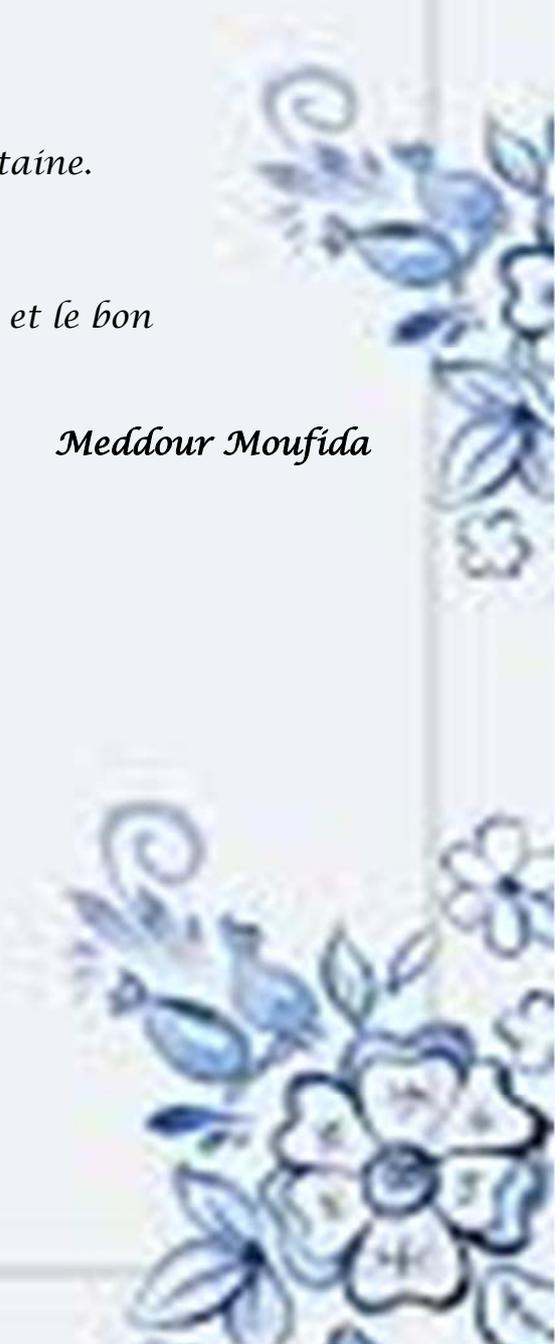
A mon beau-frère, et mes belles-sœurs.

A ma chère famille, Petit et grand, proche et lointaine.

A tous mes enseignants.

A tous ceux qui m'ont assisté, dans la Réalisation et le bon déroulement de ce travail.

Meddour Moufida



Sommaire

| | |
|--|----|
| Liste des Figure | |
| Liste des Tableaux | |
| Liste des Abréviations | |
| Introduction générale | 1 |
| Chapitre 1 : Docking Moléculaire | |
| 1-Introduction | 3 |
| 2-Définition du Docking moléculaire..... | 3 |
| 3-Principe général de Docking | 3 |
| 4-Algorithmes de docking | 4 |
| 4.1-Recherche systématique | 5 |
| 4.2-Recherche stochastique (génétique)..... | 5 |
| 4.3-Approches de Simulation..... | 6 |
| 5-Fonctions de score | 6 |
| 5.1- Fonctions de score basées sur les champs de force | 7 |
| 5.2- Fonctions de score empiriques | 8 |
| 5.3- Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based » | 8 |
| 5.4- Fonctions de score consensus..... | 8 |
| 6-Les outils de Docking | 9 |
| 6.1-Préparation des récepteurs..... | 9 |
| 6.2-Préparation des ligands..... | 9 |
| 6.3-Les logiciels..... | 9 |
| 7- Les interactions protéine-ligand..... | 10 |
| 7.1- Les forces de Van Der Waals | 10 |
| 7.2- Liaison hydrogène..... | 11 |
| 7.3- Les interactions hydrophobes..... | 12 |
| 7.4- Interactions électrostatiques..... | 12 |
| Références | 13 |
| Chapitre 2 : les Cytochromes P450 | |
| 1- Présentation des cytochromes P450..... | 16 |
| 1.1- Définition et structure générale..... | 16 |

Sommaire

| | |
|---|----|
| 1.2- Classification..... | 18 |
| 1.3-La famille CYP3..... | 19 |
| 1.4-CYP3A4..... | 19 |
| 2-Inhibition enzymatique | 19 |
| 2.1-Inhibition réversible | 20 |
| a) Inhibiteur compétitif | 20 |
| b) Inhibiteur incompétitif | 20 |
| c) Inhibiteur non compétitif | 21 |
| 2.2- Inhibition irréversible..... | 21 |
| 2.3-Effet inhibiteur enzymatique | 22 |
| 3-Inhibition du CYP P450 | 22 |
| 4- Les Substances responsables de l'effet inhibiteur enzymatique du jus de pamplemousse.. | 23 |
| 4.1- Les flavonoïdes | 23 |
| a) Naringine..... | 23 |
| b) Naringénine..... | 24 |
| c) L'hespéridine..... | 24 |
| 4.2- Les furanocoumarines | 25 |
| a) La bergamottine..... | 25 |
| b) Le 6', 7'-dihydroxybergamottine (DHB)..... | 25 |
| 5-Interactions jus de pamplemousse et médicaments | 26 |
| 6-Action Jus de Pamplemousse sur le cytochrome P450 | 26 |
| Références..... | 27 |

Chapitre 3 : Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| 1- Introduction | 29 |
| 2- Les outils de Docking | 29 |
| 2.1- Les inhibiteurs..... | 29 |
| 2.2- Récepteur | 30 |
| 2.3- Calcul des grilles de potentiel..... | 31 |
| 3- Résultats et discussion | 32 |
| 3.1-Le RMSD | 32 |

Sommaire

| | |
|--|----|
| 3.2-Docking du cytochrome P450 3A4 | 33 |
| Références | 36 |
| Conclusion | 37 |
| Annexe 01 | |

Liste des Figures

| N° | Intitulé des Figures | page |
|---|--|------|
| Chapitre I : Docking Moléculaire | | |
| Figure 01 | Construction incrémentale. | 05 |
| Figure 02 | Les interactions de Van Der Waals. | 11 |
| Figure 03 | Exemples d'une liaison hydrogène. | 12 |
| Chapitre II : Les cytochromes P450 | | |
| Figure 01 | Structure générale d'un cytochrome p450 | 17 |
| Figure 02 | Protoporphyrine IX de fer constituant l'hème des cytochromes P450. | 18 |
| Figure 03 | Nomenclature des cytochromes P450 : exemple du CYP3A4. | 18 |
| Figure 04 | Inhibition compétitive. | 20 |
| Figure 05 | Inhibition incompétitive. | 21 |
| Figure 06 | structure de la naringine. | 24 |
| Figure 07 | Formule chimique de la naringenine. | 24 |
| Figure 08 | Formule chimique de l'hespéridine. | 24 |
| Figure 09 | formule de chimique de la bergamotine. | 25 |
| Figure 10 | Formule chimique du 6',7'-dihydroxybergamotine (DHB) | 25 |
| Chapitre III : Résultats et discussion | | |
| Figure 01 | La structure de 2V0M. | 31 |

Liste des Figures

| | | |
|-----------|--|----|
| Figure 02 | Superposition du ligand naturel et ligand docké. | 33 |
| Figure 03 | Structures des furanocoumarines. | 33 |

Liste des Tableaux

| N° | Intitulé des Tableaux | page |
|---|--|------|
| Chapitre III : Résultats et discussion | | |
| Tableau 01 | Les propriétés électroniques des inhibiteurs. | 30 |
| Tableau 02 | La boite GRID BOX. | 32 |
| Tableau 03 | RMSD du quelques complexe protéine-ligand. | 33 |
| Tableau 04 | Résultats de docking moléculaire des dérivés de furanocoumarine. | 34 |
| Tableau 05 | Inhibition du CYP3A4 par les dérivés du furanocoumarines. | 34 |

Liste des abréviations

| | |
|----------|---|
| AMBER | Assisted Molecular Buildnig and Energy Refinement |
| ATP | Adénosine-tri-phosphate |
| CHARMM | Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics |
| CYP P450 | cytochromes P450 |
| E | Enzyme |
| GAP | HOMO-LUMO |
| GROMOS | GRONingenMOlecular Simulation System |
| HEM | Protoporphyrine IX |
| I | Inhibiteur |
| IC50 | concentration inhibitrice médiane |
| MVD | Molegro Virtuel Docker |
| OPLS | Optimized Potentials for Liquids Simulation |
| P | Produits |
| PDB | Protéine Data Bank |
| PMF | Potential of Mean Force |
| RMSD | RootMean Square Deviation |
| S | Substrat |
| 3D | Tridimensionnelle |

Résumé

Dans ce travail, nous avons étudié par Docking moléculaire l'activité inhibitrice des dérivés de la furanocoumarine du jus de pamplemousse, présumé responsables de l'interaction avec l'enzyme CYP3A4 (2V0M) afin de prédire l'action de ces composants de jus de pamplemousse sur ce CYP et de connaître le groupement fonctionnel responsable de l'inhibition.

Les résultats obtenus révèlent que les furanocoumarines (**composé 1** et **composé 2**) présentent une importante affinité vis-à-vis au CYP3A4 (2V0M). Par conséquent, leurs dérivés, les acétates (**composé 17** et **composé 18**) présentent la meilleure affinité par rapport aux autres constituants de jus de pamplemousse étudiés. Un groupement 5-géranyloxyfuranocoumarine s'est avéré essentiel pour l'inhibition de ce cytochrome.

Mots clés : Docking moléculaire, CYP3A4, Inhibition, Furanocoumarines, Jus de pamplemousse.

Introduction générale

Récemment, les chercheurs ont évoqué la diminution de l'effet de médicaments utilisés en cardiologie, cancérologie, transplantation, infectiologie, en cas de prise de jus de certains fruits comme l'orange, le pamplemousse ou la pomme. Le jus de pamplemousse est connu pour interagir fortement avec quelques médicaments.

Il a été montré que les composés contenus dans le jus de pamplemousse ont affecté le métabolisme des médicaments chez l'homme par inhibition du cytochrome P450 (CYP 3A4).

Ce cytochrome est une superfamille d'enzymes responsables du métabolisme des médicaments, de la carcinogenèse et de la dégradation des xénobiotiques ainsi que de la biosynthèse des stéroïdes, des lipides et d'autres métabolites secondaires. Ces enzymes détachent l'organisme de divers xénobiotiques et activent certains pro médicaments par oxydation.

L'élucidation du mécanisme de l'inhibition du CYP3A4 est un sujet important en termes de pharmacocinétique et de biodisponibilité des médicaments. L'inhibition du CYP est un processus complexe qui intéresse beaucoup l'industrie pharmaceutique car l'inhibition enzymatique est à l'origine des interactions médicamenteuses. Il peut correspondre à une inhibition compétitive dans le site actif, une modification du substrat entre le site actif et l'extérieur de l'enzyme ou une inhibition par un médicament lui-même ou par ses métabolites conduisant alors à des interactions médicamenteuses indésirables

Etant donné que, le jus de pamplemousse est reconnu par les autorités de santé de différents pays comme contenant des molécules inhibitrices du cytochrome P450 (CYP3A4), ce travail a pour but d'identifier les constituants de jus de pamplemousse responsable de l'inhibition des CYPs afin de prédire son action sur les CYPs

Après avoir été présumé dû aux flavonoïdes contenus dans le fruit, cet effet inhibiteur a pu être attribué aux furanocoumarines, nous avons choisi l'étude de certains composants du jus de pamplemousse (furanocoumarines) afin de connaître le groupement fonctionnel responsable de l'inhibition de CYP3A4.

Dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à déterminer les modes d'interaction des complexes enzymes-ligands utilisant la technique de modélisation moléculaire, regroupées sous le nom « Docking moléculaire » pour la prédiction des modes d'interactions possibles entre le CYP comme récepteur avec les constituants inhibiteurs de jus de pamplemousse.

