

République Algérienne Démocratique Et Populaire  
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La  
Recherche Scientifique



Université de Guelma

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

Mémoire de Master



Spécialité : Chimie Physique et Analytique

*Présenté par :*

**RAHMOUNI Halima**

**LABACIII Razika**

---

---

**Etude par docking moléculaire de l'oxydation de  
l'acide linoléique par Lipoxygénase**

---

---

**Sous la Direction de :**

**Dr. NIGRI Soraya**

**Dr. LACHI Nadia**

**Juin 2017**

## *Remerciements*

*Avant tout, nous remercions « Dieu » qui nous a donné la force et la puissance pour réaliser et achever ce travail dans des bonnes conditions.*

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Recherche de chimie computationnelle et nanostructures de l'université de Guelma sous la direction des docteurs: Djemil Rayenne, Laachi Nadia et Nigri Soraya.*

*Nous tenons ici à leur exprimer nos plus vifs remerciements et notre profonde reconnaissance pour nous avoir donné la possibilité de réaliser ce travail dans un environnement aussi enrichissant tant sur le plan scientifique que personnel.*

*Nos profonds remerciements vont aussi à Madame Djemil Rayenne pour ces précieux conseils tout le long de ce travail ; Merci encore Madame Djemil Rayenne.*

*Un grand merci à Madame Laachi Nadia de nous avoir guidées à travers ces discussions et ces précieux conseils.*

*Nous avons le plaisir d'exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Mademoiselle Nigri Soraya pour l'effort fourni, les conseils prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi de ce travail.*

*Nous ne pouvons pas oublier Melle Chreit Mouna pour son aide et ses encouragements. Nous disons: Merci Mouna.*

*Nos remerciements au Madame Nouara Prifa directrice du laboratoire LCCN et toute l'équipe du LCCN surtout Nassira.*

## Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*A ma fleur de mes espérances, la source de la tendresse à la plus personne, à Ma Mère, qui m'a toujours été d'un grand secours par son soutien et ses encouragements pendant les moments difficiles, qu'elle trouve ici le fruit de sa labeur et le témoignage de mon grand amour.*

*A celui qui a sert que donner l'espoir et le courage nécessaire pendant mon longtrajet d'étude, à Mon Père, je vous estime fort ainsi que je vous aime.*

*A chérie de mon cœur : Ma Tante Bariza.*

*A ma chère sœur Nabila et ma belle-sœur Yasmine Pour leurs amours et leurs encouragements.*

*A mes adorables frères Farid et Mourad.*

*A mes amies plus chères Soumia, Zeynek, Roufaïda, Lamia, Wafa Khawla, Bisma et Amira.*

*A ma chère amie mon linôme Razika.*

*Halima*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce travail :*

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

*A mon Père pour son soutien, sa gentillesse, son aide et sa  
confiance et surtout pour sa noblesse infinie.*

*A mes chères sœurs : Selma, Imene et Hawa.*

*A tous mes frères : Mouhamed et Abdou.*

*A mes amies plus chères Soumia, Zeyneb, Roufaida et  
Wahiba.*

*A mes chères Asma et Soumia.*

*A ma chère amie mon binôme Halima.*

*Razika*

# SOMMAIRE

	<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I</b>	<b>Docking moléculaire</b>	
<b>I</b>	Introduction	<b>2</b>
<b>II</b>	Docking	<b>2</b>
<b>III</b>	Outils de docking moléculaire	<b>3</b>
<b>1</b>	Récepteur	<b>3</b>
<b>2</b>	Ligand	<b>4</b>
<b>3</b>	Programme	<b>4</b>
<b>IV</b>	Principe du docking	<b>5</b>
<b>V</b>	Algorithmes	<b>5</b>
<b>1</b>	Méthodes systématiques	<b>6</b>
<b>2</b>	Méthode stochastique (génétique)	<b>6</b>
<b>3</b>	Méthodes de Simulation	<b>7</b>
<b>VI</b>	SCORING	<b>8</b>
<b>1</b>	Fonction de type knowledge-based	<b>8</b>
<b>2</b>	Fonction de score empirique	<b>8</b>
<b>3</b>	Fonction de score se basant sur les champs de force	<b>9</b>
<b>4</b>	Fonctions de score consensus	<b>9</b>
<b>Chapitre II</b>	<b>Voie de la Lipoxygénase</b>	
<b>I</b>	Généralité	<b>13</b>
<b>II</b>	Lipoxygénase	<b>13</b>
<b>1</b>	Définition	<b>13</b>
<b>2</b>	Propriétés	<b>14</b>
<b>3</b>	Nomenclature	<b>15</b>
<b>4</b>	Structure	<b>16</b>
<b>5</b>	Rôle	<b>18</b>
<b>6</b>	Mécanisme réactionnel	<b>19</b>
<b>6.1</b>	Mécanisme de la régiospécificité	<b>21</b>
<b>6.2</b>	Mécanisme de la stéréospécificité	<b>23</b>
<b>III</b>	Lipoxygénase de l'huile d'olive	<b>24</b>

I	Méthode de travail	28
II	Résultats et résultats	30
1	Tests de fiabilité du programme de docking	30
1.1	Test RMSD	30
1.2	Analyse visuelle	31
2	Mécanisme réactionnel d'oxydation de l'acide linoléique par docking	32
2.1	Docking du Ligand naturel	32
2.2	Oxydation de l'acide linoléique par docking	32
2.3	Interactions électrostatiques et hydrophobes	36
3	Inhibition	37
3.1	Alpha-tocophérol	38
3.2	Beta-tocophérol	38
3.3	Delta-tocophérol	39
3.4	Gama-tocophérol	40
3.5	Acétate d'alpha-tocophéryle	40
3.6	2 Phényl 1 chromanol	41
3.7	(-) - épigallocatechine gallate	41
3.8	Hydroxytyrosol	42
4	Affinités des ligands	42
	<b>Conclusion</b>	<b>45</b>
	<b>Annexes</b>	<b>46</b>

## Liste des figures

N°	Titre	Page
<b>Figure 1.1</b>	Positionnement optimal d'une molécule, dite ligand, dans le site actif d'une cible Biologique.	4
<b>Figure 1.2</b>	Principe générale d'un programme de docking.	5
<b>Figure 1.3</b>	Interaction protéine-ligand.	6
<b>Figure 1.4</b>	Méthodes automatisées de docking les plus connues et exemples d'algorithmes(en vert) fréquemment cités dans la littérature.	7
<b>Figure 1.5</b>	Fonctions de score les plus connues(en vert) et les exemples (en bleu) les plus fréquemment cités dans la littérature	10
<b>Figure 1.6</b>	Illustration de docking/scoring.	10
<b>Figure 2.1</b>	Conversion de l'acide linoléique en 13-hydroperoxide et 9-hydroperoxide par la lipoxygénase.	14
<b>Figure 2.2</b>	Régiospécificité réactionnelle des lipoxygénases végétales et animales.	15
<b>Figure 2.3</b>	Structure tridimensionnelle de la LOX1 de soja (code PDB : 1F8N).	17
<b>Figure 2.4</b>	Cavités internes de la LOX1de soja.	18
<b>Figure 2.5</b>	Représentation schématique du complexe de coordination de l'atome de fer non héminique (A) et ligands autour de l'atome de fer des lipoxygénases(B).	18
<b>Figure 2.6</b>	Schéma du mécanisme réactionnel de Lipoxygénase.	20
<b>Figure 2.7</b>	Oxydation de l'atome de fer de la lipoxygénase au cours de la réaction catalytique.	21
<b>Figure 2.8</b>	Modèle de l'orientation dépendance.	22
<b>Figure 2.9</b>	Modèle de l'espace de liaison.	24

<b>Figure 2.10</b>	Mécanisme de la stéréospécificité des LOX.	24
<b>Figure 3.1</b>	Visualisation de la protéine 4RPE.	29
<b>Figure 3.2</b>	Résultats du test RMSD	30
<b>Figure 3.3</b>	Visualisation des différents résultats RMSD.	31
<b>Figure 3.4</b>	Mode d'interaction du ligand naturel avec le site actif.	32
<b>Figure 3.5</b>	Mode d'interaction LOX - acide linoléique.	33
<b>Figure 3.6</b>	Mode d'interaction du ligand avec le site actif. (a) : L'abstraction de H <sub>1</sub> , (b) :L'abstraction de H <sub>2</sub>	33
<b>Figure 3.7</b>	Mode d'interaction du ligand avec le site actif. (a) : réarrangement du radical allylique (n+2), (b) : réarrangement du radical allylique (n-2).	34
<b>Figure 3.8</b>	Mode d'interaction du ligand avec le site actif. (a) : Insertion de l'oxygène sur le carbone 9, (b) : Insertion de l'oxygène sur le carbone 13.	34
<b>Figure 3.9</b>	Mode d'interaction du ligand avec le site actif, (a) ; La formation d'un groupe hydroperoxyde sur le C <sub>9</sub> , (b) : La formation d'un groupe hydroperoxyde sur le C <sub>13</sub> ,	35
<b>Figure 3.10</b>	Interactions électrostatiques moyennes LOX-ligand.	36
<b>Figure 3.11</b>	Visualisation des interactions hydrophobiques.	37
<b>Figure 3.12</b>	Mode d'interaction LOX- $\alpha$ -tocophérol	38
<b>Figure 3.13</b>	Mode d'interaction LOX- $\beta$ -tocophérol.	39
<b>Figure 3.14</b>	Mode d'interaction LOX- $\delta$ -tocophérol.	39
<b>Figure 3.15</b>	Mode d'interaction LOX- $\gamma$ -tocophérol.	40
<b>Figure 3.16</b>	Mode d'interaction de LOX- Acétate d'alpha-tocophéryle.	41
<b>Figure 3.17</b>	Mode d'interaction LOX-2-Phenyl-4-chromanol.	41
<b>Figure 3.18</b>	Mode d'interaction LOX-(-) - épigallocatechine gallate.	42
<b>Figure 3.19</b>	Mode d'interaction LOX- Hydrohytyrosol.	42

### Liste des tableaux

<b>Tableau 3.1</b>	RMSD de quelques complexes protéine-ligand.	31
<b>Tableau 3.2</b>	Classement des résultats de docking.	43

## Liste des Abréviations

**3D** : tridimensionnelle

**AA** : Acide arachidonique

**ADH** : Alcool déshydrogénase

**ALA** : Alanine

**ARG** : Arginine

**ASP** : Acide Aspartique

**GLN** : Glutamine

**GLU** : Acide Glutamique

**GLY** : Glycine

**HPETE** : Acide hydroperoxyeicosatétraénoïque

**HPL** :hydroperoxyde lyase

**HPOD** :hydroperoxyoctadécadiénoïque

**kDa** :kilodalton

**K<sub>m</sub>** : constant caractérisant une réaction enzymatique

**LEU** : Leucine

**LOX** :Lipoxygenase

**PDB** :Protein Data Bank

**PHE** : Phénylalanine

**PLAT** : Polycystin-1, Lipoxygenase,  $\alpha$ -toxin

**PMF** :Potential of Mean Force

**RMN** :Résonance magnétique nucléaire

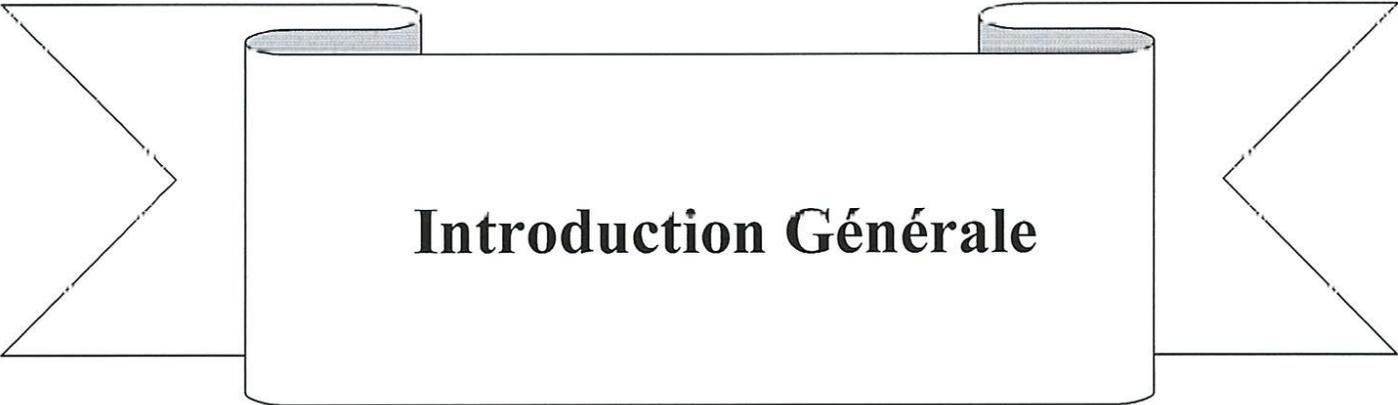
**RX** : Rayons x

**THR** : Thréonine

**TYR** : Tyrosine

**VAL** : Valine

**VDW** :Van Der Waals



**Introduction Générale**

## **Introduction générale**

Les interactions entre protéine-protéine et protéine-ligand sont à la base des mécanismes biologiques. Comprendre ses modes de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, sont donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre deux molécules. De même, la découverte de nouvelles molécules activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respectivement. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupé sous le nom de « amarrage » ou « docking » moléculaire ont été développées.

Le Docking moléculaire présente l'une des approches théoriques les plus utilisées. Il vise à prédire la structure d'un complexe protéine-ligand pour prévoir les modes d'interactions possibles. Ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales (RX, RMN ...etc.).

Les lipoxycgénases (LOXs) sont des enzymes très répandues aussi bien dans le règne animal que végétal. Les LOXs sont responsables de l'arôme de plusieurs produits de plantes telles que l'huile d'olive. Elles interviennent dans la catalyse des acides gras polyinsaturés selon un mécanisme complexe connu sous le nom de voie de LOX.