Introduction générale

Nous présenterons ce travail en trois chapitres :

Le premier chapitre : est consacré à la description du docking moléculaire et les différents concepts théoriques sur lesquels se base.

Le second chapitre : comprend une présentation générale des cytochromes CYP450.

Le dernier chapitre : renferme les principaux résultats obtenus au cours de ce travail en comparaison avec l'expérimental. Ainsi que les perspectives représentées par la continuation du travail qui n'a pas pu être achevé.

1. Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre deux molécules. De même, la découverte de nouvelles drogues activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom de "amarrage" ou "Docking" moléculaire ont été développées.

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

2. Définition du Docking moléculaire

Dans le domaine de la modélisation moléculaire, le docking moléculaire est une méthode qui prédit la conformation (position et orientation relatives) la plus favorable de deux molécules en interaction et formant un complexe stable [1]. La connaissance de cette conformation préférentielle permet par la suite l'estimation de la force d'association (affinité de liaison) entre ces deux molécules.

L'utilisation de la technique de « Docking » apparaît comme une alternative très intéressante quand on n'a pas une réelle connaissance sur le site actif. Le problème le plus important pour l'étape de docking est de parcourir le mieux possible l'espace conformationnel c'est-à-dire l'échantillonnage de l'espace des configurations du complexe ligand-récepteur.

3. Principe général de Docking

Le rôle principal de cette technique est étudié puis prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure de récepteur (protéine). Le docking moléculaire se déroule en deux étapes distinctes (**schéma 01**)

:

- La première « Docking » est l'étape de sélection, qui consiste à positionner le ligand dans le site choisi (site actif) de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- La seconde dite « Scoring » est l'étape de classement, cette méthode permet l'évaluation des interactions énergétiques potentielles (l'affinité) entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées. Ces deux étapes se différencient par le programme de docking utilisé [2].

Avant docking

Représentation du site de liaison du récepteur et du ligand

Pendant docking

Echantillonnage de l'espace des configurations du complexe ligand-récepteur

Pendant scoring

Evaluation des interactions ligand-récepteur

Fin du docking

Visualisation des interactions

Schéma 01 : Protocole général de docking moléculaire.

4. Algorithmes de docking

Chaque programme de docking diffère par rapport aux autres par leurs algorithmes d'échantillonnage, par leur manière de manipuler la flexibilité du ligand et de la protéine et par leurs fonctions d'évaluation des complexes. Les algorithmes de docking peuvent être séparés en deux grandes classes :

- ceux qui ne tiennent pas compte de la flexibilité de la protéine, en traitant celle-ci comme un corps rigide,
 - et ceux qui sont capables de prendre en compte, partiellement la flexibilité du récepteur.
- Des études ont montré que certains algorithmes de docking sont plus fiables que d'autres pour reproduire le mode de fixation expérimentale des ligands [3].

Les algorithmes de recherche de la flexibilité du ligand peuvent être classés en différents groupes selon la méthodologie utilisée: les algorithmes de recherche systématique, stochastique et les approches de simulation.

4.1 Recherche systématique

Le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles (**Figure 01**). Dans un premier lieu, un ou plusieurs fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site actif et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion [4]. Des programmes comme FlexX, Surflex et Dock utilisent cette approche qui permet notamment un criblage rapide de vastes chimiothèques de molécules [5].

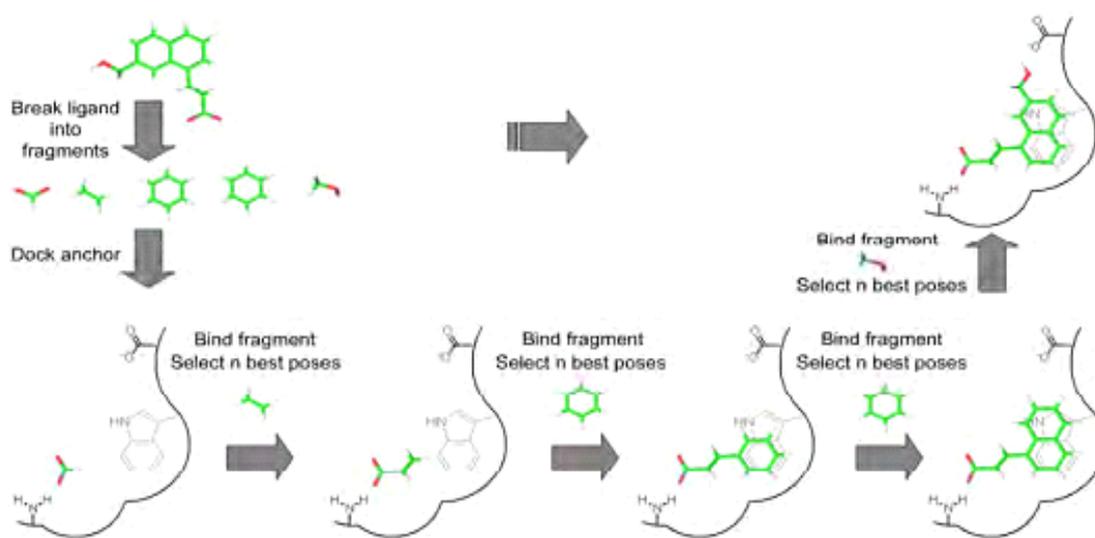


Figure 01 : Construction incrémentale.

4.2 Recherche stochastique (génétique)

L'approche stochastique est plus précise, à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand considéré dans son entier explore le site actif étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Ces techniques sont plus lentes que la méthode systématique mais prennent mieux en considération la flexibilité du ligand et permettent l'exploration des régions plus vastes. Dans cette catégorie, nous pouvons citer GOLD et Auto Dock [6].

4.3 Approches de Simulation

Les méthodes de simulation sont basées sur la résolution des équations du mouvement de Newton. Elles comprennent notamment les techniques de dynamique moléculaire et des algorithmes de minimisation. Les premières ne sont jamais utilisées pour générer de la flexibilité sur le ligand car elles demandent un temps de calcul non compatible avec la gestion de bases de molécules. Les secondes en revanche sont parfois utilisées dans les programmes de docking, en complément d'un autre algorithme de recherche, afin d'atteindre une conformation de basse énergie [7].

5. Fonctions de score

Les fonctions de score sont des méthodes mathématiques et des fonctions discriminant les poses de docking correctes de celles incorrectes. Le score permettra non seulement 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.

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. L'évaluation de ces complexes permet de trouver celui ou ceux les plus susceptibles de reproduire au mieux le mode d'association réel. L'association entre protéines et ligands est gouvernée par plusieurs paramètres thermodynamiques : les interactions hydrophobes, les interactions électrostatiques, les liaisons hydrogène, les effets de solvation et les effets d'entropie.

Le principe thermodynamique est le suivant [8] :

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}} \quad (1)$$

Un score ne prédit donc en rien une activité mais bien une affinité.

L'association non covalente et réversible d'un récepteur (R) et d'un ligand (L) pour former un complexe récepteur@ligand (RL), dans un milieu aqueux contenant des électrolytes peut être décrite par l'équation 2 :



À l'équilibre, cette réaction est déterminée par un constant d'équilibre K (équation 3) et aussi par l'énergie libre de liaison ΔG° (équation 4).

$$K = \frac{[RL]}{[R] \times [L]} \quad (3)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (4)$$

Où R est la constante des gaz parfaits et T est la température (en kelvin) [9,10].

Théoriquement, le complexe est favorable si la variation d'énergie libre globale de complexation est négative ($\Delta G < 0$). En pratique, l'évaluation de l'énergie libre des complexes est une tâche souvent coûteuse. De ce fait, des méthodes approximatives ont été développées pour distinguer (évaluer et classer) les meilleurs complexes parmi ceux générés par une procédure de docking.

Dans les programmes de docking, on trouve différents types de fonction de score :

5.1 Les fonctions de score basées sur un champ de force

Les champs de force dans leur forme standard évaluent la somme de deux énergies issues de la mécanique moléculaire : l'énergie entre atomes liés au sein d'une molécule donnée et l'énergie entre atomes non liés. Ce deuxième terme correspond au terme principal de l'énergie d'interaction protéine-ligand dans le cas d'une application à un problème de docking.

L'affinité d'un ligand donné pour le site actif, mesuré en tant qu'énergie d'interaction, correspond à la somme des énergies d'interaction de van der Waals et électrostatiques : le terme de type van der Waals, en général par un potentiel de Lennard-Jones, et le terme électrostatique coulombien assorti d'une fonction diélectrique dépendante de la distance qui permet d'atténuer les contributions des interactions charge-charge. On peut ajouter à la fonction de score un terme d'énergie interne du ligand. Seule la contribution enthalpique de l'énergie libre d'interaction est ainsi prise en compte [11].

Les fonctions de score qui se basent sur les champs de force les plus rigoureux comme AMBER [12, 13], CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics) [14, 15], GROMOS (GRoningen MOlecular Simulation System) [16] et OPLS (Optimized Potentials for Liquids Simulation) [17].

5.2 Les fonctions de score empiriques

Ce type de fonction de score approxime l'énergie libre de liaison en sommant de façon pondérée différents termes d'interaction dérivés de paramètres structuraux. Les différents poids de la fonction de score sont ajustés pour reproduire en priorité des données expérimentales, telles que les constantes de liaison tirées d'un jeu d'entraînement de complexes protéine-ligand. La plupart des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité (en terme de rapport précision/rapidité). Cependant, le principal inconvénient de ces fonctions empiriques est leur forte dépendance aux données utilisées pour les calibrer qui, en cas de mauvaise paramétrisation, peut limiter leur transférabilité sur des systèmes différents [18]. Elles sont utilisées dans la plupart des algorithmes d'amarrage notamment FlexX [19], Chemscore et LUDI [20, 21].

5.3 Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based »

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes ligand-protéine déterminés expérimentalement afin de reproduire ces données expérimentales obtenues à partir des structures, sans tenir compte de l'énergie des liaisons. Des règles définissant la géométrie préférentielle des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques [22, 23].

Ces fonctions statistiques, dépendent de leurs groupes d'apprentissage (expérience), elles ne peuvent modéliser que les interactions qui existent dans leurs bases de données expérimentales. Par conséquent, ce type de fonctions permet d'établir une corrélation entre l'état thermodynamique du complexe protéine-ligand qui forme un système et la probabilité de trouver ce complexe dans un état microscopique donné [24]. Ainsi les fréquences sont converties en enthalpie libre (énergie) grâce à une distribution de Boltzmann, les potentiels sont donc nommés potentiels de force moyenne (Potential of Mean Force : PMF).

5.4 Fonctions de score consensus

L'idée principale de ces fonctions hybrides est de combinée les informations obtenues à partir des différents scores obtenus afin de compenser les erreurs des fonctions de score individuelles [25]. Plusieurs études ont montré que les énergies libres des complexes sont performées par ces fonctions, ainsi les interactions protéine-ligand sont mieux que les fonctions individuelles [26,27]. Un exemple de fonction de score consensus est X-CSCORE [28] qui combine un PMF [29,30], et ChemScore [31].

6. Les outils de Docking

6.1 Préparation des récepteurs

De nombreuses informations associées à chaque structure sont accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique via la PDB par un serveur internet (<https://www.rcsb.org/>). Le fichier pdb contient diverses informations sur la macromolécule telle que le nom du récepteur, l'équipe qui a résolu la structure, la méthode expérimentale,...etc. On y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. Il est important de signaler que certaines protéines ne sont pas encore disponibles dans cette banque de donnée et si cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, il devient alors possible de construire la structure 3D de la cible souhaitée, en utilisant la modélisation par homologie [32,33].

6.2 Préparation des ligands

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules [34]. 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 [35].
- 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,...etc.).

6.3 Les logiciels

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont : AutoDock, AutoDock Vina, GOLD, FlexX, DOCK et Molegro Virtuel Docker (MVD).

AutoDock Vina

AutoDock Vina est un programme de docking dérivé d'AutoDock comme son nom l'indique, qui a également été développé par le groupe de Arthur J. Olson au "Scripps Research Institute" (<http://autodock.scripps.edu/>) [36]. AutoDock Vina utilise une méthode de gradient d'optimisation sophistiquée dans sa procédure d'optimisation locale.