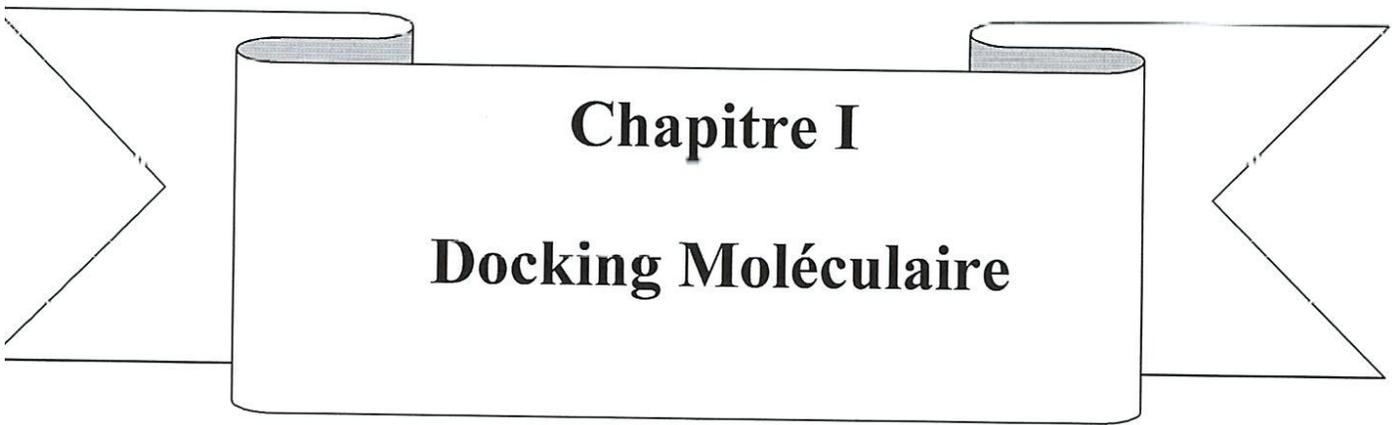
L'objectif de cette étude est d'étudier le mécanisme réactionnel de l'oxydation de l'acide linoléique par les méthodes de docking moléculaire et d'inhiber lipoxycgénase.

Le manuscrit se divise 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 lipoxycgénases végétales et animales et le mécanisme de la voie de la LOX.

**Le dernier chapitre :** contient les principaux résultats obtenus au cours de ce travail suivi par une conclusion générale.



# **Chapitre I**

## **Docking Moléculaire**

## **I. Introduction**

Les interactions entre molécules sont à la base des mécanismes biologiques. Les détails de ces interactions, au niveau moléculaire sont d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par RMN, la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X. Cette dernière technique est responsable de la majorité des structures issues d'une base de données de structures accessibles gratuitement appelée la «Protein Data Bank» (PDB) [1].

La recherche en biologie ne peut, actuellement, se passer des outils informatiques pour traiter le flot de données produites et optimiser ses avancées. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo-saxon "docking"). L'emploi initial du "docking moléculaire" a été de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand [2,3].

Les succès dans ce domaine et l'essor des techniques de chimie combinatoire ainsi que l'exploitation systématique de la diversité chimique provenant d'autres cibles ont élargi son utilisation à l'optimisation de molécules et au criblage de bases de données.

Comprendre comment un ligand s'attache ou interagit avec une cible protéique afin de l'inhiber ou l'activer est d'une importance capitale dans la recherche et l'industrie pharmaceutique.

## **II. Docking**

Le docking ou «*amarrage, arrimage*» est un procédé très utile qui vise à prédire l'interaction potentiel de la structure d'un complexe moléculaire à partir des petites molécules dans les sites de liaison de protéine afin d'accélérer la recherche et la découverte de nouveaux médicaments *in-silico*. Plus précisément, le docking consiste à trouver la meilleure position d'un ligand (petite molécule) dans le site de liaison d'un récepteur (protéine) de façon à optimiser les interactions avec un récepteur, évaluer les interactions ligand-protéine de façon à pouvoir discriminer entre les positionnement observées expérimentalement et les autres.

De façon générale, le docking a pour but de simuler l'interaction entre les molécules *in-silico*, et les résultats obtenus servent à prédire la structure et les propriétés de nouveaux complexes [4].

Les interactions moléculaires sont contrôlées par différentes forces dont les principales forces impliquées sont les interactions Van Der Waals, hydrophobes, les liaisons hydrogène et les forces électrostatiques.

### ➤ **Approches du docking**

Les différentes approches du docking se distinguent au niveau de leurs conditions d'application et de la nature des informations qu'elles peuvent fournir. La pertinence du choix d'un programme de docking donné repose en premier lieu sur l'adéquation entre ces caractéristiques et celles du système étudié. L'efficacité de l'algorithme choisi sera par ailleurs un compromis entre la rapidité d'exécution et la précision des résultats.

Aussi en fonction du but recherché et du besoin de précision voulu, trois degrés sont en général considérés :

- rigide (les molécules sont considérées comme rigides),
- semi-flexible (une molécule rigide et l'autre flexible),
- flexible (les deux molécules flexibles).

Le niveau semi-flexible est souvent appliqué dans le cas protéine-ligand où une des deux molécules de taille moindre (le ligand) est considérée comme flexible et la protéine comme rigide de façon à ne pas trop complexifier le système [5].

## **III. Outils de docking**

### **1. Récepteur**

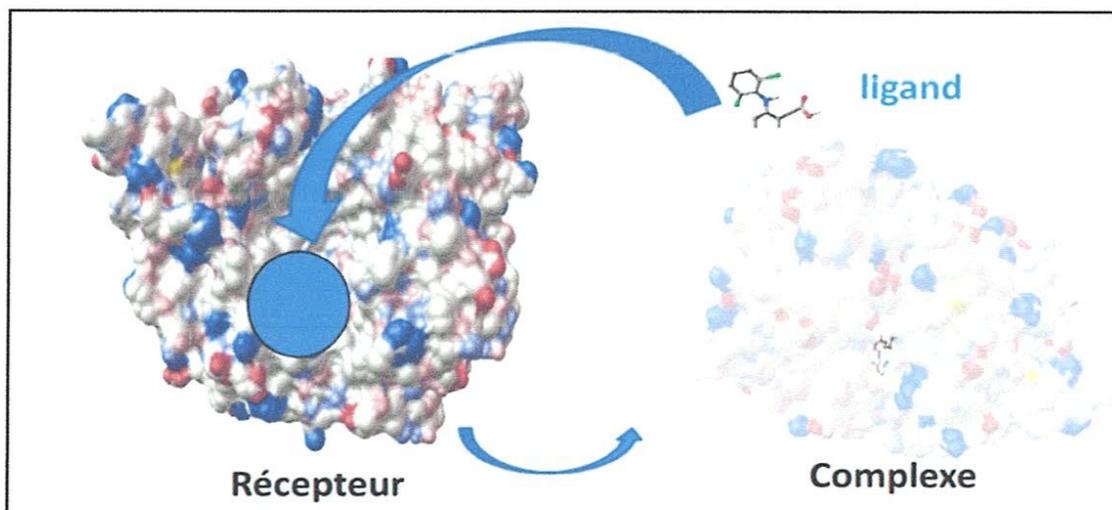
Un récepteur est un organe, une cellule ou une molécule qui assure la réception d'information. Dans le cas d'une molécule, le récepteur est une protéine spécialisée capable de se lier spécifiquement et réversiblement à une autre molécule appelée ligand.

La première grande voie d'étude et de conception des molécules bioactives par modélisation moléculaire est celle qui se fonde sur la structure des récepteurs. Cette approche est basée sur l'exploitation de la structure moléculaire tridimensionnelle de la protéine cible.

## 2. Ligand

Un ligand est une molécule chimique sous forme 3D, qui pourrait être composée d'un ou de plusieurs fragments (groupements). Il peut être : un substrat, coenzyme, activateur et inhibiteur [3].

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 [4].



**Figure 1.1** : Positionnement optimal d'une molécule, dite ligand, dans le site actif d'une cible biologique.

## 3. Programme

Un logiciel est un ensemble de programmes qui permet à un ordinateur ou à un système informatique d'assurer une tâche ou une fonction en particulier, procédés et règles, et éventuellement de la documentation, relatifs au fonctionnement d'un ensemble de traitement de données (Par opposition au matériel).

Un programme de docking moléculaire a pour but de prédire correctement le mode d'interaction entre deux entités chimiques, et de reconnaître parmi ceux-ci lequel est le meilleur.

Classiquement, on juge de la qualité du docking en mesurant le RMSD (Root Mean Square Deviation) sur les atomes lourds entre la pose obtenue en docking, et la pose observée expérimentalement si elle existe [6].

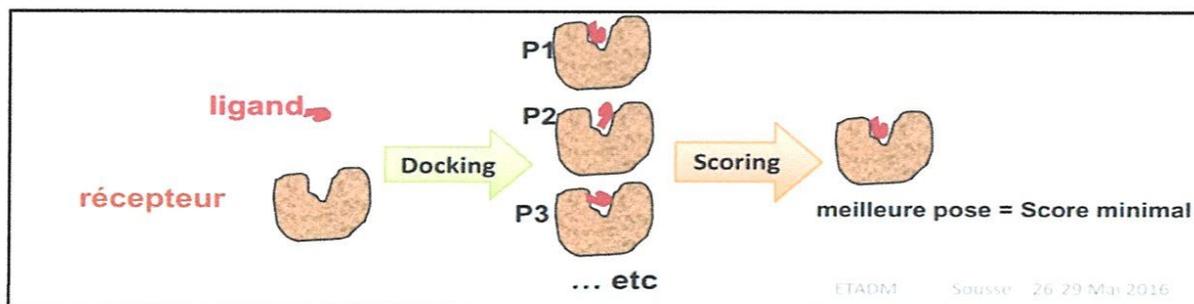
La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate [7,8].

A l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles [9]. Par exemple : *AutoDock* [10], *GOLD* [11], *FlexX* [12], *DOCK* [13] et *ICM* [14].

#### IV. Principe du docking

Le docking moléculaire s'accomplit en deux étapes complémentaires. La première est le *Docking*, qui consiste à rechercher les conformations du ligand capables à établir des interactions idéales avec le récepteur en utilisant des algorithmes de recherche.

La deuxième dite «*Scoring*», qui sont des méthodes mathématiques et des fonctions discriminant les poses de docking correctes de celles incorrectes. Ces méthodes sont utilisées pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison et qui permet d'évaluer les conformations par un calcul rapide d'énergie d'interaction des ligands avec un récepteur pour ne retenir que la meilleure.



**Figure 1.2:** Principe générale d'un programme de docking

#### V. Algorithmes

Un algorithme est une méthode utilisée pour résoudre un problème particulier dont on est sûr qu'elle trouve toujours une réponse en un temps d'exécution fini [15].

Ils ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association récepteur-ligand les plus favorables.

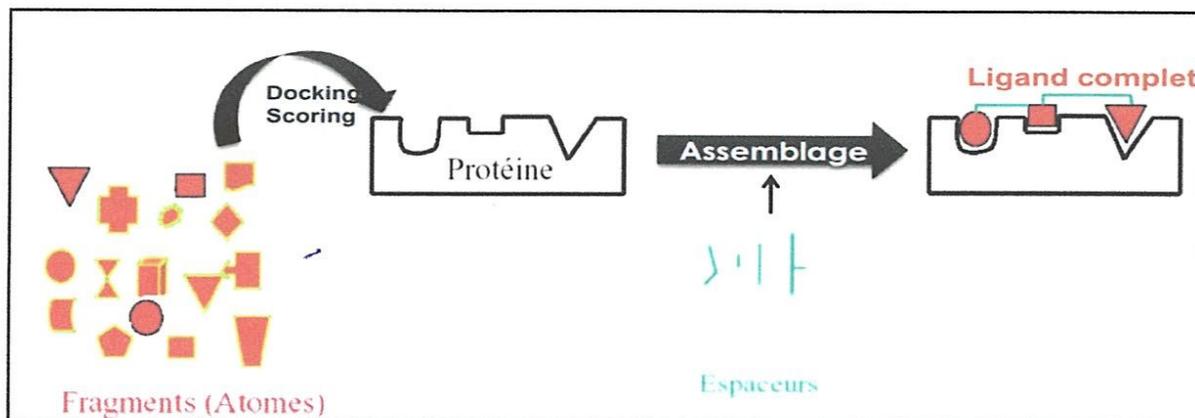
La prédiction de la conformation du ligand dans le site actif de la protéine est le plus grand défi du design des drogues basé sur la structure. Le rôle des algorithmes de docking désignés à exécuter cette tâche est divisé en deux parties essentielles :

- Trouver toutes les conformations, translations, rotations du ligand dans le site actif de la protéine en un temps d'exécution très petit.
- Calculer l'énergie utilisée pour évaluer les interactions entre la protéine et le ligand, et classer les solutions [16-19].

Donc le défi est de trouver une fonction qui peut incorporer toutes les contributions de l'attachement. Dans ce domaine plusieurs méthodes ont été développées. Parmi ces méthodes :

### 1 .Méthodes systématiques

Le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. 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 [20]. Des programmes comme *FlexX*, *Surflex* et *Dock* utilisent cette approche qui permet notamment un criblage rapide de vastes chimiothèques de molécules [21].



**Figure1.3:** Interaction protéine-ligand.

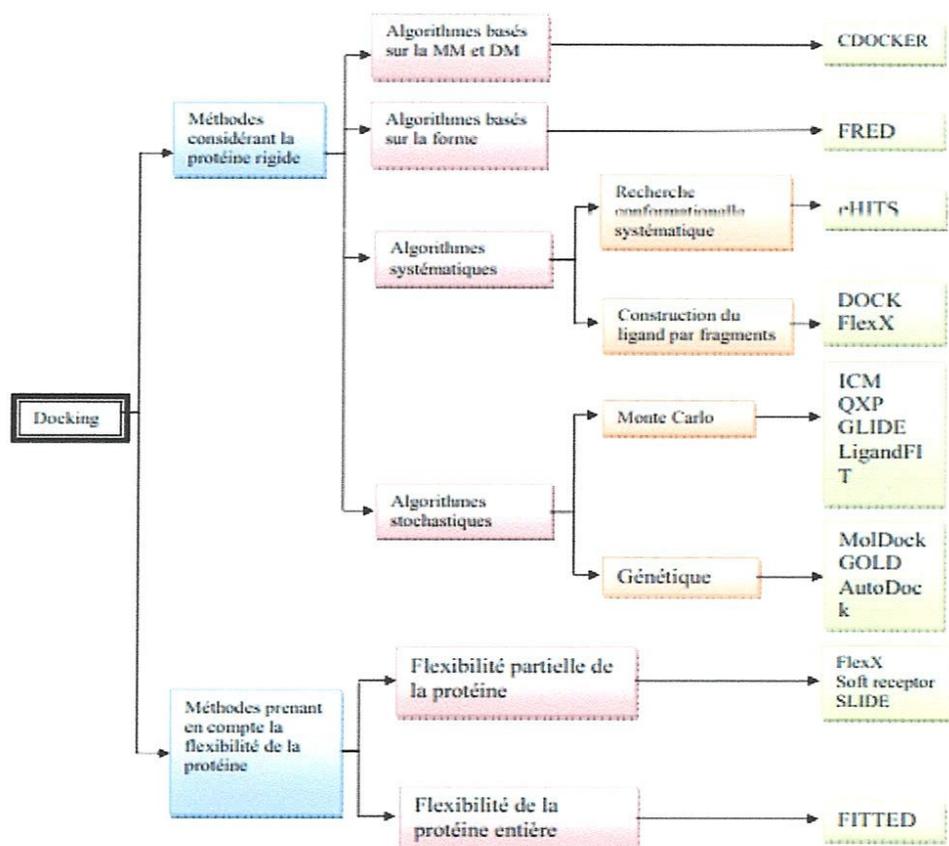
### 2. Méthode stochastique (génétique)

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 de régions plus vastes. Dans cette catégorie, nous pouvons citer *GOLD* et *Auto Dock* [22].

### 3. Méthodes 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].



**Figure 1.4:** Méthodes automatisées de docking les plus connues et exemples d'algorithmes(en vert) fréquemment cités dans la littérature [23].

## **VI .SCORING**

Le score est une méthode mathématique utilisée pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison entre deux molécules après avoir été passé par l'étape de docking.

Les fonctions de score sont basées sur le modèle qui inclue toutes les propriétés physico chimiques de l'interaction protéine-ligand et les convertit en termes calculables pour trouver la constante d'affinité du complexe protéine–ligand (la structure du complexe 3D étant connue).

Les fonctions de score peuvent être divisées en quatre classes [24]:

- les fonctions basées sur des champs de force,
- les fonctions empiriques,
- les fonctions <<knowledge-based>>,
- Fonctions de score consensus.

### **1. Fonctions de type knowledge-based**

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes ligand-protéine déterminés de manière expérimentale. Elles ont pour objectif 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. Cette alternative aux fonctions empiriques est plus tolérante quant aux interactions présentes au sein du complexe. Leurs expressions sont moins strictes que dans le cas des fonctions de score empiriques.

En effet, l'analyse statistique de complexes de structure connue qui permet de calculer la fréquence afin d'en extraire des potentiels de force moyenne (PMF ou Potential of MeanForce). Elles sont utilisés dans: *DrugScore*, *ITScore*, *PMF* et *LigScore* [25].

### **2. Fonctions de score empirique**

Ces fonctions de score sont calculées rapidement en raison de la simplicité des termes d'énergie. L'idée fondamentale des fonctions de score empiriques est que l'énergie d'interaction d'un complexe récepteur ligand peut être interprétée comme une sommation d'interactions chimiques localisées [26]. Ces fonctions empiriques contiennent usuellement des termes décrivant les interactions ioniques, interactions hydrophobiques, liaison hydrogène et les

interactions engendrées par le changement d'entropie (pénalité d'entropie). Elles sont utilisées dans la plupart des algorithmes de docking notamment : *Score*, *Xscore*, *F-Score* et *ChemScore*.

### **3. Fonctions de score se basant sur les champs de force**

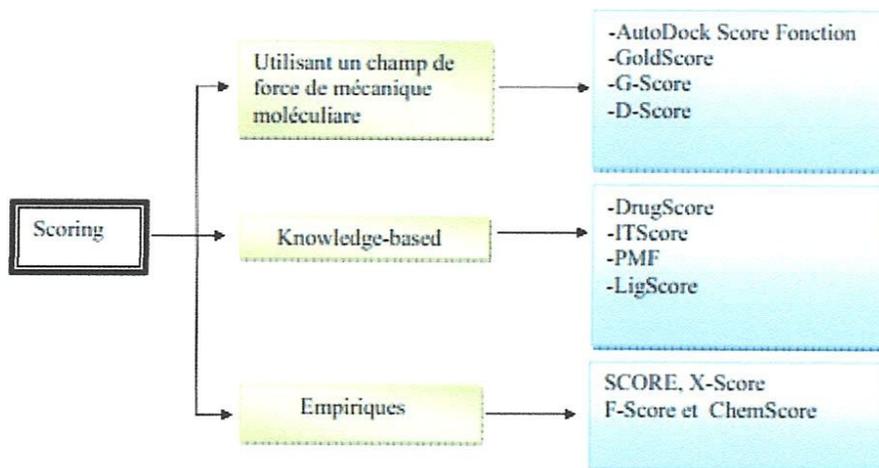
Ce type de fonctions de score est similaire aux fonctions de score empiriques du fait qu'elles estiment l'énergie libre d'interaction d'un complexe récepteur-ligand par addition de plusieurs contributions individuelles des différents types d'interactions.

La fonction de score « Champ de force » utilise des fonctions d'énergie dérivées de la mécanique moléculaire [26] et en général, quantifie cette somme en deux termes, l'énergie d'interactions entre le récepteur et le ligand (interactions intermoléculaires : Van der Waals et électrostatique) et l'énergie interne du ligand.

Les fonctions de score qui se basent sur les champs de force sont par exemple : *AutoDock Score Fonction*, *GoldScore*, *G-Score* et *D-Score*.

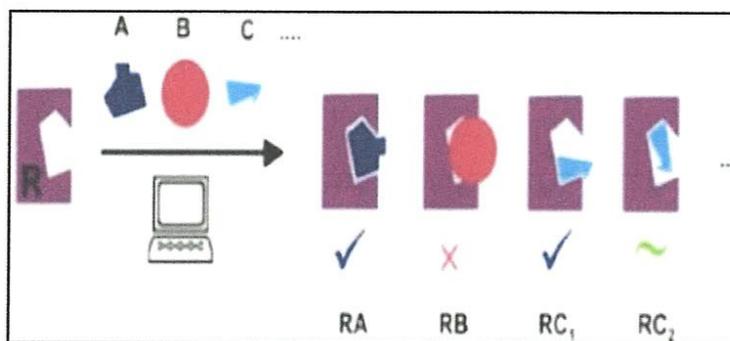
### **4. Fonctions de score consensus**

Les fonctions de score consensus [27, 28], combinent les informations obtenues à partir des différents score, afin de compenser les erreurs des fonctions de score individuelles. Plusieurs études ont montré que ces fonctions performant le calcul des énergies libres des complexes et ainsi les interactions protéine - ligand mieux que les fonctions individuelles [29, 30]. Un exemple de fonction de score consensus est *X-CSCORE* [31] qui combine un *PMF* [32-34], et *ChemScore* [35].



**Figure 1.5:** Fonctions de score les plus connues (en vert) et les exemples(en bleu) les plus fréquemment cités dans la littérature [23].

Le docking peut être interprété de manière qualitative par observation de l'entité ligand dans la cavité de la protéine, mais également de manière quantitative par traitement des données provenant des fonctions de scoring.



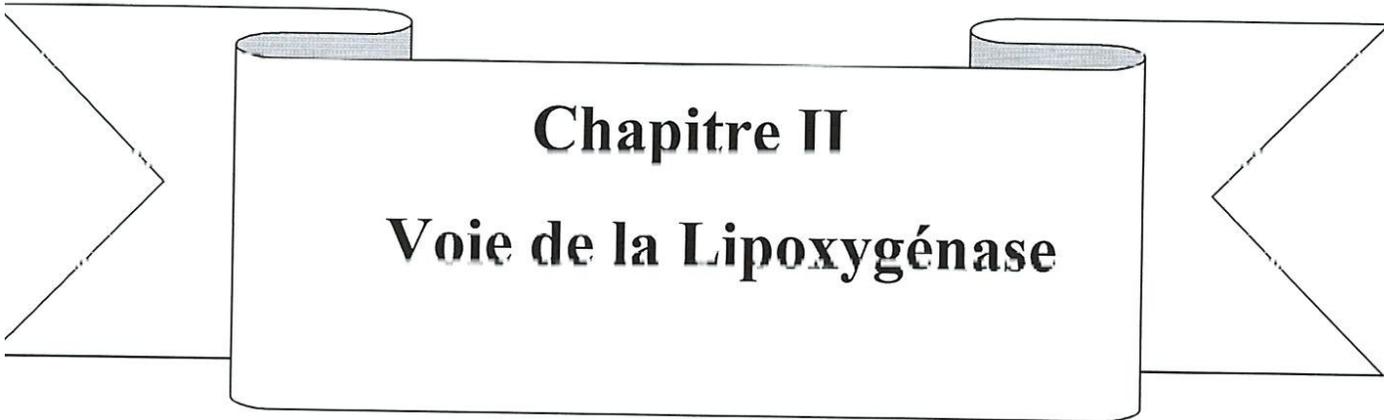
**Figure 1.6 :** Illustration de docking/scoring.

Le processus de docking est l'un des premières étapes dans la conception de médicaments, pour attacher un ligand à une protéine (docking) le problème est de prédire la conformation et l'orientation du ligand relative au site actif de la protéine cible. Le docking est la base de la reconnaissance moléculaire et du type de l'interaction. À chaque protéine cible de structure connue le docking se révèle être la clé dans le design de nouveaux médicaments.

## REFERENCES

- 1- Krid. A., Thèse de magister. Université Mentouri. Constantine. Algérie. (2008).
- 2- Levinthal. C., Wodak . S.J., Kahn. P., Dadvanian. A.K. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States. (1975), vol 72. p1330–34.
- 3- Kuntz. I.D., Blaney. J.M., Oatley. S.J., Langridge. R., Ferrin. T.E. Journal of Molecular Biology. (1982), vol 161. p 269–88.
- 4- Mokrani. E., Thèse de magister. Université Mentouri. Algérie. (2012).
- 5- Fortuné. A., Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier .France. (2006). p168.
- 6- Sousa. S.F., Fernandes. P.A., Ramos. M.J. Proteins. (2006), vol 65. p 15-26.
- 7- Vieth. M., Hirst. J.D., Kolinski. A., Brooks. C.L. Journal of Computational Chemistry. (1998), vol 19., 161 2-1622.
- 8- Gabb.J., Jackson. R.M., Sternberg. M.J.E. Journal of Molecular Biology. (1997), vol272 . p 106–120.
- 9- Grosdidier,A.,Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier. France. (2007). p90.
- 10- Morris.G. M., Goodsell.D.S.,Halliday. R. S., Huey.R., Lindstrom. W., Hart. W. E., et al. Journal of Computational Chemistry. ( 1998), vol 19. p1639-1662.
- 11- Jones. G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Journal of Molecular Biology. (1997), vol 267 .p727-48
- 12- Rarey. M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. A. Journal of Molecular Biology. (1996),vol 261.p 470-489.
- 13- Ewing.T. J., Makino S., Skillman A. G., Kuntz I.D. Journal of Computer-Aided Molecular. (2001), vol 15.p 411-428.
- 14- Abagyan. R., Totrov. M. Journal of Molecular Biology. (1994), vol 235.p 983-1002.
- 15- Asses.Y., Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré. France. (2011). p 137.
- 16- Sharp. K.A., Honig. B. Journal of Biophysical Chemistry (1990), vol 19.p301-332.
- 17- Williams. D.H ., Cox. J.P.L., Doig. A. J., Gardner M., Gerhard U., Kaye. P.T., Lai. A.R., Nicholls. I.A., Salter. C.J., Mitchell. R.C. Journal of the American Chemical Society. (1991), vol 113. p7020-7030.
- 18- Trovov. M., Abagyan. R. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, (1997), vol 1 p 215-220.
- 19- Kramer.B., Rarey. M., Lengauer. T. Proteins Supplement. (1997), vol 1. p 221-225.

- 20- Bouchrit,H., Thèse de magister université Mentouri. Algérie. ( 2012). p70.
- 21- Bessadok, M.A., Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie. France (2011). p189.
- 22- Brut, M., Thèse de doctorat. Université pierre et marie curie France. (2009). p123.
- 23- De Oliveira. E., B., Thèse de doctorat. Université Lorraine. France. (2009). p187.
- 24- ELKAIM, J ., Thèse de doctorat. Université Bordeaux. France. (2011).p134.
- 25- Alban, A., Thèse de doctorat. Université Orléans. France. (2008).p 30
- 26- Kitchen. D.B.,Decornez, H.,Furr .J.R., Bajorath. J. Nature reviews Drug discovery. (2004) ., vol 3. p 935-949.
- 27- Halperin .I ., Ma.B., Wolfson.H., Nussinov.R. Journal of Proteins . (2002).,vol 47. p 409-443.
- 28- Charifson.P.S., Corkery. J.J., Murcko. M.A., Walters .W.P. Journal of Medicinal Chemistry. (1999).,vol42 . p 5100-5109.
- 29- Bissantz. C., Folkers. G.,Rognan. D. Journal of Medicinal Chemistry. (2000)., vol43 p 4759-4767.
- 30- Terp. G.E., Johansen. B.N., Christensen. I.T., Jørgensen.F.S . Journal of Medicinal Chemistry (2001).,vol44 p 2333-2343.
- 31- Wang.R.X., Lai.L.H., Wang. Journal of Computer-Aided Molecular Design. (2002)., vol16.p11-26.
- 32- Muegge.I . Journal of Medicinal Chemistry. (2006).,vol 49 p5895-5902.
- 33- Muegge. I., Martin.Y.C . Journal of Medicinal Chemistry. (1999) ., vol 42 p791-804.
- 34- Muegge. I. Journal of Computational Chemistry. (2001).,vol22. p 418-425.
- 35- Eldridge.M.D., Murray.C.W.,Auton.T.R., Paolini.G.V., Mee.R.P. Journal of Computer-Aided Molecular Design. (1997).,vol 11. p 425-445.