L'algorithme de positionnement des ligands dans AutoDock Vina est une application globale d'une recherche de type itérative locale "Iterated Local Search global optimizer" [37,38]. Ce type d'algorithme est utilisé pour 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.

7. Les interactions protéine-ligand

Les interactions entre une protéine et un ligand sont en général de nature non covalente et génèrent une énergie appelée énergie libre de Gibbs. Les molécules organiques sont capables de s'auto-associer les unes aux autres grâce à plusieurs types de liaisons faibles, dont les forces électrostatiques, les forces de van der Waals, les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes. Les associations sont dues aux propriétés chimiques, électroniques, et géométriques des molécules. À l'inverse des liaisons covalentes, les liaisons faibles permettent une grande flexibilité et plasticité des macromolécules (protéine, enzymes, complexes protéine-ligand ou protéine- protéine). Les interactions qui stabilisent les structures tridimensionnelles des macromolécules sont [39] :

7.1 Les forces de Van Der Waals

Ces interactions ont été étudiées par J.D. van der Waals, physicien hollandais, prix Nobel de physique 1910. Elles reposent sur les interactions entre les dipôles constitués par les molécules non permanentes de faible rayon d'action (**Figure 02**).

Pour des atomes distants de 3-4 Å, l'énergie de liaison est seulement comprise entre 0.4 et 4 kJ/mol. Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice [40-42].

On distingue trois types de ces interactions :

- Interaction dipôle permanent – dipôle permanent ou effet d'orientation de Keesom : Ce type d'interaction se développe entre deux molécules polaires.
- Interaction dipôle permanent – dipôle instantané ou effet d'induction de Debye : Ce type d'interaction se développe entre une molécule polaire et une molécule quelconque (polaire ou apolaire).
- Interaction dipôle instantané – dipôle instantané ou dispersion de London : Ce type d'interaction se développe entre deux molécules quelconques (polaires ou apolaires). Ces interactions sont très faibles mais dans le cas des macromolécules, leur nombre

élevé va produire au totale une force importante [43].

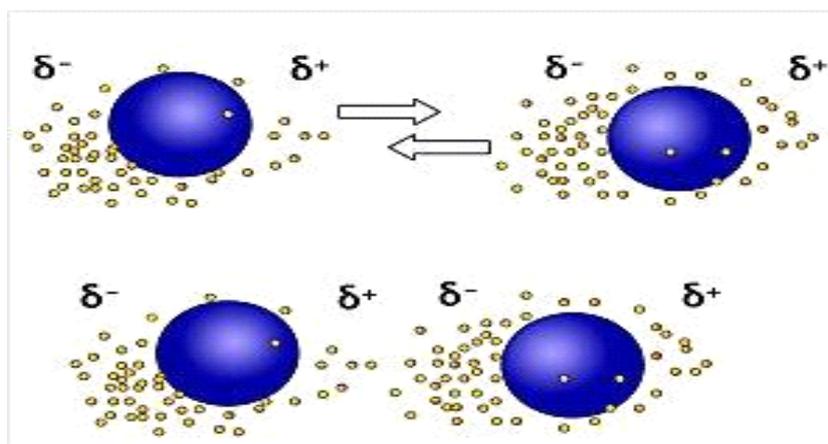


Figure 02 : Les interactions de Van der Waals.

7.2 Liaison hydrogène

Cette liaison, intervient lorsqu'un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome électronégatif (le donneur D) est attiré par un autre atome électronégatif (l'accepteur A). Le nuage électronique de l'hydrogène est attiré par l'atome donneur qui est relativement plus électronégatif que l'atome d'hydrogène créant ainsi une charge partielle positive sur l'hydrogène. Cette charge positive est attirée par la charge partielle négative portée par l'atome accepteur donnant ainsi naissance à une interaction désignée par pont hydrogène, avec une force de l'ordre de 2 à 4 Kcal/mol agissent dans les systèmes biologiques, à très courte distance (0.8 à 2.8 Å). Ils sont peu nombreux et s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°). Elle est définie par la distance entre les deux atomes qui forment la liaison covalente D-H de type δ , la longueur de l'interaction H...A et l'angle D-H...A, **Figure 03**.

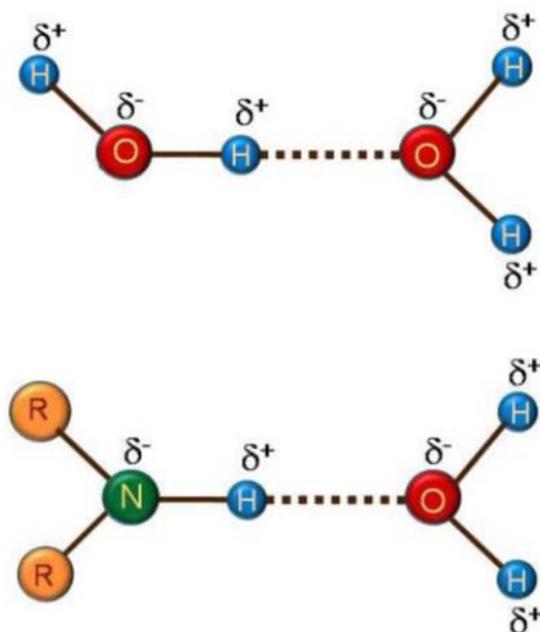


Figure 03 : Exemples d'une liaison hydrogène.

7.3 Les interactions hydrophobes

Les molécules dépourvues de groupes chargés ou d'atomes capables de former des liaisons hydrogène ne peuvent donc pas s'hydrater, on les nomme pour cette raison substances hydrophobes. L'effet hydrophobe est la tendance qu'ont ces groupes à se rassembler par coalescence de façon à minimiser les contacts avec l'eau [43]. La force des liaisons hydrophobes est de l'ordre de 20 à 30 kJ/mol [40, 41].

7.4 Interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques agissent à plus grande distance entre dipôles chargés. La distance pour une liaison saline, par exemple, est de 3.7 à 4.5 Å, et sa force est de l'ordre de 8 Kcal/mol. En présence de solvant, ces interactions sont favorisées du fait de la polarité et de la petite taille de la molécule d'eau [44].

Références bibliographiques

1. Lengauer T, Rarey M (Jun), "Computational methods for biomolecular docking. Current Opinion in structural Biology", 1996,p 402-406.
2. François M., Thèse de doctorat. Université paris,2007.
3. Chaib E., Guemmor S., Mémoire présenté du Diplôme de Master,2015.
4. Bouchrit,H., Thèse de magister. Université Mentouri. Algérie. 2012. p70.
5. Bessadok, M.A., Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie. France. 2011. p189.
6. Brut, M., Thèse de doctorat. Université pierre et marie curie. France,2009. p123.
7. Vieth. M., Hirst.JD., Kolinski. A., Brooks. CL,journal of computational chemistry, 1998 ,p1612.
8. Arrault A., Thèse de doctorat. Université d'Orleans. France, 2007. p176.
9. GrosdidierA., Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier. France, 2007. P90.
10. Brut .M., Thèse de doctorat d'université, Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 2009. 170 p.
11. Arrault A., Thèse de doctorat. Université d'Orleans. France, 2007. p50.
12. Weiner P.K., Kollman P.A. "AMBER-assisted model building with energy refinement-a general program for modeling molecules and their interactions "Journal of Computational Chemistry, 1981 ,p287.
13. Weiner S.J., Kollman P.A., Nguyen D.T., D.A. Case, "An all-atom force field for simulations of protein and nucleic acids ", Journal of Computational Chemistry ,1986, p230.
14. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M., "programm for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations" Journal of Computational Chemistry, 1983, p187.
15. Nilsson L., Karplus M., "Empirical energy functions for energy minimization and dynamics of nucleic acids", Journal of Computational Chemistry, 1986, p591.
16. Van Gunsteren W.F., Berendsen H.C., " Computer simulations of molecular dynamics: methodology, applications, and perspectives in chemistry", AngewChemIntEd , 1990, p 992.
17. Jorgensen W.L., Tirado-Rives J., "The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin", Journal of American chemical society, 1988, .p1657.
18. Arrault A., Thèse de doctorat. Université d'Orleans. France,2007. p50.

19. Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. "A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm"., *Journal of molecule biology*,1996, p470.
20. Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and application"s, *Drug discovery*, 2004, .p935.
21. Reddy A. S., Pati S. P., Kumar P. P., Pradeep H. N., Sastry G. N, "Virtual Screening in Drug Discovery – A Computational Perspective. *Current Protein and Peptide Science*". 2007, p 329.
22. Boehm HJ, "The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three dimensional structure", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1994,p 243-256.
23. Muegge I,"Aknowledge-based scoring function for protein-ligand interaction: Probing the reference state", *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 2000, p20- 99-114.
24. Perez C, Pastor M, Ortiz AR, Gago FJ,"Comparative binding energy analysis of HIV-1 protease inhibitors: incorporation of solvent effects and validation as a powerful tool in receptor-based drug design",*Journal of Medicinal Chemistry*, 1998,p 41- 836-852.
25. Charifson PS, Corkery JJ, Murcko MA, Walters WP,"Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three dimensional structures into proteins", *Journal of Medicinal Chemistry*, 1999,p 42.
26. Bissantz C, Folkers G, Rognan D, "Protein-based virtual screening of chemical databases. Evaluation of different docking scoring combinations", *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000,p 43.
27. Terp GE, Johansen BN, Christensen IT, Jørgensen FS, " A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities", *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001,p44.
28. Wang RX, Lai LH, Wang SM, " Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2002,p 16- 11 -26.
29. Muegge I. "PMF. Scoring revisited", *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006,p49.
30. Muegge I. Effect of ligand volume correction on PMF scoring. *Journal of Computational Chemistry*, 2001,p 22.
31. Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP. "Empirical scoring functions: The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes", *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1997,p11.

32. Martin L., Thèse de doctorat. Université Montpellier 2. France. 2006, p149.
33. RCSB PDB. RCSB PDB statistics. [En ligne] http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html. Consulté le : [17-04-2011].
34. Monge A., Thèse de doctorat. Université d'Orléans. France, 2006. p154.
35. Didier R, Pascal B, "Chemical databases and virtual screening". Med Sci (Paris), 2014, 30, p1152–1160.
36. Trott O, Olson AJ. AutoDockVina, "improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading", Journal of Computational Chemistry, 2010,p 455-461.
37. Baxter J. "Local optima avoidance in depot location", Journal of the Operational Research Society, 1981,p 815–819.
38. Lourenço HR, Martin OC, Stützle T. "Iterated local search: Framework and applications, in Handbook of Metaheuristics". Springer, 2010,p 363–397.
39. Guerfi W., Cherifi M., Mémoire présenté du Diplôme de Master,2016.
40. <http://adherence-gecko.e-monsite.com/pages/ii-comment-expliquer-le-fait-que-ces-geckos-puissent-adherer-a-des-surfaces-lisses-verticales/d-forces-de-van-der-waals.html> .consulté le 20/04/2017.
41. Karp G. ", Biologie moléculaire et cellulaire",3ème édition, France : De Boeck, 2004,p850 .
42. Voet D., Voet J. G, "Biochimie", 2ème édition,France : De Boeck. 2005.p1600.
43. GauchardP. A",Les interactions de faible énergie",http://www.umvf.biomedicale.univ-paris5.fr/.../gauchard_pierre_alexis_P05.pdf.
44. Israelachvili JN,"Intermolecular and surface forces. Academic Press", 2e édition, Londres 1997.

1. Présentation des cytochromes P450

1.1. Définition et structure générale

Le cytochrome est une protéine indispensable à la production d'énergie par les cellules. Il participe à la chaîne respiratoire des cellules fonctionnant comme transporteur d'électrons, permettant la synthèse d'ATP (Adénosine-tri-phosphate) qui est la source d'énergie pour les cellules. Certains cytochromes ont une activité enzymatique, il s'agit du groupe des cytochromes P450 (CYP P450).

Il s'agit d'un groupe d'auto-enzymes d'environ 60 enzymes produites par l'organisme et participe au processus de représentation nutritionnelle des médicaments, principalement concentré dans le foie.

Ils doivent leur nom à leur découverte par deux japonais en 1963, SATO et OMURA, sous forme de pigments dans des fractions microsomales hépatiques et à leur spectre d'absorption à 450nm quand leur atome de fer est réduit à l'état ferreux en présence de monoxyde de carbone. D'où le terme [1] :

- Cyto : Vésicule microsomiale,
- P : pigmented et,
- 450 : longueur d'onde.

Ces enzymes sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes et de l'épithélium des cellules intestinales essentiellement. Plus de 200 enzymes CYP P450 existent dans la nature dont au moins 60 ont été répertoriées chez l'homme.

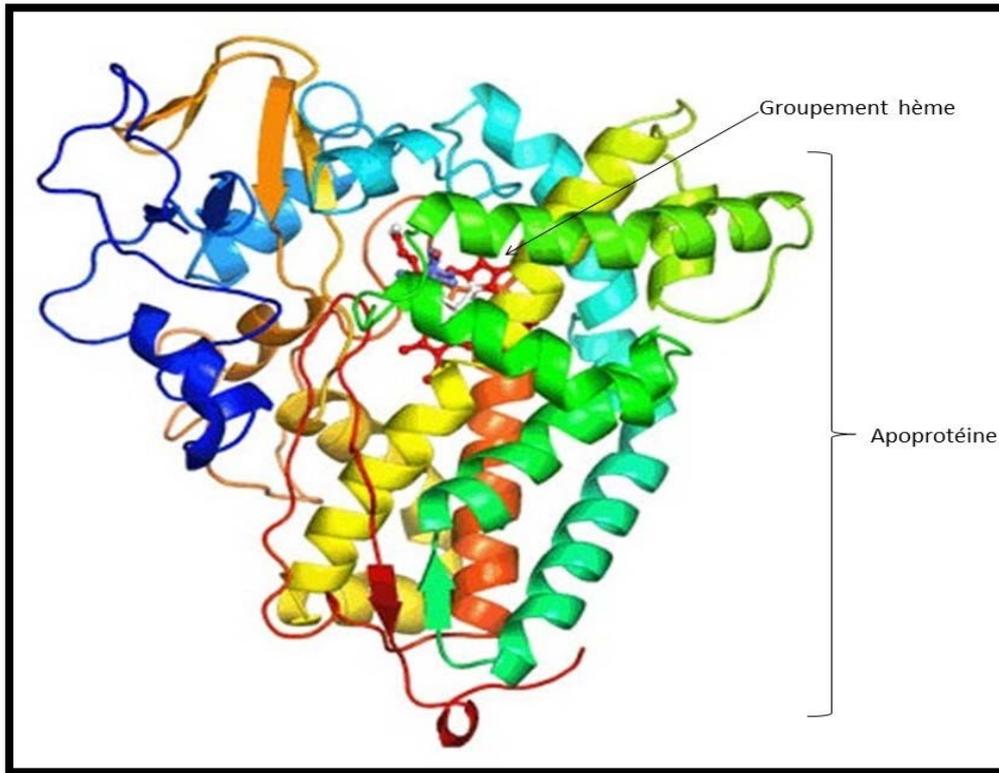


Figure 01 : Structure générale d'un cytochrome P450.

Les CYP450 agissent comme des catalyseurs pour faciliter la transformation des médicaments de leur structure chimique primaire en modèles biochimiques qui ont des effets pharmacologiques sur le corps.

Le cytochrome P450 est constitué d'une chaîne polypeptidique simple et d'un groupement prosthétique, noyau tétrapyrrolique (protoporphyrine IX) associé à un atome de fer, c'est à-dire un noyau héminique. Le Cytochrome P450 est donc une hémoprotéine contenant une molécule d'hème par molécule d'apoprotéine (**Figure 02**). Ils proviennent d'un même gène ancestral s'étant différencié au cours de l'évolution phylogénétique en de très nombreux isoenzymes [2].

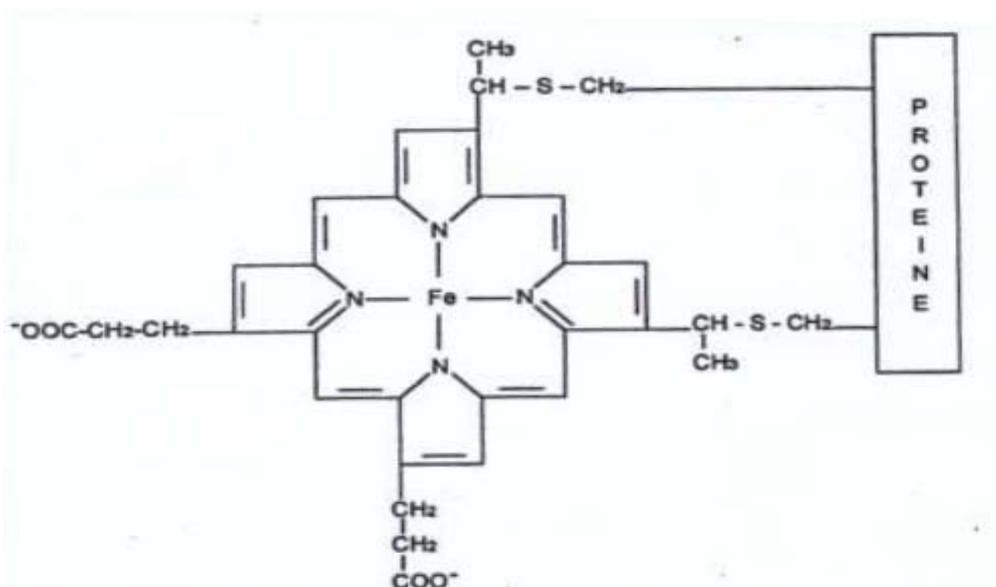


Figure 02 : Protoporphyrine IX de fer constituant l'hème des cytochromes P450.

1.2. Classification

Les cytochromes P450 (CYP) sont des enzymes ubiquitaires intervenant dans le métabolisme de substrats endogènes ou exogènes, notamment médicamenteux. Ils se répartissent en familles (CYP 1-2-3) et sous-familles (CYP 1A - 2C - 2D - 3A).

Parmi ces sous-familles, les principaux CYP impliqués dans le métabolisme des médicaments sont les suivants : CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4. , le CYP3A4 est quantitativement le plus important, il représente environ 50% des cytochromes P450 hépatiques totaux et il est exprimée dans de nombreux tissus extra- hépatiques comme l'intestin grêle, le colon et la peau. D'une façon générale, Environ la moitié des médicaments métabolisés le sont notamment par l'intermédiaire du CYP3A4. Lorsqu'un médicament est neutralisé par une (ou plusieurs enzymes), on le qualifie de substrat de cette enzyme [3].

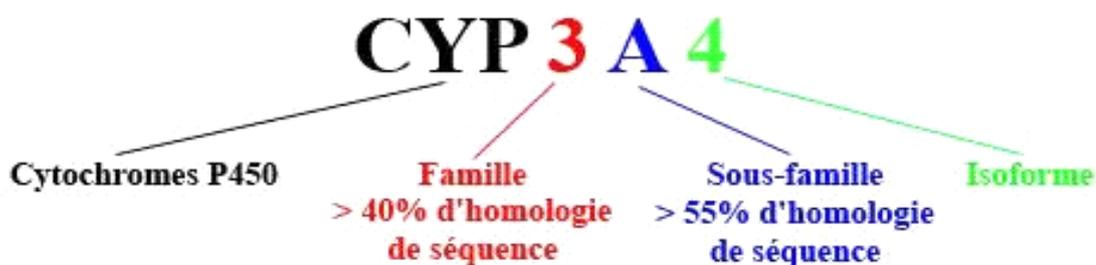


Figure 03: Nomenclature des cytochromes P450 : exemple du CYP3A4.

1.3. La famille CYP3

La famille CYP3 comprend seulement une sous-famille, le CYP3A composé de 4 gènes 3A4, 3A5, 3A7 et 3A43 dont l'expression tissulaire diffère : CYP3A4 est exprimé principalement dans le foie, CYP3A5 dans les tissus extra-hépatiques, et CYP3A7 dans le foie fœtal.

1.4. CYP3A4

Le CYP3A4 a un rôle fondamental puisqu'on estime que plus de 50 % des médicaments sont métabolisés par cette enzyme (antibiotiques, anesthésiques, antihistaminiques, corticostéroïdes, statines, inhibiteurs de la protéase du VIH, certaines benzodiazépines, immunosuppresseurs...). Ce CYP peut ainsi être impliqué dans de nombreuses interactions médicamenteuses importantes en clinique.

Des stéroïdes naturels tels que la testostérone et la progestérone [4,5] sont également métabolisés par cette enzyme. Un important système de régulation contrôle l'expression de cette enzyme, notamment par l'activation de facteurs de transcription par des ligands spécifiques [6].

Les propriétés pharmacologiques de ce système de régulation expliquent la capacité de certains médicaments à protéger l'organisme des effets toxiques d'autres composés. Selon qu'il se produit une induction ou une inhibition de cette enzyme, l'efficacité thérapeutique d'un médicament ou de sa forme active peut également être modulée.

Par conséquent, l'administration concomitante par voie orale d'un inhibiteur du CYP3A4 (jus de pamplemousse) et d'un médicament substrat de cette même isoenzyme peut entraîner une augmentation très importante de la concentration plasmatique du médicament et conduire ainsi à une toxicité accrue [7].

2. Inhibition enzymatique

Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Un inhibiteur peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place, ou provoquer une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive (inhibiteur allostérique). L'inhibition des enzymes joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques, et notamment dans la régulation des voies métaboliques [8].

Certains inhibiteurs s'associent de manière réversible à l'enzyme en interagissant de manière non covalente. D'autres se fixent de manière irréversible et sont souvent utilisés pour déterminer les groupes actifs du site catalytique.

2.1. Inhibition réversible

a. Inhibiteurs compétitifs: l'une des molécules bloque le site actif de l'enzyme car le substrat doit entrer en compétition avec l'inhibiteur pour se lier à l'enzyme.

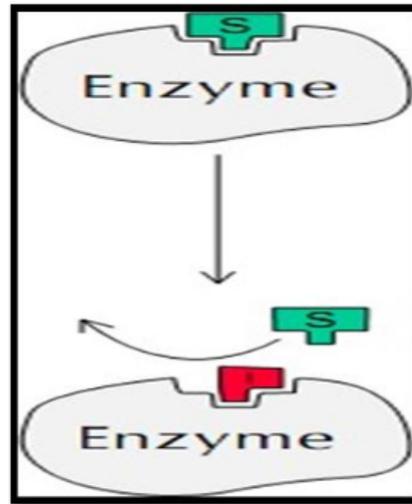


Figure 04: Inhibition compétitive.

Schéma dans le cas d'une inhibition compétitive :



b. Inhibiteurs incompétitifs: l'inhibiteur est lié à l'enzyme et au substrat après leur liaison; Cela rend plus difficile l'élimination des produits du site actif, et ainsi la réaction devient plus lente.

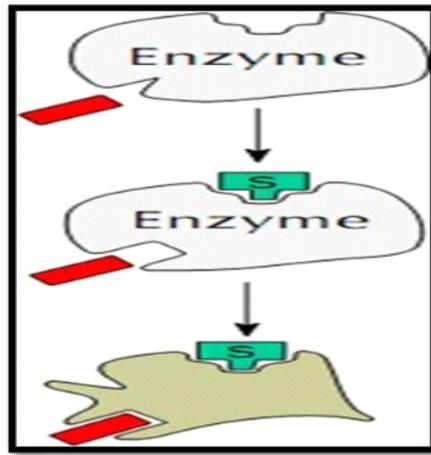
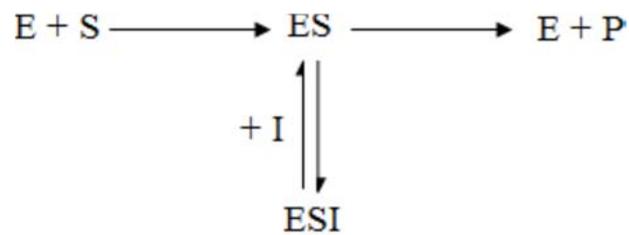
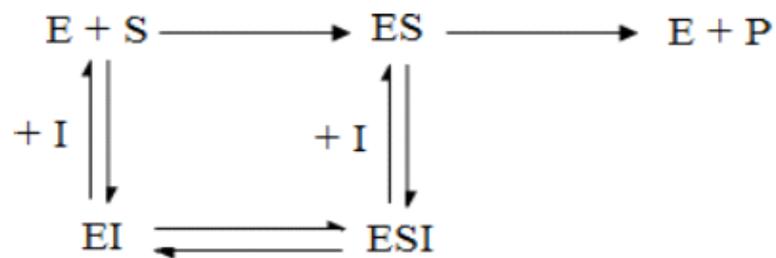


Figure 05 : Inhibition incompétitive.