**Chapitre II**  
**Voie de la Lipoxygénase**

## **I. Généralités**

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 lipoxygénase (LOX), l'hydroperoxyde lyase (HPL) et l'alcool déshydrogénase (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.

## **II. lipoxygénase**

### **1. Définition**

Lipoxygénases (LOX ; CE 1.13.11.) sont constituées d'une famille structurellement apparentée à dioxygénases contenant du fer non hémique qui catalysent l'addition d'oxygène moléculaire en acide gras poly-insaturés avec un (z, z)-1,4-pentadiène structurel l'unité pour donner un hydroperoxyde d'acide gras insaturé [6].

Les enzymes sont très répandues chez les plantes et les animaux [7], Mais elles sont également observées dans des algues et des champignons [8]. Elles catalysent la première réaction de la voie de la lipoxygénase [9].

Les LOXs ont été analysées avec plus de détail dans les fruits et les feuilles de cotylédons. Plusieurs isoformes de LOX ont été identifiées dans le cytosol et la vacuole des feuilles de soja [10], mais aussi dans différents compartiments membranaires comme les chloroplastes et le plasma [7].

En effet, il a été rapporté que la lipoxygénase peut être sous forme soluble [11] ou liée à la membrane comme chez l'épinard, l'orge, la tomate, la pomme de terre, Arabidopsis [10] ou les olives [12].

On trouve bien évidemment les substrats décrits pour les lipoxygénases végétales. Mais au niveau de la cellule animale, c'est l'acide arachidonique qui consiste le substrat essentiel des lipoxygénases.

## 2. Propriétés

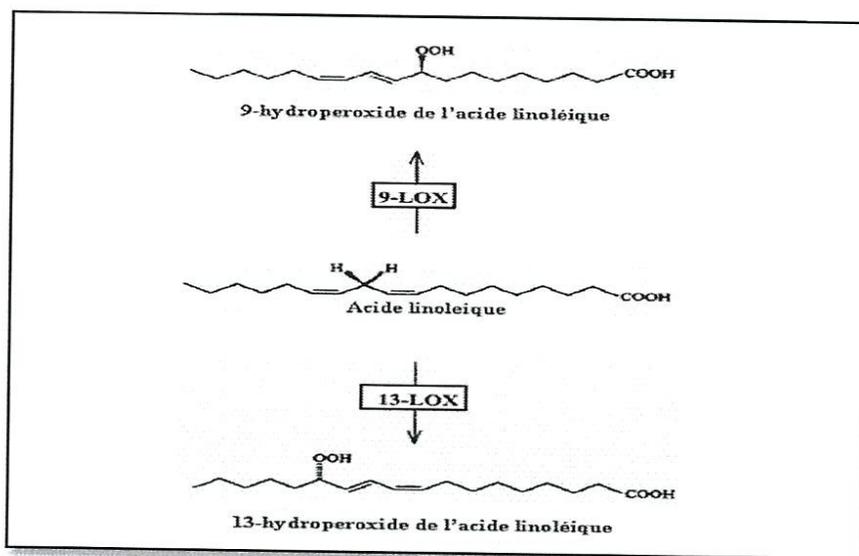
Les lipoxygénases (LOX, EC 1.13.11.12) sont des dioxygénases à atome de fer non héminique largement représentées dans le règne animal et végétal [13]. La température optimale de la lipoxygénase varie entre 30°C et 40°C [9]. La lipoxygénase est considérablement labile à des températures supérieures à 35° [14].

**Les LOXs végétales** sont des protéines d'environ 95 kDa, qui comptent approximativement 840 résidus. Ses pH optimum sont compris entre 5.5 et 9 [15]. Elles présentent environ 70 à 95 % d'identité de séquence en acides aminés.

**Les LOXs animales** sont plus petites, elles possèdent environ 670 acides aminés, pour une masse moléculaire de 75 à 80 kDa [16]. Elles présentent environ 25% d'identité de séquence en acides aminés.

Au sein de la voie de la LOX, elles catalysent au moins trois types de réactions :

- La dioxygénation de lipides (activité dioxygénase) (figure 2.1).
- La conversion secondaire des hydroperoxides.
- La formation d'époxy-leucotriènes (activité leucotriène synthétase) [17].

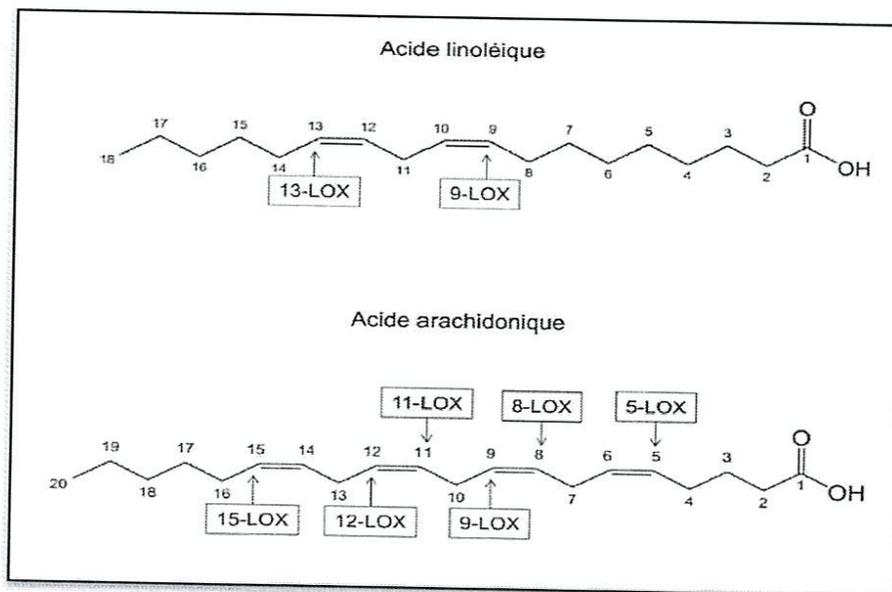


**Figure 2.1:** Conversion de l'acide linoléique en 13-hydroperoxyde et 9-hydroperoxyde par la lipoxygénase.

### 3. Nomenclature

Plusieurs nomenclatures ont été proposées pour classer les LOXs. La première a été proposée dans les années 1980 [18], classant les lipoxygénases en fonction de leur pH optimum : les LOXs de type 1 (LOX-1) ont un pH optimum alcalin, les LOXs de type 2 (LOX-2) ont un pH optimum neutre. Une seconde classification proposée par Shibata et al. (1994) se base sur leur localisation intracellulaire: les LOXs ne possédant pas de peptide d'adressage chloroplastique à leur extrémité N-terminale, et ayant un fort taux d'identité entre elles (supérieur à 75%) sont appelées LOX-1, les LOXs possédant un peptide d'adressage chloroplastique à leur extrémité N-terminale sont appelées LOX-2. Ces dernières présentent un faible taux d'identité entre elles (inférieur à 35%).

Une autre nomenclature très utilisée est basée sur leur spécificité réactionnelle dans la production d'acides gras oxydés. Les LOXs végétales sont ainsi classées en fonction de la position du carbone de l'acide linoléique qui porte le groupement hydroperoxy de (Figure 2.2), 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 13hydroperoxyoctadécadiénoïque, respectivement 9-HPOD et 13-HPOD [19]).



**Figure 2.2** : Régiospécificité réactionnelle des lipoxygénases végétales et animales.

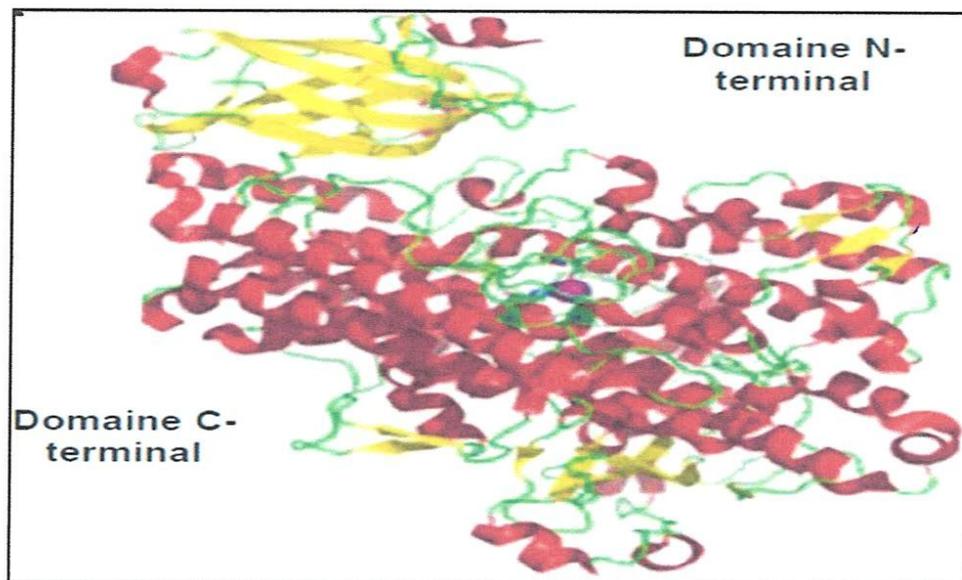
En ce qui concerne les LOXs animales, cette classification s'appuie de la même manière sur la position d'oxygénation préférentielle de l'acide arachidonique, qui peut être le carbone 5, 8, 9, 11, 12 ou 15, et donnant respectivement les 5-LOX, 8-LOX, 9-LOX, 11-LOX, 12-LOX et 15-LOX [20]. Les hydroperoxydes ainsi formés seront appelés acide n-hydroperoxyeicosatétraénoïque, la valeur n correspondant à la spécificité de la LOX, c'est-à-dire 5, 8, 9, 11, 12 ou 15 (5-HPETE, 8-HPETE, 9-HPETE, 11-HPETE, 12-HPETE ou 15-HPETE).

Outre cette régiospécificité, la nomenclature fait parfois apparaître la notion de stéréospécificité dans le nom donné aux LOXs [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 LOXs animales agissant sur l'acide arachidonique.

La dernière nomenclature proposée [22], et actuellement la plus utilisée, permet de pallier ce problème : si le rapport 13-hydroperoxyde: 9-hydroperoxyde est supérieur à 10:1 ou inférieur à 1:10, les lipoxygénases sont appelées 13-LOX ou 9-LOX, respectivement. Si ce rapport est compris entre 10:1 et 1:1 ou entre 1:1 et 1:10, elles sont appelées respectivement 13/9-LOX ou 9/13-LOX, le premier chiffre rendant compte du produit majoritairement formé.

#### **4 .Structure**

Actuellement, les structures de LOXs résolues sont accessibles dans la banque de données PDB. Malgré la faible similarité de séquence entre les LOXs végétales et les LOXs animales (environ 10%), elles possèdent une structure tridimensionnelle semblable caractérisée par deux domaines distincts : un domaine N-terminal et un domaine C-terminale. (Figure 2.3) [23].



**Figure 2.3 :** Structure tridimensionnelle de la LOX1 de soja (code PDB : 1F8N).

### **Domaine N-terminal**

Le domaine N-terminal est constitué de deux couches de 4 feuillets  $\beta$  antiparallèles (domaine -sandwich). Il est compact et séparé du reste de la protéine. Il présente 23 % d'identité de séquence en acides aminés avec celui-ci, contre 11% avec celui des LOXs végétales [23].

Il jouerait un rôle dans l'interaction de la protéine avec les membranes lipidiques [24]. Remarquons que ce domaine en  $\beta$ -sandwich est un des membres définissant la famille de domaines PLAT (pour Polycystin-1, Lipoxygenase,  $\alpha$ -Toxin) [25].

### **Domaine C-terminal**

Le domaine C-terminal est principalement formé d'hélices (18 chez la 15-LOX et 23 chez la LOX-1) et contient l'atome de fer non hémique, 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  $\pi$ . 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 [26]. (Figure 2.4).

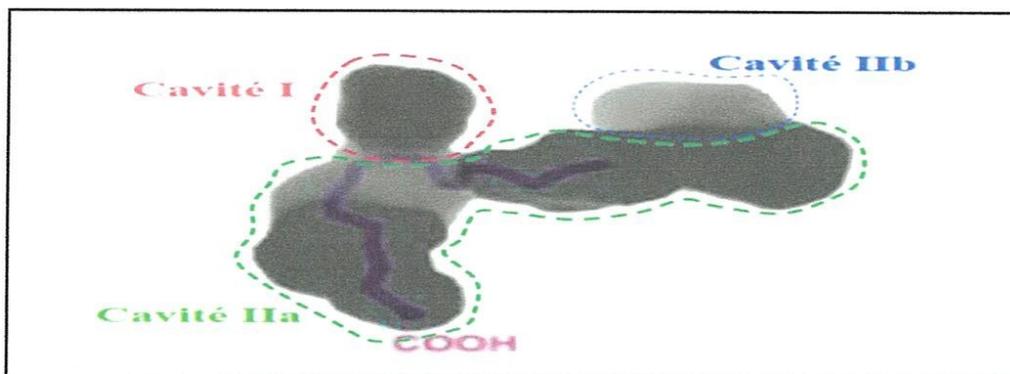


Figure 2.4: Cavités internes de la LOX1 de soja.

### a. Centre catalytique

Le centre catalytique des LOXs comporte un atome de fer non hémunique. Cet atome de fer existe sous les formes ferreuse et ferrique, et seule la forme ferrique permet à la réaction enzymatique de se produire [27]. Le fer forme un complexe de coordination présentant une géométrie octaédrique. Une des faces de l'octaèdre est occupée par deux histidines et un groupement carboxylate (triade faciale) [28] (Figures 2.5).