Schéma dans le cas d'une inhibition incompétitive :



c. **Inhibiteurs non compétitifs:** la molécule se lie à l'enzyme ailleurs que sur le site actif, réduisant sa puissance.



2.2. **Inhibiteurs irréversibles:** l'inhibiteur est lié à l'enzyme par une liaison covalente et la désactive définitivement. On l'appelle un inactivateur.

2.3. Effet inhibiteur enzymatique

Tout d'abord, le modèle de la serrure et de la clé a été proposé en 1894. Dans ce modèle, le site actif de l'enzyme a une forme spécifique, et cette forme s'adapte uniquement au substrat d'où :

- . Les réactifs sont liés à leur adéquation et leur adéquation au site actif, c'est-à-dire serrure et clé.
- . Le site actif change de forme pour entourer le sujet plus étroitement avec un processus appelé modèle d'ajustement induit.
- . Lorsque le substrat est maintenu en place après avoir changé de position, les enzymes commencent à former de nouveaux produits.

Dans ce modèle, le site actif change de forme lorsqu'il interagit avec le substrat, et une fois que le substrat est installé à son emplacement approprié, le processus de stimulation commence.

L'étude de l'effet d'inhibiteurs permet :

- d'affiner le mécanisme catalytique d'une réaction enzymatique,
- de mieux connaître la spécificité d'une enzyme,
- d'obtenir des données physiques et chimiques concernant le site actif.

3. Inhibition du CYP P450

Lorsque deux médicaments ou plus sont administrés au même temps (ou une autre substance, d'origine alimentaire par exemple jus de pamplemousse). Un médicament est un inhibiteur d'un cytochrome quand il bloque le métabolisme que doit effectuer un cytochrome pour éliminer un autre médicament ou substance. Il y a donc nécessité de la concomitance des prises de ces deux substances pour que l'inhibition se fasse. Cette association médicamenteuse a pour effet de diminuer le métabolisme du médicament inhibé, d'en augmenter sa concentration plasmatique, de prolonger ses effets thérapeutiques et de déclencher éventuellement des effets indésirables si la dose de ce médicament dont le métabolisme est inhibé n'est pas diminuée, l'inhibition enzymatique est un phénomène plus dangereux [9].

L'inhibition peut provenir :

- D'une réduction de la biosynthèse de protéines microsomiales et du CYP P450 ou d'une augmentation de leur catabolisme.
- De la fixation sur le groupement hème du CYP P450 de molécules bloquant le cycle catalytique.

Des substances administrées simultanément, métabolisées par le même cytochrome rentrent en compétition au niveau de ce même CYP. La substance ayant le moins d'affinité pour ce CYP, voit son métabolisme ralenti et sa concentration plasmatique augmentée. Essentiellement 3 étapes au niveau du cycle du cytochrome sont particulièrement vulnérables à l'inhibition. Il s'agit de l'étape 1 quand le substrat se fixe sur l'enzyme, de l'étape 2 quand l'oxygène moléculaire se fixe sur le fer ferreux et l'étape 3 quand la molécule d'oxygène est transférée sur le substrat.

4. Substances responsables de l'effet inhibiteur enzymatique du jus de pamplemousse

Le jus de pamplemousse renferme de nombreux composés, principalement [10] :

4.1. Flavonoïdes : naringine, naringénine, hespéridine, apigénine, nomoline, narirutine.

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux de la famille des polyphénols qui sont responsables de la coloration des fleurs et des fruits, mais vu les techniques de fabrications industrielles, on en retrouve encore beaucoup dans le jus et représentent une source importante d'antioxydants dans l'alimentation humaine

- a. Naringine :** La naringine, le glycoside de la naringénine est le flavonoïde le plus abondant du jus de pamplemousse, on en trouve jusqu'à 500 mg par litre. C'est elle qui donne son goût amer au jus de pamplemousse. Contrairement au jus d'orange qui contient peu de naringine.

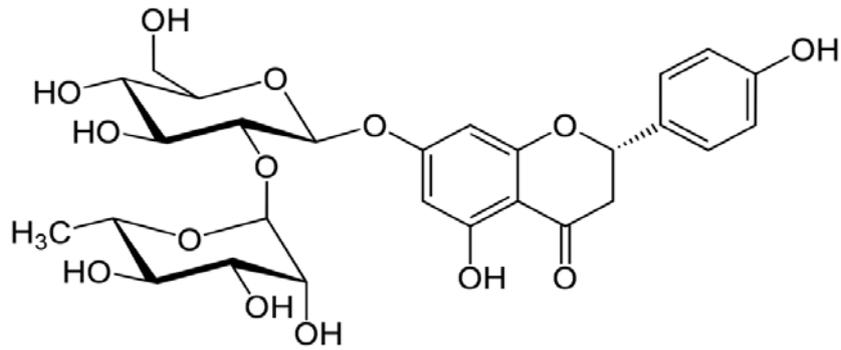


Figure 06: Structure de la naringine.

- b. **Naringénine** : La naringénine, naraginine ou naringétole ($C_{15}H_{12}O_5$) est un composé organique de la famille des flavanones, un sous-groupe de flavonoïdes. Elle est présente dans certains agrumes, en particulier dans le jus de pamplemousse.

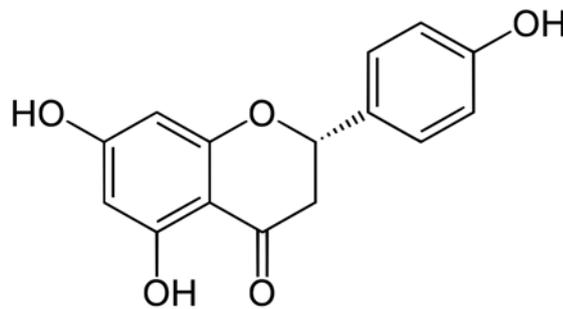


Figure 07: Formule chimique de la naringénine.

- c. **L'hespéridine**: est un produit chimique végétal qui est classé comme «bioflavonoïde». On le trouve le plus souvent dans les agrumes.

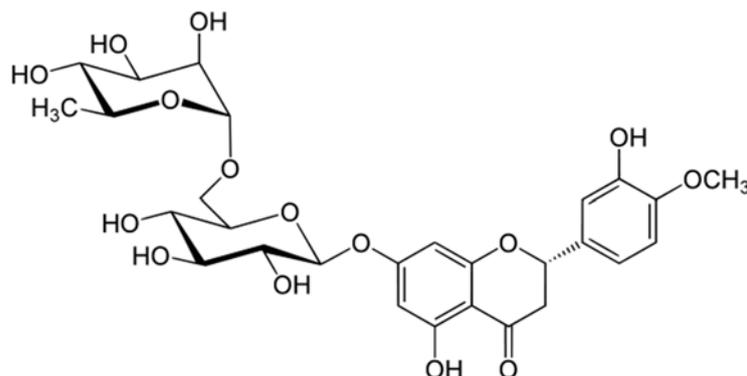


Figure 08: Formule chimique de la l'hespéridine.

4.2. Les Furanocoumarines

Les furanocoumarines [11], appelées également psoralènes, appartiennent à une classe chimique de molécules présentes dans le jus de pamplemousse qui semblent être impliquées dans l'interaction avec les médicaments, on peut citer :

- a. **La bergamottine** (5-géranoxypsoralène) : est une furanocoumarine naturelle présente dans la pulpe des pomelos et des pamplemousses. On le retrouve également dans la peau et la pulpe de l'orange bergamote, dont il a été isolé pour la première fois et dont il tire son nom.

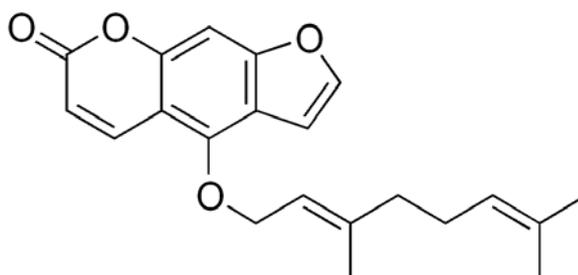


Figure 09: Formule de chimique de la bergamottine.

- b. **Le 6', 7'-dihydroxybergamottine (DHB)** : on pense qu'il est responsable d'un certain nombre d'interactions pamplemousse-médicament, dans lesquelles la consommation d'agrumes contenant un ou les deux de ces composés (en particulier le pamplemousse) affecte le métabolisme de une variété de médicaments pharmaceutiques.

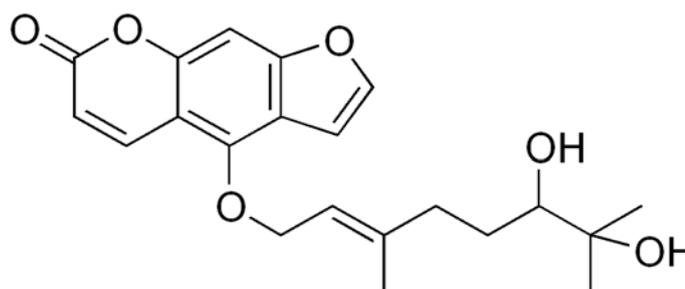


Figure 10 : Formule chimique du 6',7'-dihydroxybergamottine (DHB).

En termes chimiques, la bergamottine et la dihydroxybergamottine sont des furanocoumarines linéaires fonctionnalisées avec des chaînes latérales dérivées du géranol. Ce sont des inhibiteurs de certaines isoformes de l'enzyme du cytochrome P450, en particulier le CYP3A4. Cela empêche le métabolisme oxydatif de certains médicaments par l'enzyme, entraînant une concentration élevée de médicament dans la circulation sanguine [12].

5. Interactions jus de pamplemousse et médicaments

C'est l'un des agrumes qui a été connu ces dernières années comme l'une des méthodes de contrôle du poids, en raison de ses faibles calories, et il contient un grand pourcentage de fibres qui contribuent à la sensation de satiété. Il a de nombreux avantages nutritionnels multiples, il est riche en vitamines, minéraux et antioxydants.

Le fruit du jus de pamplemousse contient des furanocoumarines qui perturbent le travail de l'une des enzymes corporelles importantes, le Cytochrome P450. Cette enzyme est l'une des enzymes responsables de l'élimination des médicaments et des toxines et de contrôle de leur concentration dans le sang. Perturber le travail de cette enzyme signifie laisser la place à certains médicaments pour s'accumuler davantage dans le sang et atteindre des concentrations toxiques ou réduire les concentrations de certains autres médicaments et ne pas atteindre leur effet efficace [13].

6. Action du Jus de Pamplemousse sur le cytochrome P450

La consommation de jus de pamplemousse au moment de la prise de certains médicaments entraîne une modification d'un ou plusieurs paramètres pharmacocinétiques de ces médicaments par rapport à une administration avec de l'eau. Les médicaments pour lesquels on a remarqué ces modifications sont des molécules métabolisées par les cytochromes P450 et plus spécifiquement les cytochromes P450 3A4 (CYP3A4). L'ingestion du jus de pamplemousse conduit à une diminution sélective de l'expression des CYP3A4 et CYP 3A5 au niveau des entérocytes avec comme conséquence une augmentation de la biodisponibilité des substances administrées. Il semblerait qu'une ou plusieurs substances du jus de pamplemousse entraînent une dégradation intracellulaire rapide de l'enzyme CYP3A4 intestinale par inhibition suicide irréversible [14].

Le jus de pamplemousse inhibe également l'enzyme CYP1A2 in vitro, mais pas in vivo. L'action du jus de pamplemousse se situe au niveau de la barrière intestinale, où l'expression de ce cytochrome est faible. Un phénomène d'inhibition compétitive interviendrait également mais il errait mineur. Ce mécanisme d'interaction qui fait intervenir le CYP 3A4 est le plus important dans l'interaction jus de pamplemousse-médicaments [15].

Références bibliographiques

1. Géraldine. L, Thèse d'exercice. "Interactions médicamenteuses le rôle des CYP P450 », LYON : s.n., 19 mars 2002.
2. Danielson.,p.,B, "The Cytochrome P450 Superfamily; Biochemistry, évolution and Drug Metabolism in Humans", *Current Drug Metabolism*, 2002,p 561-597.
3. Paul, R, "Cytochrome P450, Structure, and Biochemistry", Kluwer academic plénum Publishers, New York, 2005.
4. Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H , "Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes", *Xenobiotic* 1998 .
5. Guengerich FP, " Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism", *Revue PharmacolToxicol*1999, p39.
6. Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA, " Regulation of cyp3a gene transcription by the pregnane x receptor",*Revue PharmacolToxicol*2002,p42.
7. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. «Pharmacokinetic-pharmaco-dynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition", *Clin Pharmacokinet* 2000; 38: 41-57.
8. AFSSAPS. "Interaction médicaments et jus de pamplemousse-Mise au point", *Afsapps.fr*. 2008.
9. Bailey, D.G, Bend, J. R et Dresser, G.K."Bergamottine, " lime juice, and redwineas inhibitor of cytochrome P450 3A4 activity: comparaison with grape fruit juice". *Clinical Pharmacology § Therapeutics* (2003), p529.
10. Mertens-Talcott,SU,"Grapefruit-drug interactions: can interactions with drugs be avoided?.", *Journal of Clinical Pharmacology* .(2006), p 1390.
11. Nelson, D. R.;Koymans, L.;Kamataki, T.;Stegeman, J. J.; Feyereisen, R.;Waxman, D. J.;Waterman, M. R.;Gotoh, O.; Coon, M. J.;Estabrook, R. W.;Gunsalus, I. C.;Nebert, D. W. "Pharmacogenetics" 1996, p6.
12. Shimada, T.;Yamazaki, H.;Mimura, M.;Inui, Y.;Guen-gerish, F. P. J. "Pharacol. Exp. Ther, 1994, p 270, 414.
13. Benchoucha R., *Cour biochimie, 1er année médecine.*

14. LIN, J.H et LU, A.Y.H."Inhibiteurs et substrats de l'isoenzyme CYP 3A4 du cytochrome P450". La Revue Prescrire. 2008, p 198.

15. HARAPU, CD, MIRON, A et CUCIUREANU, M. " Flavonoïds-bioactive compouds in fruit juice. ", Revue Medical, p. 1209-1214.

1. Introduction

Nous avons étudié l'inhibition du cytochrome CYP3A4 par le jus de pamplemousse afin de mieux connaître les composants responsables de l'inhibition.

Basant sur les résultats obtenus par des travaux expérimentaux [1], ou ils ont constaté que les furanocoumarines sont des ingrédients responsables de l'inhibition.

Alors nous avons choisi les furanocoumarines afin de connaître le groupement fonctionnel responsable de l'inhibition de CYP3A4.

Pour atteindre ce but, nous avons étudié par docking moléculaire l'interaction des dérivés de la furanocoumarine contenues dans le jus de pamplemousse sur le cytochrome CYP3A4 métabolisant le médicament.

2. Les outils de Docking

2.1 Les inhibiteurs

Dans notre travail, nous avons construit les dérivés de la furanocoumarine avec le logiciel « CHEM SKETCH » (connue aussi sous le nom de ACD/chemSketch) [2].

- **Propriétés électroniques des inhibiteurs**

Les calculs ab initio ont été réalisés à l'aide du logiciel Gaussian09 [3] en utilisant la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) avec la fonctionnelle B3LYP/ 6-31G(d,p). Pour chaque inhibiteur, nous avons effectué l'optimisation de la géométrie et le calcul de fréquence.

Les deux orbitales moléculaires HOMO et LUMO appelées orbitales frontières, jouent un rôle particulier au niveau du comportement des molécules vis-à-vis au milieu environnant. HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) traduit le caractère électro-donneur de la molécule. Plus l'énergie de cette orbitale est élevée, plus la molécule cèdera facilement des électrons. Alors que LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) traduit le caractère électro-accepteur de la molécule, plus l'énergie de l'orbitale moléculaire est faible, plus la molécule acceptera facilement des électrons. Les énergies des orbitales HOMO et LUMO sont utilisées pour étudier la bioactivité des molécules à partir de l'étude du transfert de charge intramoléculaire et expliquer la réactivité chimique de la molécule.

La valeur de l'écart énergétique HOMO-LUMO (le gap énergétique (ΔE) est la différence entre les deux niveaux HOMO et LUMO) joue un rôle intéressant dans les propriétés électriques et optiques.

D'après le **Tableau 01**, On remarque que la valeur de (ΔE) est comprise entre -4.44 eV et -3.61eV. Cette valeur est généralement associée à une réactivité importante de la molécule, traduisant une interaction importante par transfert de charge au sein des molécules, ce qui favorise la bioactivité des inhibiteurs.

Les structures des inhibiteurs ainsi obtenues sont enregistrées en format pdb. La phase finale de préparation du ligand est réalisée par le programme Vina [4]. 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.

Tableau 01 : Les propriétés électroniques des inhibiteurs.

| Structure | HOMO | LUMO | ΔE (eV) | Structure | HOMO | LUMO | ΔE (eV) |
|-----------|-------|-------|-----------------|-----------|-------|-------|-----------------|
| 1 | -5.78 | -2.16 | -3.61 | 10 | -6.46 | -2.24 | -4.21 |
| 2 | -6.20 | -2.02 | -4.18 | 11 | -6.24 | -1.94 | -4.30 |
| 3 | -6.12 | -1.88 | -4.24 | 12 | -6.25 | -1.94 | -4.30 |
| 4 | -6.22 | -1.90 | -4.31 | 13 | -6.25 | -1.94 | -4.30 |
| 5 | -6.17 | -2.07 | -4.09 | 14 | -6.59 | -2.30 | -4.28 |
| 6 | -6.17 | -1.79 | -4.37 | 15 | -6.18 | -1.88 | -4.29 |
| 7 | -6.23 | -1.91 | -4.31 | 16 | -6.11 | -1.75 | -4.36 |
| 8 | -6.33 | -2.01 | -4.31 | 17 | -6.19 | -1.76 | -4.44 |
| 9 | -6.27 | -1.95 | -4.31 | 18 | -6.00 | -2.10 | -3.90 |

2.2 Récepteur

Le fichier du récepteur utilisé par AutoDock doit être sous format *pdb*. Parmi les nombreux complexes proposés par la PDB, nous avons choisi l'enzyme (2V0M). Avant son

utilisation par AutoDock, chaque complexe est séparé de son ligand afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre.

Le récepteur est ensuite préparé en définissant les charges partielles de ses atomes par l'intermédiaire du sous-programme AutoTools qui attribue des charges de type "Kollman". 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 solvation des atomes avant de l'enregistrer dans le format pdbqt (format propre à AutoDock).

- **2V0M** : code PDB représentant la structure 3D de cytochrome P450 3A4 constituée de plusieurs chaînes (A,B,C,D) dans lesquelles se trouve le ligand naturel (KLN) et le hème (Protoporphyrine IX) avec une résolution de 2.80 Å (**Figure 01**).

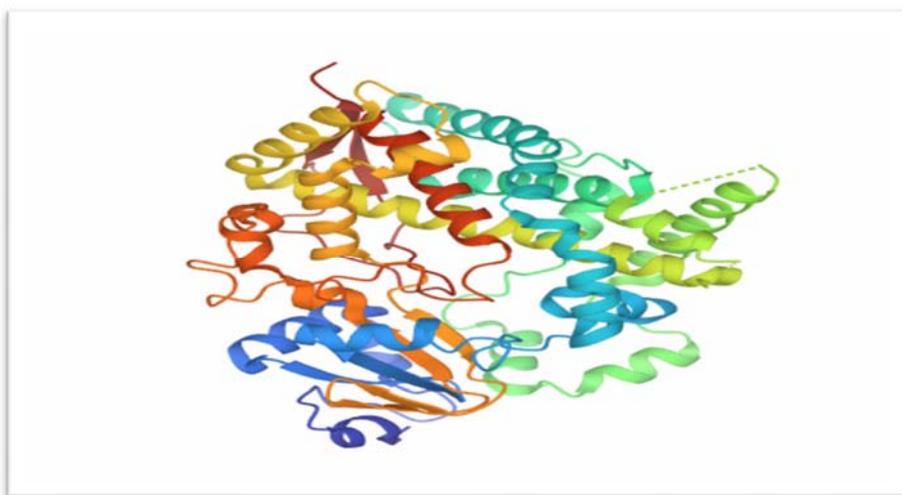


Figure 01 : structure de 2V0M.

2.3 Calcul des grilles de potentiel

Pour augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, le récepteur est plongé dans une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine étudiée et permettant la libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées X et Y et Z avec les dimensions Å³. L'espacement ou la maille de la grille est fixé 0.375 Å. La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés (**Tableau 02**).

Tableau 02: La boîte GRID BOX.

| Récepteur | X (Å) | Y (Å) | Z (Å) | Dimensions (Å ³) |
|-----------|--------|-------|-------|------------------------------|
| 2V0M | 16.627 | 5.736 | 67.17 | 40x40x40 |

3. Résultats et discussion

3.1 Le RMSD

Souvent, les performances d'un programme de docking moléculaire sont évaluées en termes de capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Autrement dit, il faut que l'évaluation quantitative de la déformation spatiale entre la pose du ligand calculée par AutoDock et la conformation dans le complexe expérimental soit la plus petite possible (**Figure 02**). Pour cela, on utilise une grandeur scalaire : RMSD.

Le RMSD correspond à la moyenne de la déviation de chacun des atomes du ligand (ligand docké) par rapport à ceux de la molécule d'origine (le ligand de référence).

Le positionnement, c'est-à-dire l'identification correcte du site de liaison sur la protéine, l'orientation et la conformation du ligand influent sur la valeur du RMSD. La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms (**Tableau 03**).

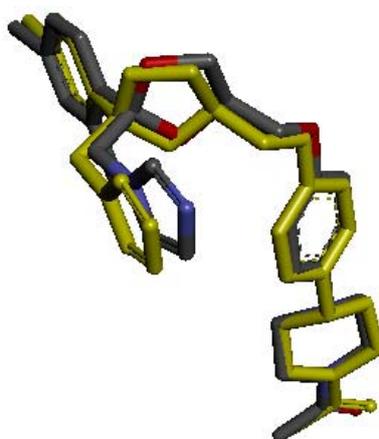


Figure 02 : Superposition du ligand naturel et ligand docké.

Tableau 03 : RMSD du complexe protéine-ligand naturel.

| Code PDB | Code du ligand | RMSD (Å) |
|----------|----------------|----------|
| 2V0M | KLN1500 | 0.46 |

3.2 Docking du cytochrome P450 3A4

Dans le but de connaître les constituants du jus de pamplemousse responsables de l'inhibition des CYP 3A4, nous avons docké chaque composé d'une série de furanocoumarines de jus avec le récepteur CYP 3A4 (2V0M).