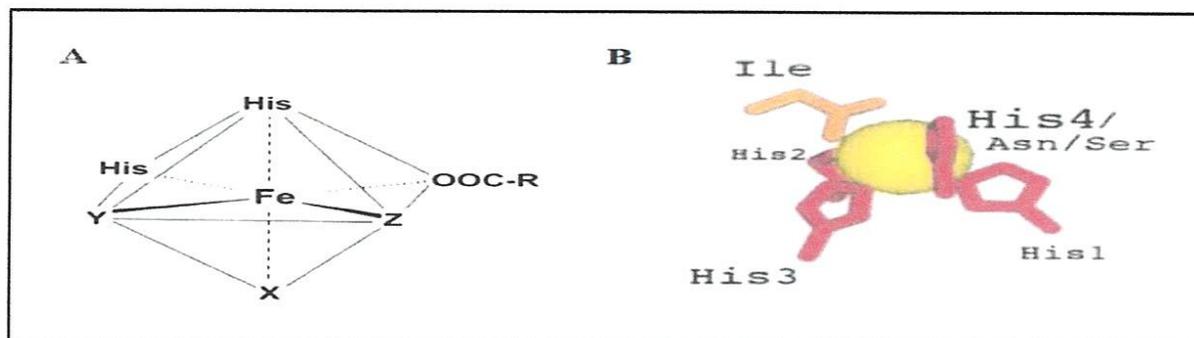


Figure 2.5 : Représentation schématique du complexe de coordination de l'atome de fer non hémunique (A) et ligands autour de l'atome de fer des lipoxygénases (B).

## 5. 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 [10] pour produire les hydroperoxydes correspondants [9].

Ces composés sont très réactifs et toxiques pour les cellules [29], ils constituent le point de départ pour plusieurs réactions qui forment une variété de composés à courte chaîne

carbonylée, qui incluent les aldéhydes, les cétones, les acides et les époxydes (groupe constitué par deux atomes de carbone qui relie un atome d'oxygène) [9].

En plus, les LOXs participent à la synthèse de plusieurs composés comme le traumatin, l'acide abscissique, l'acide jasmonique et les oxylipines, qui jouent un rôle important dans la transduction du signal durant la réponse aux blessures et contre les substances antimicrobiennes dans l'interaction hôte-pathogène, et enfin comme régulateur de croissance dans les fruits [9].

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 [30]. Dans certains cas, les LOXs contribuent aussi au développement d'odeurs indésirables par oxydation des matières grasses [31] et le changement de la couleur [9] par oxydation des pigments [31].

Les LOXs de plantes ont été associées à des processus physiologiques variés sur la base d'une expression différente des gènes.

Cette diversité dans les fonctions biologiques pourrait être assurée par la présence de différentes isoenzymes, présentant des mécanismes de régulation ainsi que des localisations tissulaires et subcellulaires très variées, selon les espèces et les isoformes considérés [32].

## **6. Mécanisme réactionnel**

Actuellement, le mécanisme détaillé de la réaction de lipoxygénation est toujours l'objet de controverses. Sa nature radicalaire ne fait toutefois pas de doute. La réaction se déroulerait en trois étapes consécutives (Figure 2.6) [33] [34].

- **Etape 1** : abstraction stéréosélective d'un atome d'hydrogène d'un groupe méthylène bis-allylique pour conduire au radical pentadiényle.

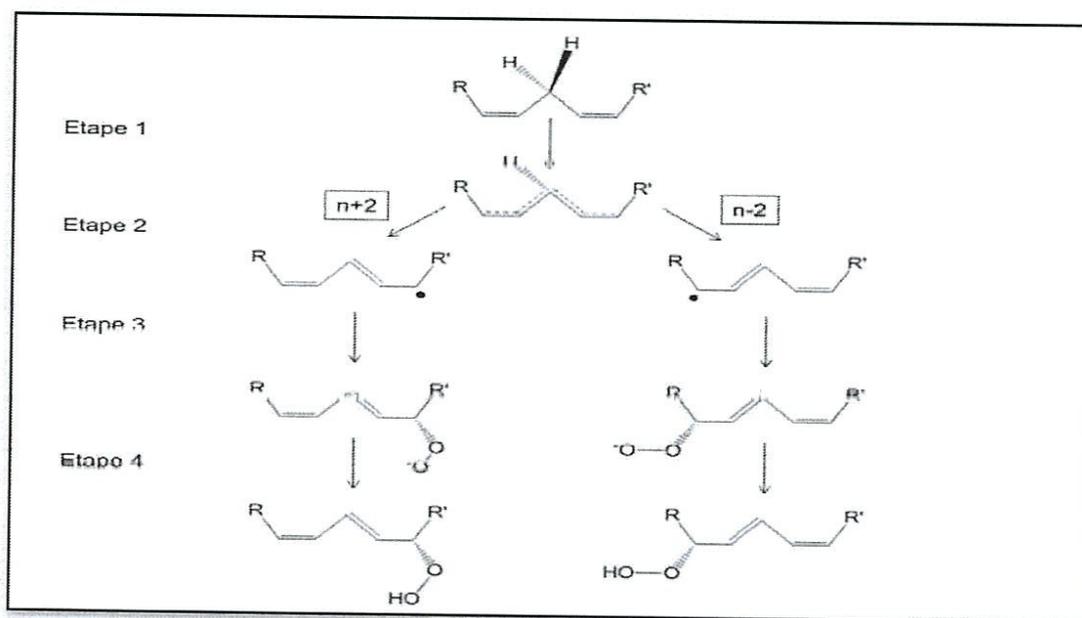
Cette étape limite la vitesse de réaction et est contrôlée à deux niveaux de sélectivité. En effet, si on prend, par exemple, l'AA comme substrat, trois possibilités existent pour l'abstraction de l'atome d'hydrogène : soit en C-7, C-10 ou C-13 (régiosélectivité). Par ailleurs, chacun de ces groupements méthylène présente un H pro-S et un H pro-R (énantiosélectivité). Six atomes d'hydrogène différents peuvent donc être enlevés lors de cette première étape. La plupart des LOXs, cependant, n'attaquent qu'un seul H, qui est fonction de l'alignement du substrat par rapport au centre catalytique, c'est-à-dire l'atome de fer activé ( $Fe^{3+}$ ).

• **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 [n+2], soit carboxylique [n-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.

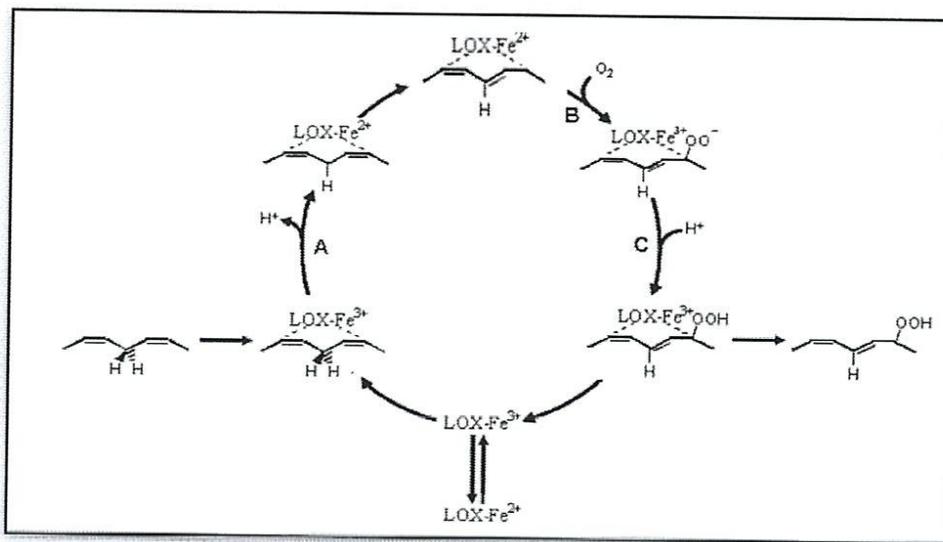


**Figure 2.6:** Schéma du mécanisme réactionnel de Lipoxygénase.

Parallèlement à ce mécanisme réactionnel, l'atome de fer du site actif de l'enzyme est impliqué dans un cycle d'oxydo-réduction (Figure 2.7).

Dans la forme inactive des LOXs, l'atome de fer est réduit (Fe<sup>2+</sup>). L'oxydation de l'atome de fer sous sa forme ferrique (Fe<sup>3+</sup>) est nécessaire pour que la catalyse commence. Puis, l'arrachement de l'hydrogène du groupement méthylène allylique conduit à la formation d'un radical pentadiényle et d'un proton (Figure 2.7 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 Fe<sup>2+</sup>. L'insertion antarafaciale, c'est-à-dire sur la face opposée du substrat, d'une molécule d'oxygène génère un radical hydroperoxyde réduit en anion par l'oxydation simultanée de l'atome

de fer sous sa forme ferrique (Figure 2.7 étape B). Un proton est capté pour former l'hydroperoxide (Figure 2.7 étape C). L'enzyme est alors capable de recommencer un cycle de réaction.



**Figure 2.7 :** Oxydation de l'atome de fer de la lipoxygénase au cours de la réaction catalytique [35]

Le mécanisme catalytique des LOX relativement bien identifié repose sur un contrôle de la régiospécificité et de la stéréospécificité. Plusieurs déterminants ont été caractérisés, qui permettent d'expliquer pour certaines LOX une régiospécificité et une stéréospécificité particulière.

### 6.1. Mécanisme de la régiospécificité

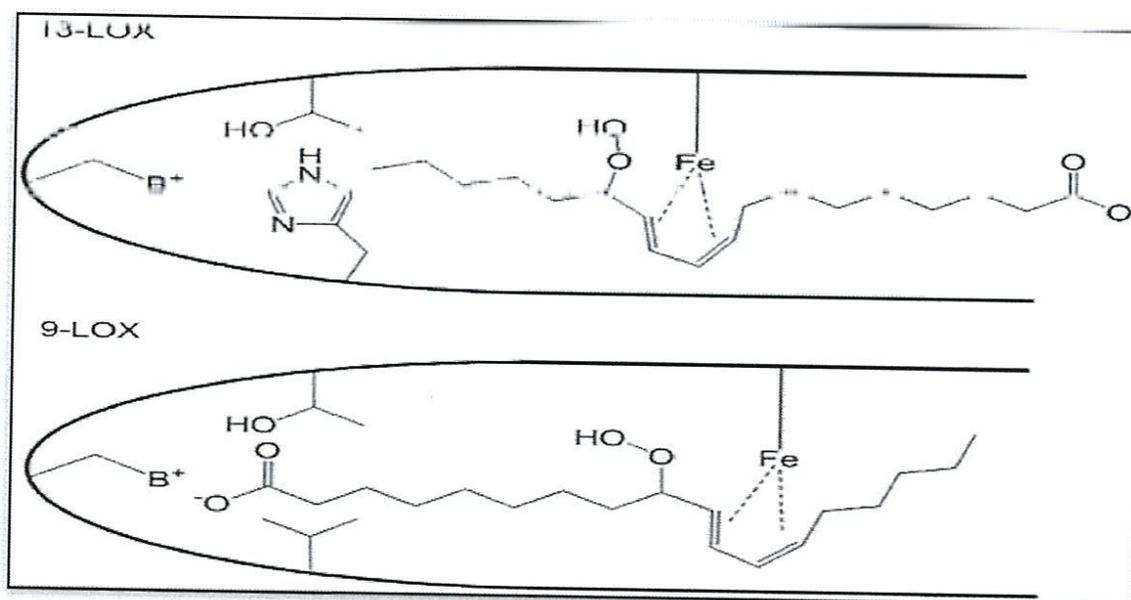
La régiospécificité des LOXs est le résultat de deux processus catalytiques : la sélectivité de l'hydrogène initialement arraché et la sélectivité du site d'insertion de l'oxygène moléculaire via le réarrangement du radical d'acide gras intermédiaire [36].

Le modèle de l'espace de liaison et le modèle de l'orientation dépendance ont été proposés pour expliquer la régiospécificité des LOXs.

### **a. Le modèle de l'orientation dépendance**

La régiospécificité des LOX serait dépendante de la manière dont le substrat pénètre dans le site actif, c'est-à-dire par son extrémité carboxylate ou méthyle [37]. Le site actif est en grande partie hydrophobe, ce qui aurait tendance à défavoriser l'entrée du substrat par son extrémité carboxylate. Ce modèle suggère que le substrat pénètre dans le site actif par son extrémité méthyl dans le cas des 13-LOXs et par son extrémité carboxylate dans le cas des 9-LOXs.

La mutation du résidu histidine par un résidu plus petit, une valine, permet la modification de la régiospécificité de la 13-LOX de concombre, la transformant en 9-LOX. L'hypothèse avancée est une modification de l'orientation du substrat dans le site actif : l'arginine, porteuse d'une charge positive au fond du site actif, et conservée chez les LOX végétales, pourrait favoriser l'entrée du substrat par son extrémité carboxylate si elle n'est pas masquée par un résidu encombrant (figure 2.8).



**Figure 2.8 :** Modèle de l'orientation dépendance [37].

### **b. Le modèle de l'espace de liaison**

Le modèle de l'espace de liaison (Figure 2.9) suggère que le substrat pénètre toujours dans le site actif par son extrémité méthyl hydrophobe. Dans ce modèle, c'est l'encombrement stérique des résidus d'acides aminés constituant le site actif qui détermine le degré de pénétration du substrat et son alignement relatif par rapport à l'atome de fer catalytique. L'insertion

spécifique de l'oxygène moléculaire au niveau du carbone C-9 ou C-13 dépend de la distance comprise entre l'atome de fer catalytique et l'extrémité méthyl du substrat.

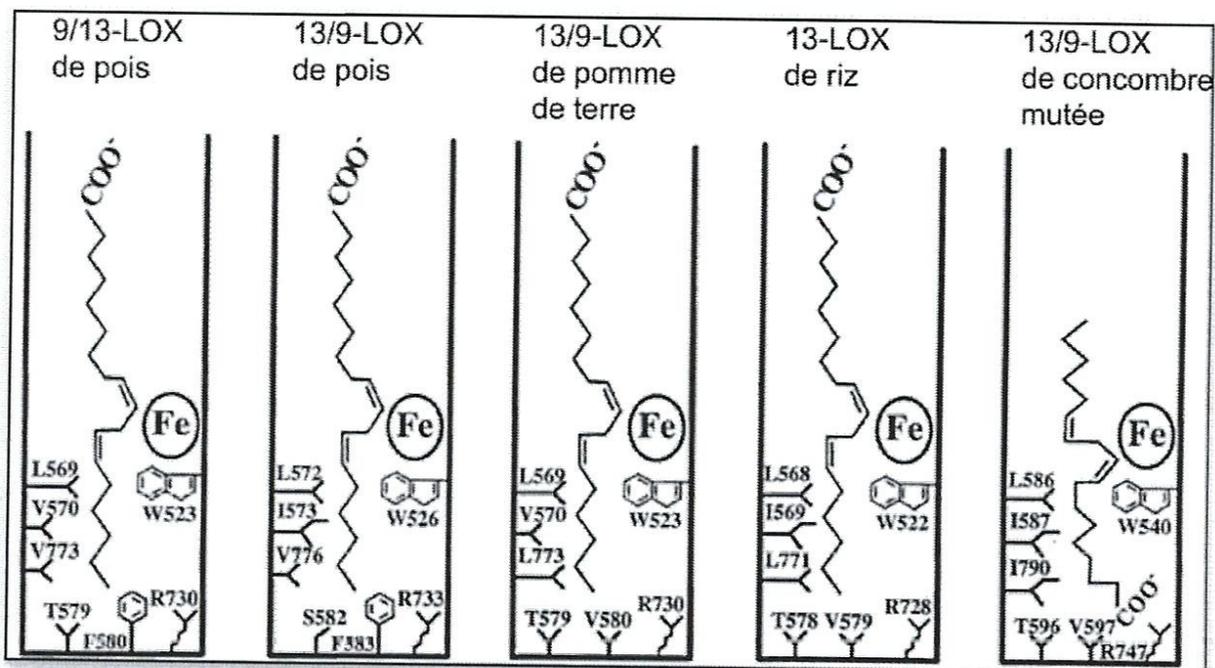


Figure 2.9 : Modèle de l'espace de liaison [38].

## 6.2. Mécanisme stéréospécificité

Au cours du mécanisme catalytique, l'abstraction de l'hydrogène et l'insertion de l'oxygène se font de manière antarafaciale par rapport au plan du système pentadiénique. L'atome d'hydrogène arraché peut donc être défini comme étant pro-S ou pro-R en fonction du type de LOX.

Les S-LOX sont caractérisées par la présence d'une alanine conservée, alors qu'elle est remplacée chez les R-LOX par un résidu glycine. Les auteurs ont proposé un mécanisme d'action régissant la stéréospécificité, et expliquant le rôle de ces résidus, qui est présenté en (Figure 2.10).

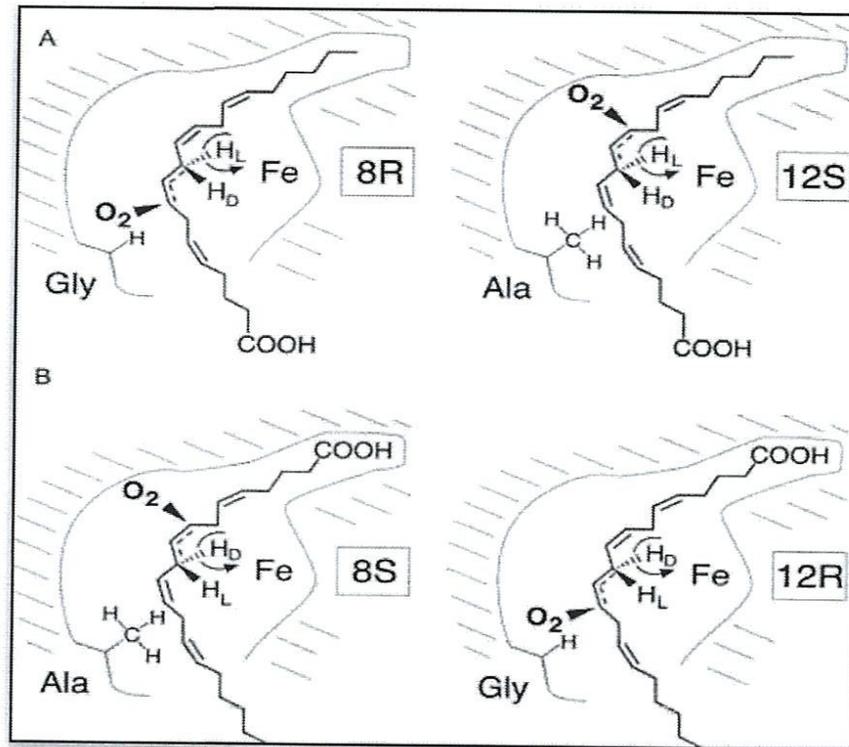


Figure 2.10 : Mécanisme de la stéréospécificité des LOX [39].

### III. Lipoxygénase de l'huile d'olive

Chez l'olive, les produits de la voie de la LOX sont responsables de l'arôme particulier de l'huile d'olive qui la différencie des autres huiles végétales. Néanmoins, peu d'informations sont disponibles sur la LOX d'olive, en raison de la difficulté à purifier l'enzyme à partir du fruit.

La masse moléculaire de la lipoxygénase d'olive a été estimée à 98 kDa. La lipoxygénase de pulpe d'olive semble avoir une préférence pour l'acide linoléique ( $K_m=82,44 \mu\text{M}$ ) par rapport à l'acide linoléique ( $K_m=306,26 \mu\text{M}$ ). L'analyse par RMN des produits obtenus après incubation de la lipoxygénase d'olive avec l'acide linoléique met en évidence la prédominance de l'isomère 13 de l'hydroperoxyde d'acide gras. L'enzyme semble relativement stable d'un point de vue thermique et peut être inhibée de façon compétitive (propyl gallate) et non compétitive.

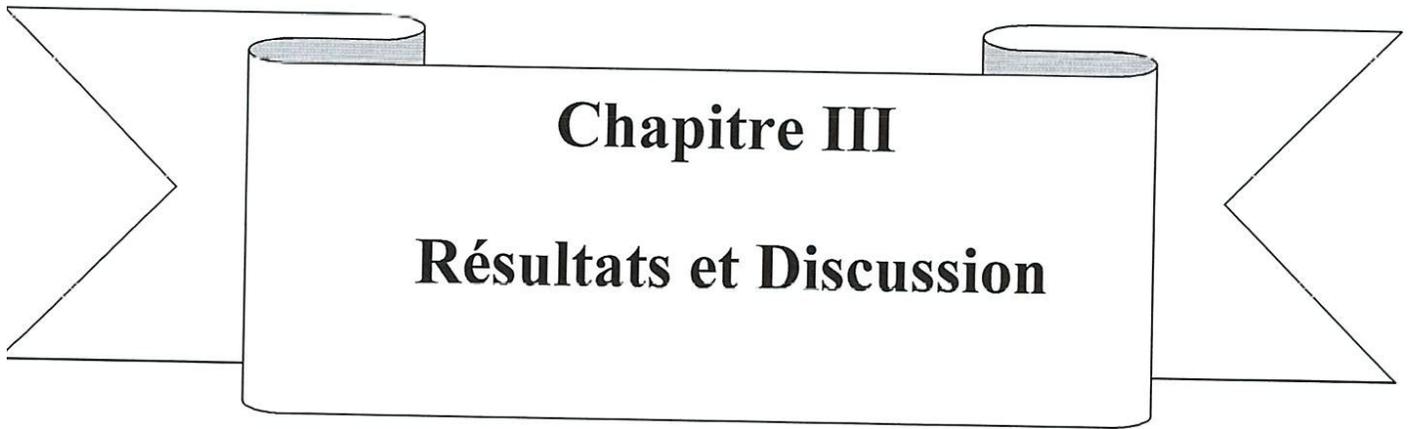
Récemment, l'existence de deux isoformes de LOX, une thermolabile et une thermorésistante, dans les olives vertes a été reporté par Luaces et al (2007). Ces auteurs ont suggéré que l'isoforme thermolabile pourrait être impliqué dans l'élaboration de l'arôme de l'huile d'olive. La 13-LOX purifiée à partir d'olives noires et l'isoforme thermorésistante

possèdent une énergie d'activation proche et pourraient donc correspondent a une même isoforme [40].

## REFERENCES

- 1- Gargouri. M., Ben Akacha.N.,Kotti. F., Ben Rejeb. I. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. (2008)., Vol 12 .p185-202.
- 2- Conde. C., Deltrob. S., Gerosa. H. *Journal of Plant Physiology*. (2008)., Vol 165. p1545-1562.
- 3- Yilmaz.E., Tandon. K.S., Scott. J.W., Baldwin. E.A., Shewfelt. R.L. *Journal of Plant Physiology*. (2001) .,Vol 158 .p1111-1116.
- 4- Gargouri. M., Ben Akacha. N., Legoy. M.D. *Journal of Applied Biochemistry and Biotechnology*. (2004).,Vol 119. p171-180.
- 5- Gargouri. M., Drouet. P., Legoy. M. D. *Journal of Biotechnology*. (2004)., Vol 111. p59-65.
- 6- Brash.A.R. *Journal of Biological Chemistry*. (1999) ., vol 236 p 79-82.
- 7- Braidot. E., Micolini. S., Risso. A., Macri. F., Vianello. A. *Plant Science*. (2003)., Vol 164 . p 9-16.
- 8- Fauconnier. M.L., Marlier. M. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* (1997).,Vol 2.p125-141.
- 9- Daglia. M., Aceti. C., Giorgetti. S., Papetti. A., Gazzani. G. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. (2005).,Vol 53 .p 6448-6454.
- 10- Liavonchanka. A., Feussner. I. *Journal of Plant Physiology*. (2006).,Vol 163. p348-357.
- 11- Hatanaka. A. *Journal of Phytochemistry*. (1993)., Vol 34. p120-121
- 12- Salas. J. J., Sanchez.J. *Plant Science*. (1999).,Vol 143. p19-26.
- 13- Siedow. J.N. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* (1991).,vol 42. p145-188.
- 14- Sanchez. J.,Harwood. J. L. *European Journal of Lipid Science and Technology*. (2002).,Vol 104. p 564-573.
- 15- Vick . B.A., Zimmerman. D.C. *Journal of Plant Physiology*. (1987) ., vol 85.p1073-1078.
- 16- Prigge. S.T., Boyington. J.C., Faig. M., Doctor. K.S., Gaffney. B.J., et Amzel. L.M. *Journal of Biochimie*. (1997).,vol 79. p 629-636.
- 17- Feussner. I., Wasternack . C. *Plant Biology* (2002).,vol 53. p 275-297.
- 18- Galliard. T., Chan. H.W. *Journal of Biochemistry of Plants*. (1980)., vol 9. p 131-161.
- 19- Liavonchanka. A., Feussner.I. *Journal of Plant Physiology*. (2006)., vol 163.p348-357.
- 20- Schneider. C., Pratt. D.A., Porter. N.A., Brash. A.R. *Journal of Chemistry & Biology*. (2007)., vol 14. p473-488.

- 21- Brash. A.R. Journal of Biological Chemistry. (1999),vol 274. p 23679-23682.
- 22- Hughes. R.K., West. S.I., Hornostaj. A.R., Lawson. D.M., Fairhurst. S.A., Sanchez. R.O., Hough. P., Robinson. B.H., Casey. R. Biochemical. (2001),vol 353. p 345-355.
- 23- Gillmor .S.A., Villaseñor .A.,Fletterick. R., Sigal. E., Browner. M.F. Nature Structural Biology. (1997),vol 4. p1003-1009.
- 24- Chen. X. S., Funk. C. D. Journal of Biological Chemistry. (2001),vol 276. p811-818.
- 25- Bateman. A., Sandford. R. Current Biology.(1999), vol 9. p588-590.
- 26- Boyington. J. C., Gaffney. B. J., Amzel. L. M. journal of Science. (1993),vol 260. p1482-1486.
- 27- Groot. J.J.M.C., Veldink. G.A., Vliegthart. J.F.G., Boldingh. J., Wever. R., vanGelder. B.F. journal of Biochimica and BiophysicaActa - Enzymology. (1975), vol 377. p7179.
- 28- Hegg. E. L., Que. I.. Journal of Biochemistry. (1997),vol 250. p 625-629.
- 29- Williams. M., Salas. J.J., Sanchez. J., Harwood. J.L. Journal of Phytochemistry. (2000),vol 53. p 13-19.
- 30- Salas. J. J., Williams. M., Harwood. J. L., Sanchez. J. journal of the american oil chemists society. (1999),Vol 76. p 1163-1168.
- 31- Fauconnier. M. I., Marlier. M. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. (1997), Vol 2. p125-141.
- 32- Mene-Saffrane. L., Esquerre-Tugaye. M. T., Fournier. J., Beffa. R., Grosjean-Cournoyer. M. C. Journal of World Intellectual Property Organisation. (2002), vol 9 . p1-12.
- 33- Kuhn. H. Journal of Prostaglandins Other Lipid Mediat. (2000),vol 62. p255-270.
- 34- Kuhn. H., Thiele. B. FEBS Letters. (1999),vol 449. p7-11.
- 35- Kühn. H., Borchert. A., Free Radical Biology and Medicine. (2002), vol33. p154-172.
- 36- Feussner. I., Kühn. H. FEBS Letters. (1995),vol 367. p12-14.
- 37- Hornung. E., Walther. M., Kühn. H., Feussner. I. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States (1999), vol 96. p4192-4197.
- 38- Hughes. R.K., Lawson D.M., Hornosta.j. A.R., Fairhurst. S.A., Casey. R. Journal of Biochemistry. (2001),vol 268. p1030-1040.
- 39- Coffa. G., Brash. A.R. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States, (2004), vol 101. p15579-15584.
- 40- Palmieri , T., Thèse de doctorat université de corse pascal Paoli .France. (2008) .p 34.



## **Chapitre III**

### **Résultats et Discussion**

## **I. Méthodes de travail**

Dans cette étude, nous avons utilisé le programme Surflex implanté dans le logiciel SYBYL-X version 2.1.1 [1].