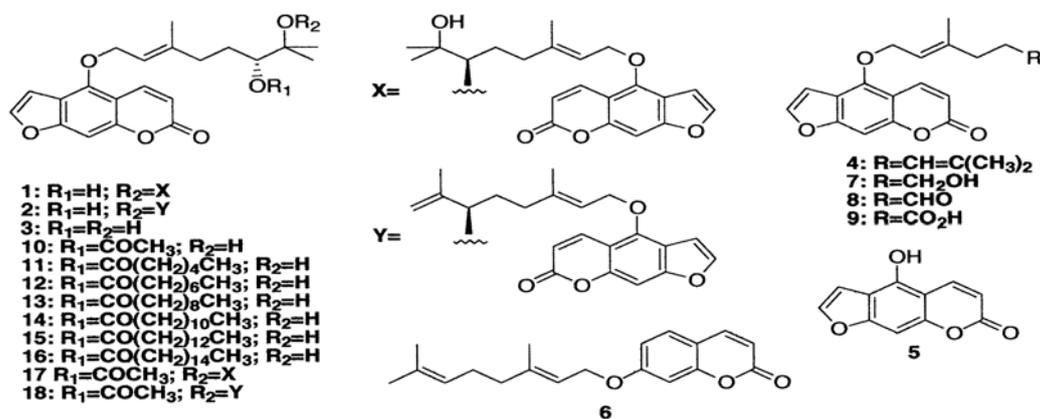


Figure 03 : Structures des furanocoumarines [1].

Tableau 04 : Résultats de docking moléculaire des dérivés de la furanocoumarine.

| Inhibiteurs | Affinité (kcal/mol) | Inhibiteurs | Affinité (kcal/mol) | Inhibiteurs | Affinité (kcal/mol) |
|-------------|------------------------|-------------|------------------------|-------------|------------------------|
| 17 | -11.3 | 13 | -8.7 | 8 | -8.1 |
| 18 | -10.8 | 6 | -8.6 | 14 | -8.0 |
| 2 | -10.3 | 3 | -8.6 | 7 | -8.0 |
| 1 | -10.3 | 9 | -8.4 | 16 | -7.9 |
| 4 | -9.6 | 11 | -8.3 | 5 | -7.5 |
| 10 | -9.1 | 12 | -8.1 | 15 | -7.4 |

Tableau 05 : Inhibition du CYP3A4 par les dérivés du furanocoumarines [1].

| Inhibiteurs | IC ₅₀ (μ M) | Inhibiteurs | IC ₅₀ (μ M) | Inhibiteurs | IC ₅₀ (μ M) |
|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|
| 1 | 0.07 | 7 | 3.4 | 13 | 0.30 |
| 2 | 0.07 | 8 | 2.1 | 14 | 0.93 |
| 3 | 2.3 | 9 | > 10 | 15 | > 10 |
| 4 | 5.4 | 10 | 0.35 | 16 | > 10 |
| 5 | > 10 | 11 | 0.07 | 17 | 0.05 |
| 6 | > 10 | 12 | 0.12 | 18 | 0.18 |

D'après les résultats obtenus (**Tableau 04**) et en examinant les valeurs d'IC₅₀ des furanocoumarines étudiées (**Tableau 05**), les composés (**17**, **18**, **2** et **1**) présentent la meilleure affinité avec une énergie d'interaction comprise entre 11 et 10 kcal, leurs valeurs IC₅₀ sont les plus faibles. Parmi ces inhibiteurs, le **composé 17** dont la valeur d'IC₅₀ égale à 0.05 μ M présente la meilleure affinité vis-à-vis à l'enzyme CYP3A4 avec une énergie d'interaction égale -11.3 Kcal / mol. Donc, on peut constater que le **composé 17** présente la meilleure activité inhibitrice du CYP 3A4 par rapport aux autres constituants de jus de pamplemousse étudiés.

Cependant, la faible affinité a été observé avec les composés (**16**, **5** et **15**) avec IC₅₀ >10 μ M et l'énergie d'interaction des complexes (< 8 Kcal / mol).

Afin de trouver le groupement fonctionnel responsable de l'inhibition du CYP3A4, nous avons d'abord examiné les valeurs IC₅₀ de la dihydroxybergamottine (**3**), de la bergamottine (**4**), du bergaptol (**5**) et de la 7-géranyloxyfurocoumarine (**6**). Les dérivés de 5-géranyloxyfurocoumarine (**3**) et (**4**) ont montré une affinité modérée -8.6 et -9.6 Kcal / mol avec des valeurs de IC₅₀ de 2.3 et 5.4 μ M, respectivement. Tandis que le dérivé de furocoumarine

sans groupement géranyle (**5**) inactif à 10 μM présente la plus faible valeur d'affinité (-7.5 Kcal / mol). Par conséquent, ces données suggèrent fortement que la présence du groupement 5-géranyloxyfurocoumarine est essentielle pour l'inhibition du CYP3A4.

Pour étudier l'effet de la substitution à l'extrémité du groupe géranyle, d'où on substitue l'alcool (**composé 7**) et l'aldéhyde (**composé 8**) cela donne une affinité inhibitrice du CYP3A4 modérée -8.0 et -8.1 Kcal / mol avec des valeurs IC_{50} de 3.4 et 2.1 μM , respectivement. La substitution d'un ester (**composé 10**) a montré une activité significative -9.1 Kcal / mol (valeur IC_{50} , 0.35 μM). Tandis que la substitution d'un acide carboxylique (**composé 9**) présente une affinité de -8.6 Kcal / mol.

Ensuite, pour étudier l'effet des groupements acyle sur l'inhibition du CYP3A4, nous avons examiné les six esters (**composés 11–16**) portant des acides gras saturés dont la longueur de la chaîne de 6 à 16 carbones.

Le **composé 11** a montré une affinité de -8.3 Kcal / mol avec une valeur de IC_{50} égale à 0.07 μM , contrairement aux **composé 1** et **composé 2** (IC_{50} , 0.07) qui ont une affinité plus importante (-10.3 Kcal / mol).

Par conséquent, les acétates (**composé 17**) et (**composé 18**) (valeurs IC_{50} , 0.05 et 0.18 μM , respectivement) dérivés de (**composé 1**) et (**composé 2**), respectivement (**Tableau 05**) ont montré l'inhibition la plus puissante avec une affinité -11.3 et -10.8 Kcal / mol.

Afin d'expliquer les valeurs d'affinité nous proposons de visualiser les interactions pour trouver le groupement fonctionnel responsable de l'inhibition du CYP3A4 et pour vérifier l'effet du substituant à l'extrémité du groupe géranyle et des groupements acyle sur l'inhibition.

Références bibliographiques

1. Tomihisa O, "DihydroxybergamottinCaproate as a Potent and Stable CYP3A4 Inhibitor", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, p 969–973.
2. Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford, 2009 (CT, GaussView v 5.0.9 Visualizer and Builder).
3. ACD/ChemSketch, version 2020.1.1, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2020.
4. Trott O, Olson AJ. AutoDockVina, "improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading", *Journal of Computational Chemistry*, 2010, p 455-461.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons étudié par Docking moléculaire l'effet inhibiteur des dérivés de la furanocoumarine contenues dans le jus de pamplemousse, présumé responsables de l'inhibition des CYP3A4 (code PDB : 2V0M) afin de prédire théoriquement la nature d'action de ces composants sur ce cytochrome et de connaître le groupement fonctionnel responsable de l'inhibition.

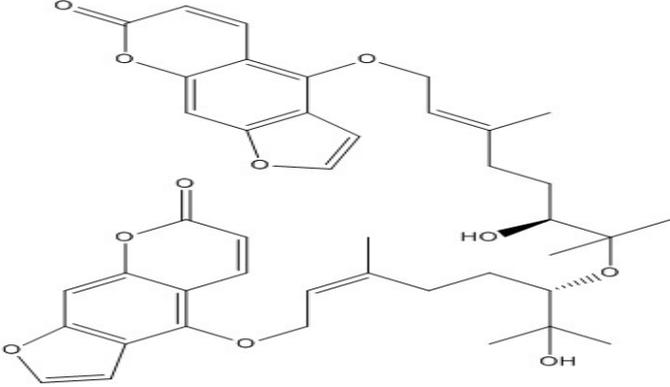
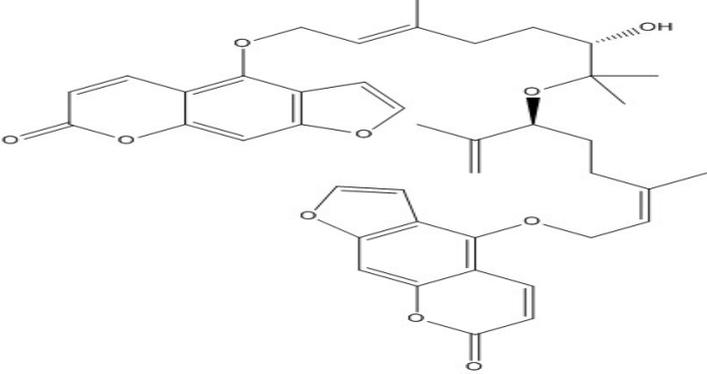
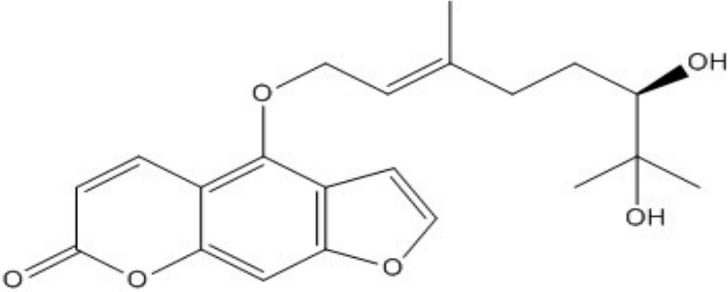
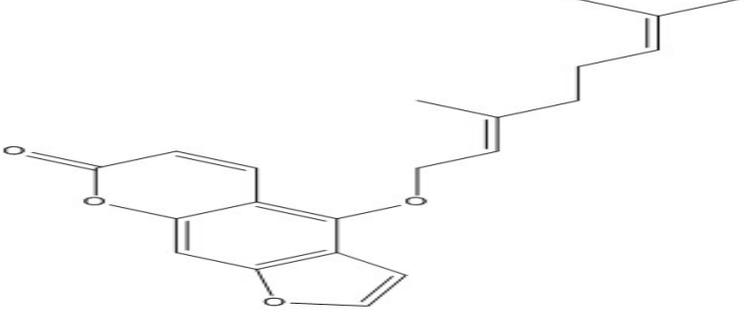
Les ligands (inhibiteurs) ont été classés par ordre décroissant d'affinité vis-à-vis au récepteur en prenant en compte leurs IC₅₀.

Les résultats de Docking montrent que parmi ces inhibiteurs les acétates (**composé 17** et **composé 18**), dérivés de la furanocoumarine (**composé 1** et **composé 2**) présentent la meilleure affinité vis-à-vis au CYP3A4. Cependant la faible affinité a été observé avec les esters (**composé 15** et **composé 16**) et le dérivé de la furocoumarine sans groupement géranyle (**composé 5**). Les autres dérivés de la furanocoumarine constitués de groupement géranyle présentent aussi une activité inhibitrice. On peut donc constater que la présence du groupement 5-géranyloxyfurocoumarine est essentielle pour l'inhibition du CYP3A4.

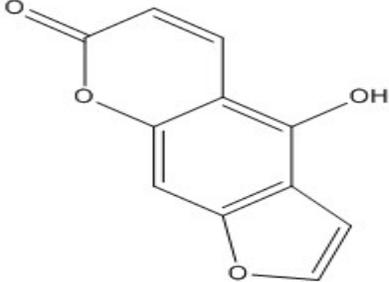
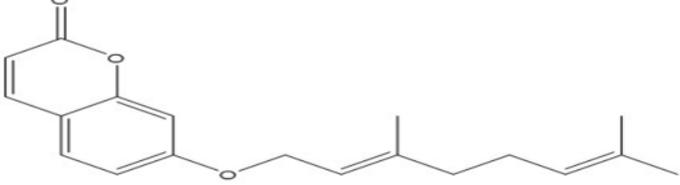
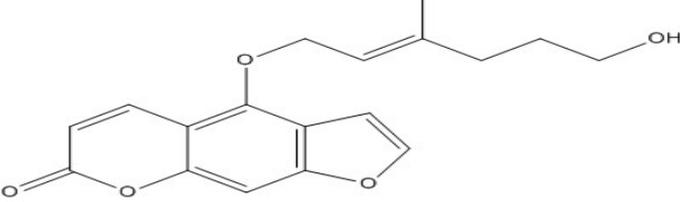
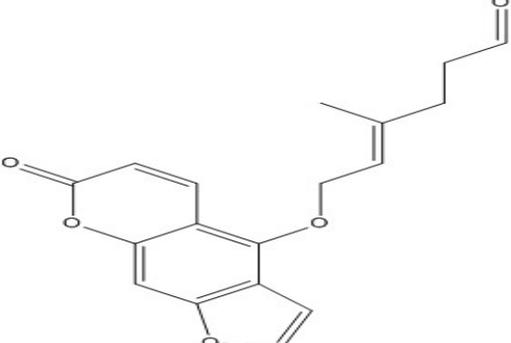
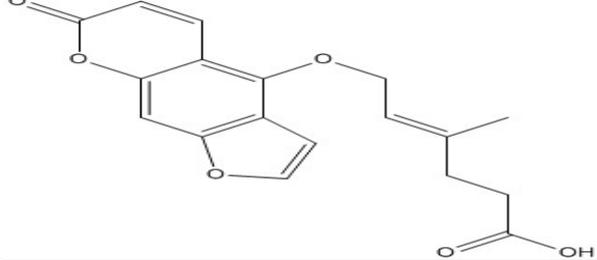
les résultats obtenus par cette technique théorique sont en bon accord avec ceux de l'expérimental.

En perspective, ce travail nécessite une étude structurale par visualisation des interactions mis en jeu, pour pouvoir mieux expliquer les groupements fonctionnels impliqués dans les interactions responsables de l'activité inhibitrice.

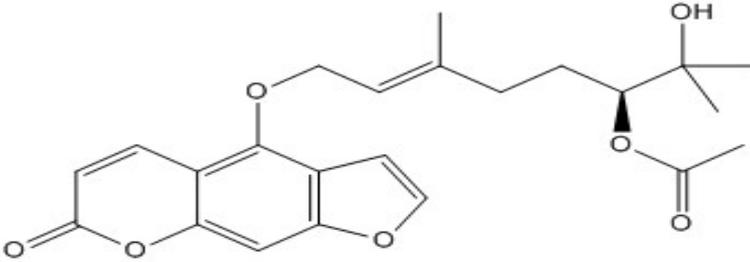
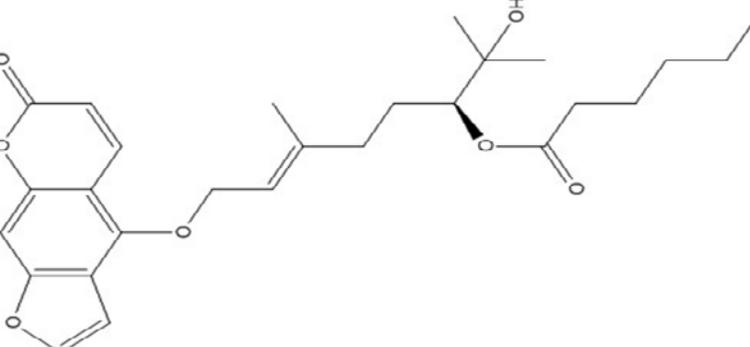
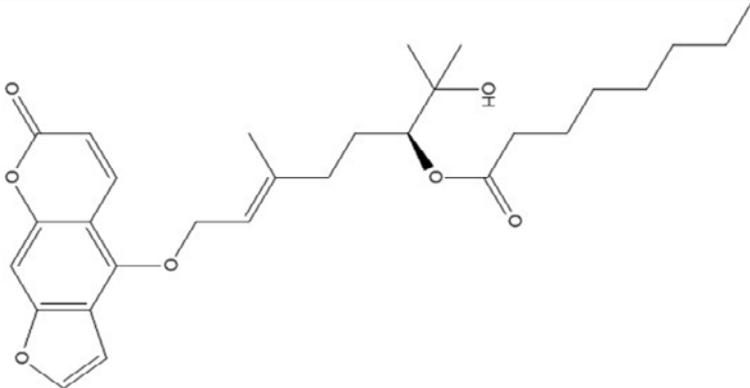
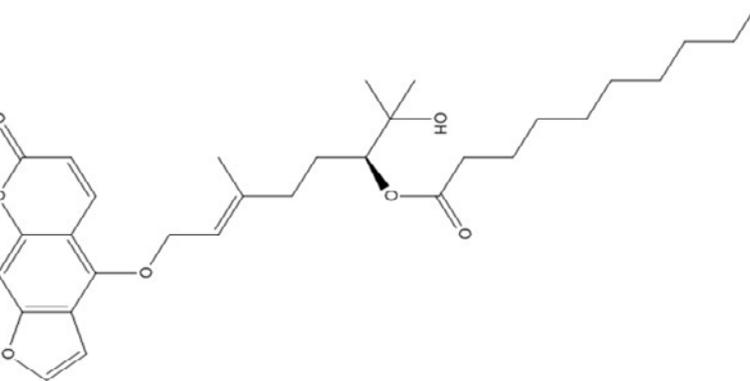
Annexe

| Composé | Les structures |
|---------|---|
| 1 |  <p>Chemical structures of compound 1, showing two isomers of a complex molecule. The molecule consists of a fused bicyclic system (a benzene ring fused to a furan ring) with a pyridone ring attached to the benzene ring. This system is linked via an ether oxygen to a long, branched aliphatic chain. The chain contains two double bonds and two hydroxyl groups. In the top structure, the hydroxyl groups are on adjacent carbons, with one on a wedge and one on a dash. In the bottom structure, the hydroxyl groups are on different carbons, also with one on a wedge and one on a dash.</p> |
| 2 |  <p>Chemical structures of compound 2, showing two isomers of a complex molecule. The molecule consists of a fused bicyclic system (a benzene ring fused to a furan ring) with a pyridone ring attached to the benzene ring. This system is linked via an ether oxygen to a long, branched aliphatic chain. The chain contains two double bonds and one hydroxyl group. In the top structure, the hydroxyl group is on a wedge. In the bottom structure, the hydroxyl group is on a dash.</p> |
| 3 |  <p>Chemical structures of compound 3, showing two isomers of a complex molecule. The molecule consists of a fused bicyclic system (a benzene ring fused to a furan ring) with a pyridone ring attached to the benzene ring. This system is linked via an ether oxygen to a long, branched aliphatic chain. The chain contains two double bonds and two hydroxyl groups. In the top structure, the hydroxyl groups are on adjacent carbons, with one on a wedge and one on a dash. In the bottom structure, the hydroxyl groups are on different carbons, also with one on a wedge and one on a dash.</p> |
| 4 |  <p>Chemical structures of compound 4, showing two isomers of a complex molecule. The molecule consists of a fused bicyclic system (a benzene ring fused to a furan ring) with a pyridone ring attached to the benzene ring. This system is linked via an ether oxygen to a long, branched aliphatic chain. The chain contains two double bonds and no hydroxyl groups.</p> |

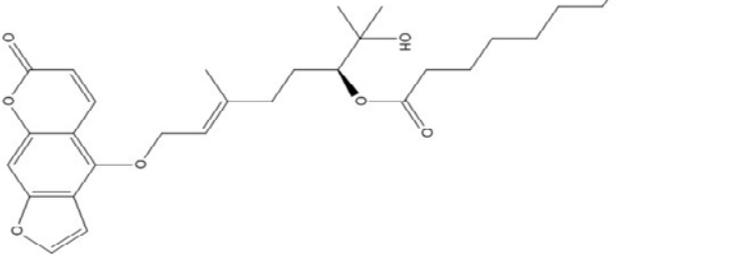
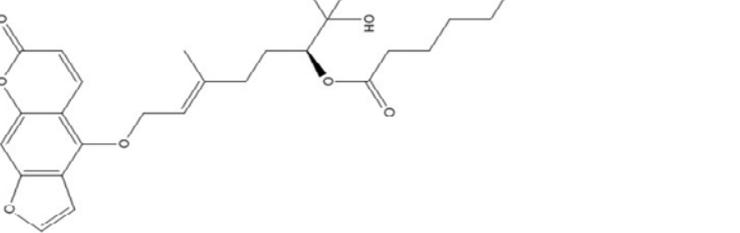
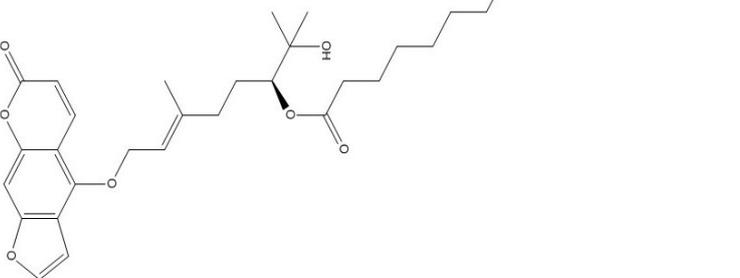
Annexe

| | |
|---|--|
| 5 |  |
| 6 |  |
| 7 |  |
| 8 |  |
| 9 |  |

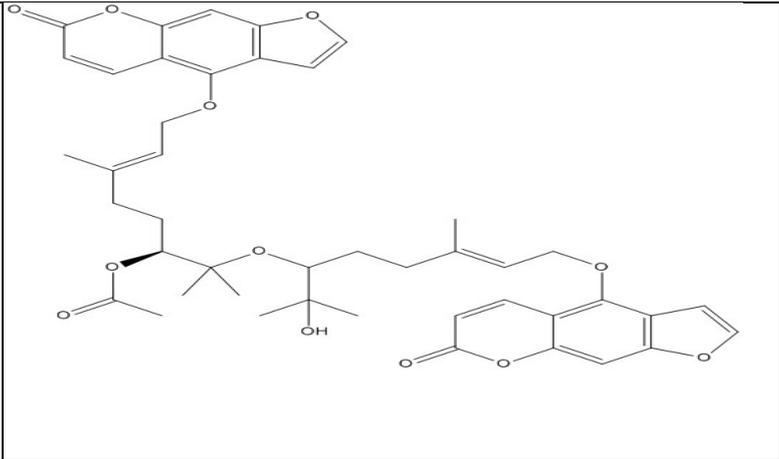
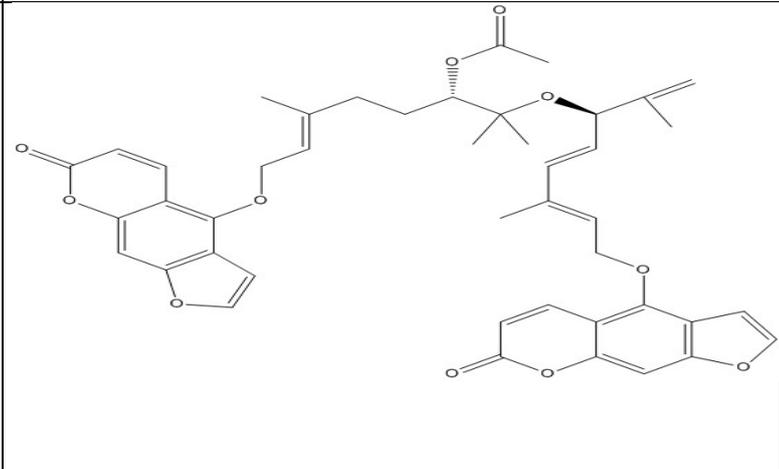
Annexe

| | |
|----|---|
| 10 |  <p>Chemical structure 10: A complex molecule featuring a tricyclic aromatic system (a benzofuran derivative) linked via an ether bridge to a chain containing a double bond, a hydroxyl group, and an ester group.</p> |
| 11 |  <p>Chemical structure 11: A complex molecule featuring a tricyclic aromatic system (a benzofuran derivative) linked via an ether bridge to a chain containing a double bond, a hydroxyl group, and an ester group.</p> |
| 12 |  <p>Chemical structure 12: A complex molecule featuring a tricyclic aromatic system (a benzofuran derivative) linked via an ether bridge to a chain containing a double bond, a hydroxyl group, and an ester group.</p> |
| 13 |  <p>Chemical structure 13: A complex molecule featuring a tricyclic aromatic system (a benzofuran derivative) linked via an ether bridge to a chain containing a double bond, a hydroxyl group, and an ester group.</p> |

Annexe

| | |
|----|--|
| 14 |  |
| 15 |  |
| 16 |  |

Annexe

| | |
|----|---|
| 17 |  |
| 18 |  |