Le programme Surflex comprend deux parties. L'une pour des études de similarité tridimensionnelle des molécules, l'autre pour des études de Docking. Seule la partie Docking est abordée. Elle se base sur la construction d'une pseudo-molécule comme cible sur laquelle le ligand sera aligné. Il s'agit de fragments de molécules placés dans le site actif de manière à occuper idéalement et de manière redondante celui-ci à partir de critères morphologiques. Il est important de préciser que cette pseudo molécule peut être construite à partir du ligand dans le site, à condition de bénéficier d'une structure, ou bien à partir du récepteur sans aucun ligand.

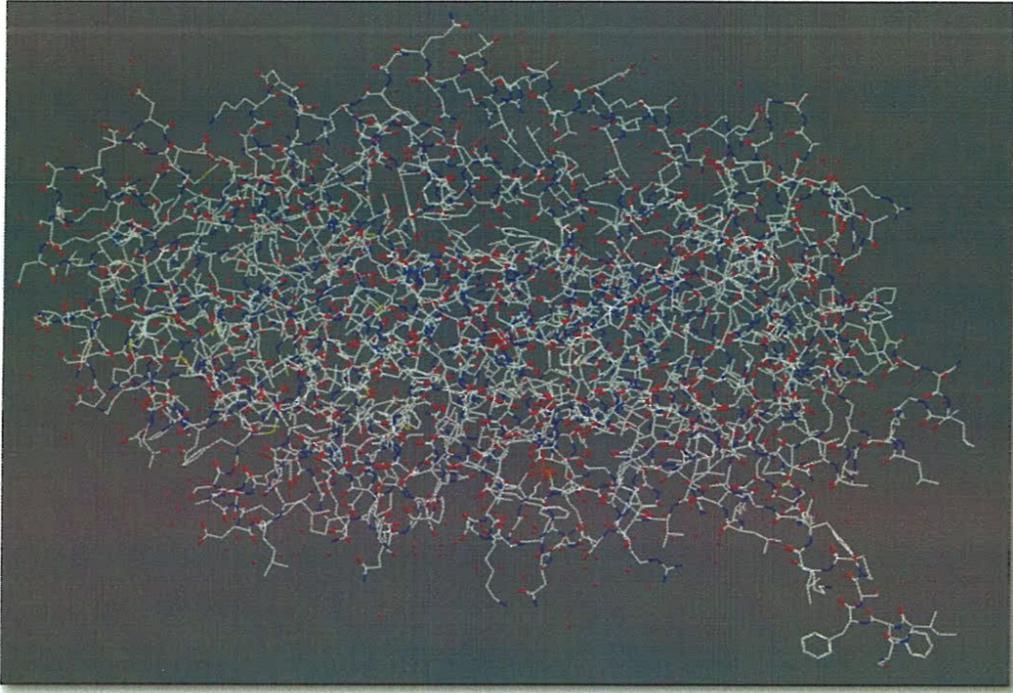
L'emploi du logiciel passe par trois étapes :

- Déterminer le site actif avec ou sans ligand.
- Construire la «pseudo-molécule ».
- lancer le processus de Docking.

Le résultat est donné sous forme de 20 poses « conformères », et les composés sont classés par la fonction « total score ».

La structure de l'acide linoléique est extraite de la banque de données PUBCHEM. Ensuite elle est optimisée par la méthode gasteiger huckel avec l'algorithme steepest descent et le champ de force tripos.

La lipoxygénase (LOX), faisant l'objet de notre étude, a été téléchargée de la banque de donnée *Protein Data Bank* (PDB). Parmi les nombreux complexes proposés par la PDB, nous avons choisi la protéine 4RPE (figure 3.1), avec une résolution de 1.6 Å.



**Figure 3.1** : Visualisation de la protéine 4RPE.

Elle est constituée d'une seule chaîne, dans laquelle se trouve le seul ligand qui est le (2R) -3 - {[ (S) - (2-aminoéthoxy) (hydroxy) phosphoryl] oxy} - 2- (tétradécanoyloxy) propyl octa décanoate. Le site actif est constitué de 91 acides aminés dont 47 sont hydrophobes. On retrouve également un atome de Fer lié à 3 histidines et évidemment un nombre de molécule d'eau.

Avant le docking les liaisons métalliques et les molécules d'eau sont éliminées, puis la protéine est optimisée en utilisant le champ de force MMFF94s.

## II. Résultats et discussion

### 1. Tests de fiabilité du programme de docking

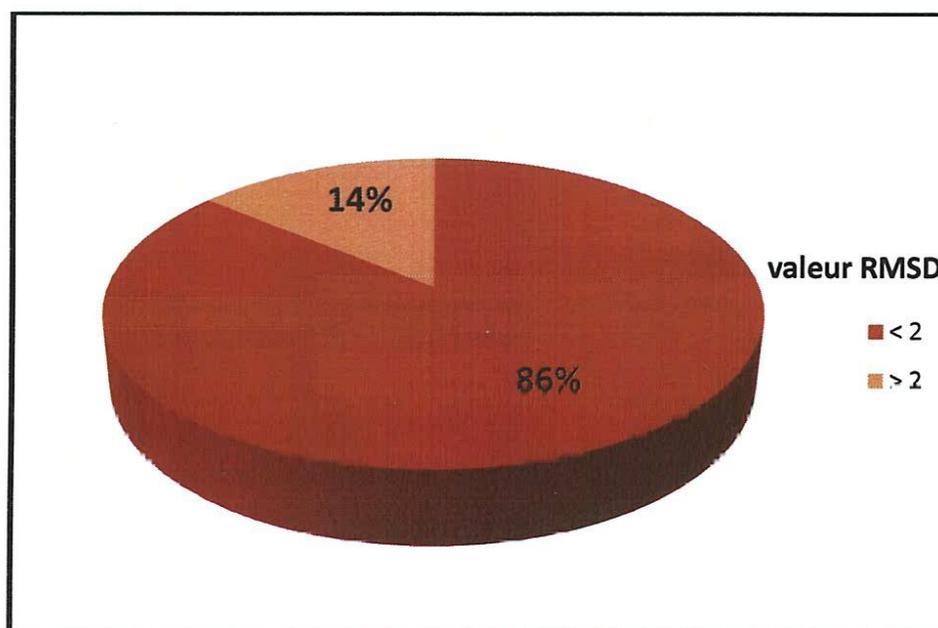
Pour valider le protocole utilisé, nous avons jugé utile d'évaluer d'abord la performance du programme SYBYL par le test :

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

#### 1.1. 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 jugée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (root-mean-square deviation) entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Le RMSD représente la moyenne des différences de positions des atomes appartenant à deux conformations différentes. Il est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms.

Dans notre cas, le test de fiabilité du programme SYBYL par le RMSD a été réalisé sur 100 complexes protéine-ligand pris de manière arbitraire via la PDB. (Annexe 1). Les résultats de ce test sont représentés sur la (figure 3.2).



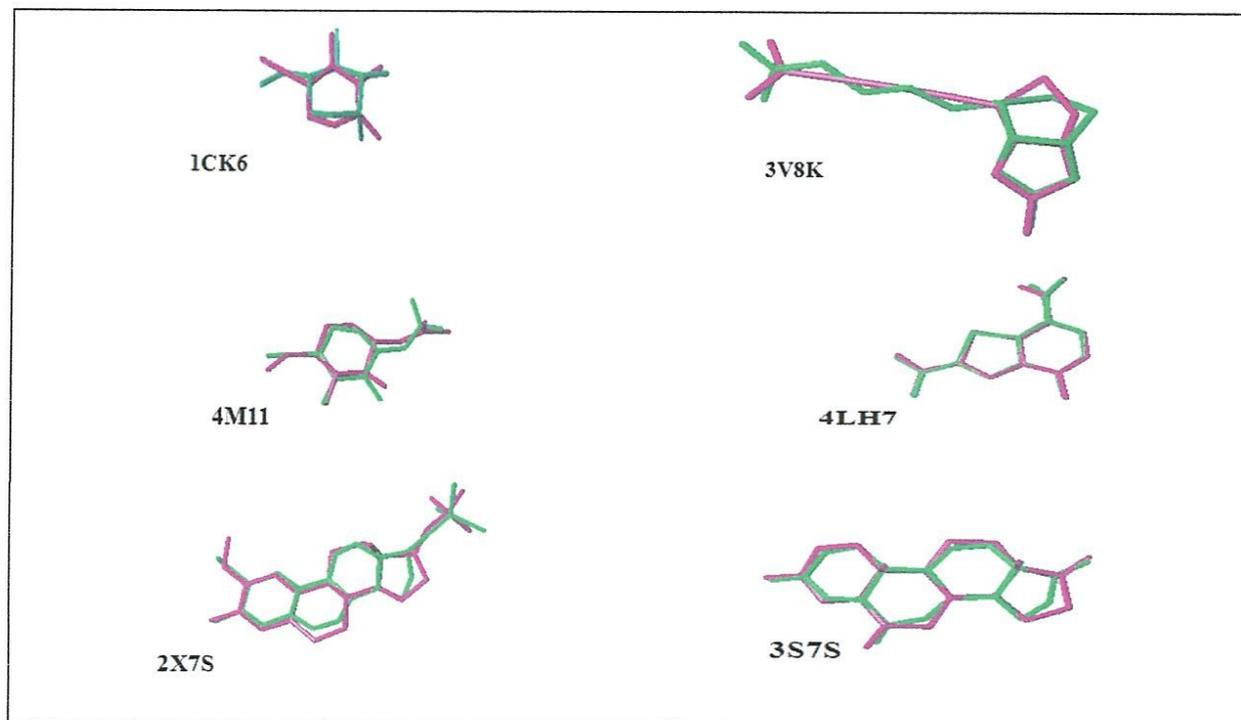
**Figure 3.2** : Résultats du test RMSD

## 1.2. Analyse visuelle :

L'analyse visuelle par SYBYL est une étape essentielle pour confirmer les résultats du RMSD (tableau 3.1). Pour cela, il suffit de comparer, par simple superposition la conformation du même ligand calculée par Surflex (en vert) à celle obtenue expérimentalement que l'on retrouve dans la PDB (en violet). Les schémas sont représentés sur la (figure 3.3).

**Tableau 3.1 :** RMSD de quelques complexes protéine-ligand.

Code PDB	Code des ligands	RMSD (Å)
1CK6	SHA	0.37
3V8K	BTN	0.57
4M11	NAG	0.74
4LH7	1X8	0.72
2X7S	WZC	0.61
3S7S	EXM	0.32



**Figure 3.3 :** Visualisation des différents résultats RMSD.

A la lumière des résultats obtenus par le RMSD et l'analyse visuelle, nous pouvons conclure qu'on peut utiliser le surflex pour étudier théoriquement l'oxydation de l'acide linoléique par le docking moléculaire ainsi que son inhibition.

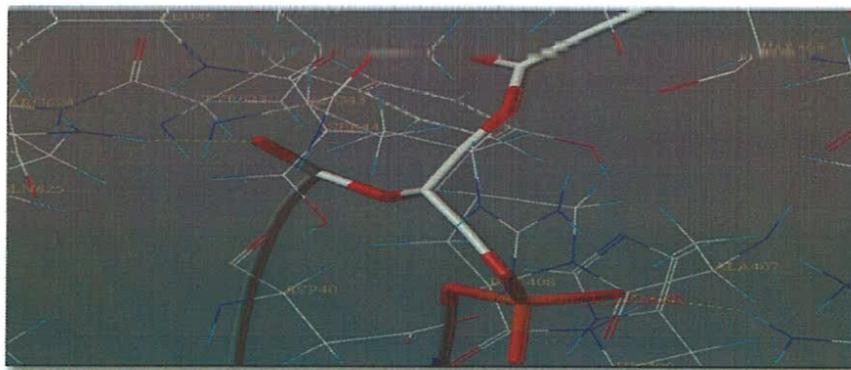
## **2. Mécanisme réactionnel d'oxydation de l'acide linoléique par docking**

Le processus du docking comprend deux étapes essentielles :

1. l'arrimage de la protéine avec son ligand naturel.
2. l'oxydation de l'acide linoléique par le docking (voir Figure 2.6).

### **2.1. Docking du Ligand naturel**

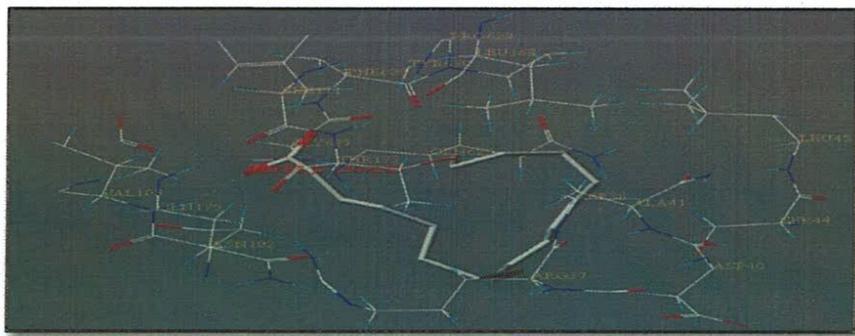
L'analyse de l'insertion du ligand naturel dans la lipoxygénase 4RPE (figure 3.4) montre qu'il pénètre dans le site actif en formant deux liaisons hydrogène : une liaison entre Hydrogène de groupement amine du résidu GLN393 et Oxygène de ligand (ligand-P-O-----HN-GLN393 ;  $d = 1.982 \text{ \AA}$ ), et l'autre entre H de groupement amine du résidu GLN625 et O de ligand (ligand-C<sub>27</sub>-O-----HN-GLN393 ;  $d = 1.903 \text{ \AA}$ ).



**Figure 3.4 :** Mode d'interaction du ligand naturel avec le site actif.

### **2.2 Oxydation de l'acide linoléique par docking**

Le docking de l'acide linoléique dans LOX montre qu'une seule liaison hydrogène est établie entre H de groupement amine du VAL103 et O de groupement carbonyle de la fonction acide du ligand avec une distance de  $1.927 \text{ \AA}$  (figure 3.5).



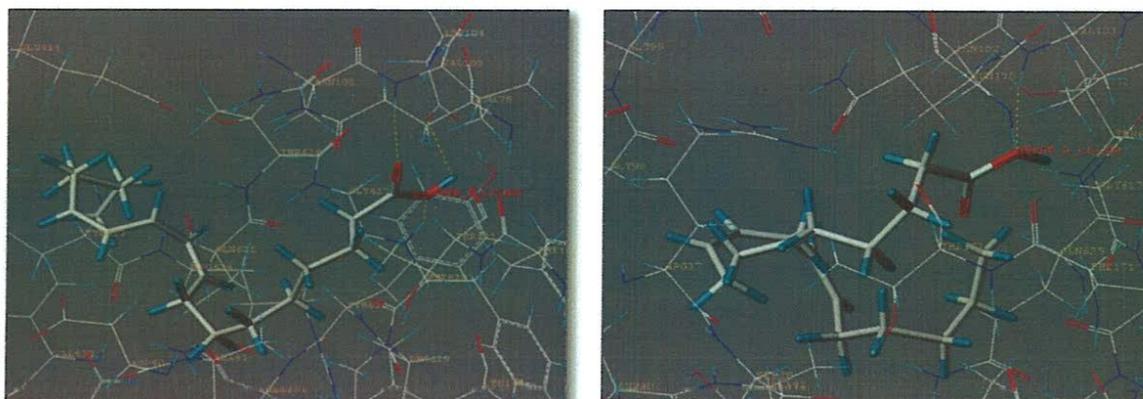
**Figure 3.5 :** Mode d'interaction LOX – acide linoléique.

Après l'insertion de l'acide linoléique dans LOX, on procède aux étapes suivantes :

**a. Abstraction de H<sub>1</sub> et H<sub>2</sub>**

Trois liaisons hydrogène résultent de l'abstraction du premier atome d'hydrogène (H<sub>1</sub>): la première entre H du groupement amine du VAL103 et O de groupement carbonyle de la fonction acide du ligand (d=1.941 Å). La deuxième entre H de groupement amine du ASP104 et O de groupement hydroxyle de la fonction acide du ligand (d=1.864 Å), et la troisième entre l'oxygène de groupement carbonyle du résidu PHE628 et l'hydrogène de groupement hydroxyle de la fonction acide du ligand (d=2.621 Å), (figure 3.6.a).

(Figure 3.6.b) qui représente l'abstraction du deuxième atome d'hydrogène (H<sub>2</sub>) visualise la formation d'une liaison hydrogène entre H de groupement amine du résidu VAL103 et O de groupement hydroxyle de la fonction acide du ligand (d= 1.992 Å).



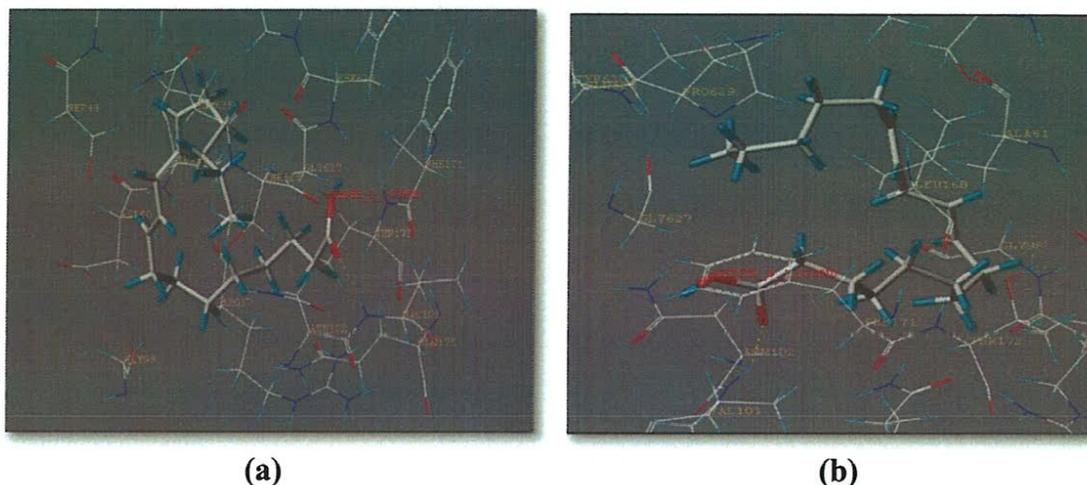
**(a)**

**(b)**

**Figure 3.6 :** Mode d'interaction du ligand avec le site actif. **(a)** : L'abstraction de H<sub>1</sub>,  
**(b)** :L'abstraction de H<sub>2</sub>.

**b. Réarrangement du radical allylique (n+2) et (n-2)**

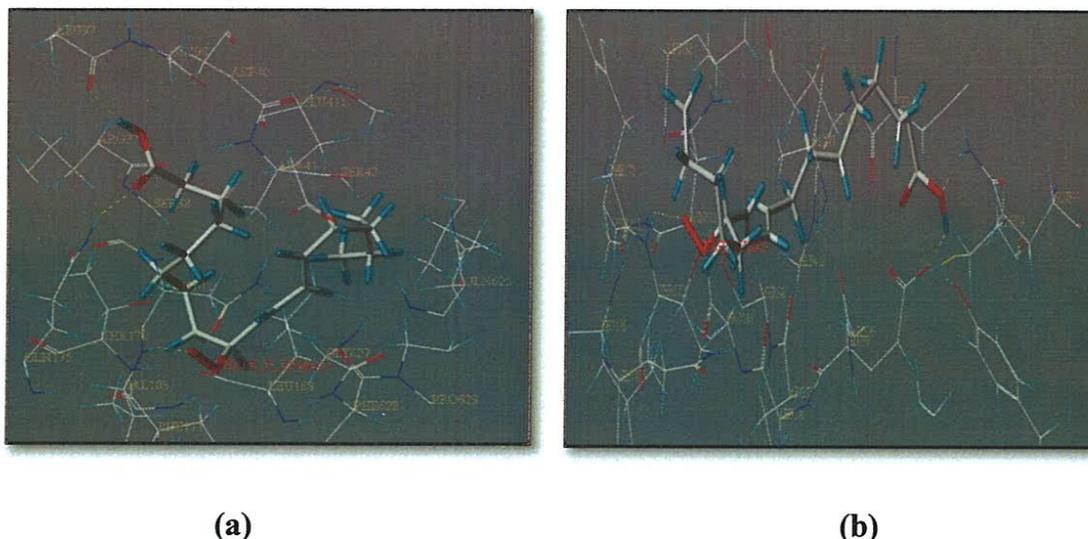
Un réarrangement du radical allylique de type n+2 et n-2 est établi après l'abstraction de l'hydrogène. Une seule liaison hydrogène est formée entre H groupement amine de résidu VAL103 et O de groupement carbonyle de la fonction acide du ligand avec une distance de 2.015 Å pour le réarrangement du radical allylique (n+2) (Figure 3.7.a), et une distance de 1.827 Å pour le réarrangement du radical allylique (n-2) (Figure 3. 7.b).



**Figure 3.7 :** Mode d'interaction du ligand avec le site actif. **(a) :** réarrangement du radical allylique (n+2), **(b) :** réarrangement du radical allylique (n-2).

**c. Insertion de l'oxygène sur le carbone 9 et le carbone 13**

L'insertion de l'oxygène sur le carbone 9 (la figure 3.8.a) et le carbone 13 (la figure 3.8.b) conduit à la formation d'un radical peroxyde.



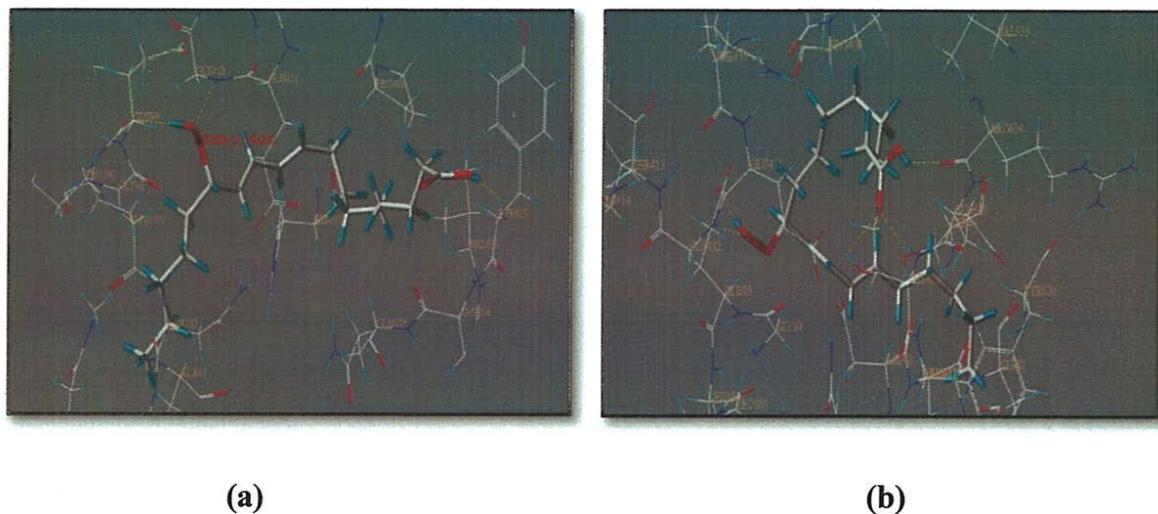
**Figure 3.8 :** Mode d'interaction du ligand avec le site actif. **(a) :** Insertion de l'oxygène sur le carbone 9, **(b) :** Insertion de l'oxygène sur le carbone 13.

Le complexe ainsi formé est stabilisé par trois liaisons hydrogène. La première est formée entre H de groupement amine du VAL103 et O de groupement peroxyde du ligand ( $d=2.042 \text{ \AA}$ ), la deuxième entre O de groupement carbonyle du LEU97 et H de groupement hydroxyle de la fonction acide de ligand ( $d= 1.916 \text{ \AA}$ ). La troisième apparait entre H de groupement amine de GLN175 et O de groupement carbonyle de la fonction acide du ligand ( $d=1.919 \text{ \AA}$ ) (figure 3.8.a).

L'analyse visuelle du complexe (figure 3.8.b) nous montre trois liaisons hydrogènes : La première est établi entre H de groupement amine du VAL103 et O de groupement peroxyde du ligand ( $d= 2.082\text{\AA}$ ). La deuxième entre H de GLN393 et O de groupement hydroxyle de la fonction acide du ligand ( $d=1.875 \text{ \AA}$ ). La troisième entre O de GLU99 et H de groupement hydroxyle de la fonction acide du ligand ( $d=2.733 \text{ \AA}$ ).

#### **d. Formation d'un groupe hydroperoxyde sur le carbone 9 et le carbone 13**

Le radical peroxyde formé suite à l'insertion de l'oxygène sur le carbone 9 et le carbone 13 capte un proton pour formé un groupement hydroperoxyde sur le C<sub>9</sub> et le C<sub>13</sub> conduit à la formation d'un radical peroxyde.



**Figure 3.9 :** Mode d'interaction du ligand avec le site actif. **(a) :** La formation d'un groupe hydroperoxyde sur le C<sub>9</sub>, **(b) :** La formation d'un groupe hydroperoxyde sur le C<sub>13</sub>.

La (figure 3.9.a) illustre que Le complexe formé est stabilisé par cinq liaisons hydrogène . deux distantes de  $d= 1.855 \text{ \AA}$  et  $d=2.615 \text{ \AA}$  entre les deux hydrogènes du résidu THR626 (H de groupement amine et H de groupement hydroxyle respectivement) et O de groupement carbonyle de fonction acide du ligand. La troisième entre O de groupement carbonyle du résidu ARG624 et H de groupement hydroxyle de fonction acide du ligand

( $d=1.855 \text{ \AA}$ ). La quatrième entre O de groupement carbonyle du résidu GLU99 et H de groupement hydroperoxyde du ligand ( $d = 1.982 \text{ \AA}$ ). La dernière entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroperoxyde du ligand ( $d=2.004 \text{ \AA}$ ).

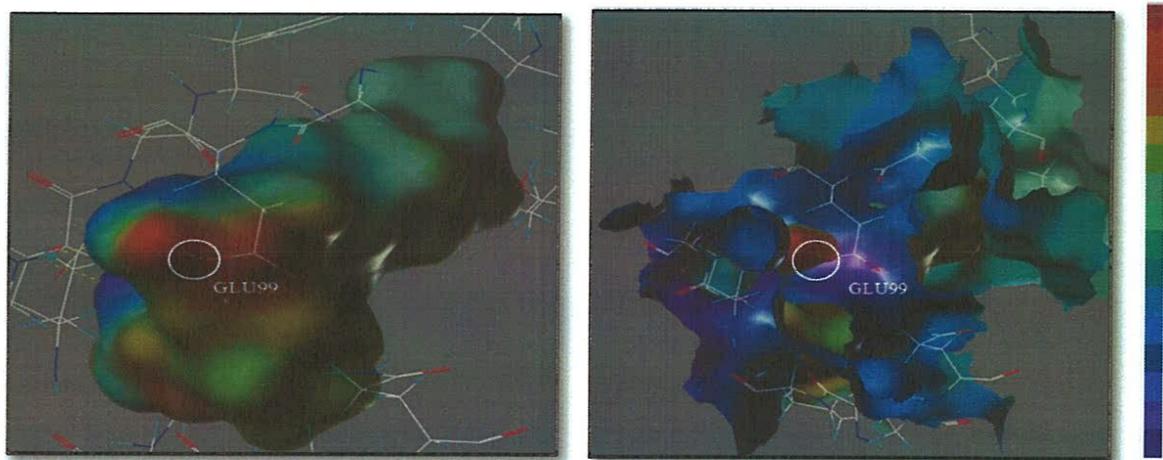
La (figure 3.9.b) présente trois liaisons hydrogène. La première est formée entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroperoxyde du ligand ( $d=2.003 \text{ \AA}$ ). La deuxième existe entre O de groupement carbonyle du GLU99 et H de groupement hydroperoxyde du ligand ( $d= 2.128 \text{ \AA}$ ). La troisième apparait entre H de groupement amine du TYR623 et O de groupement hydroxyle de la fonction acide du ligand ( $d=2.147 \text{ \AA}$ ).

### 2.3. Interactions électrostatiques et hydrophobes

L'analyse visuelle du complexe nous a permis de voir aussi des interactions électrostatiques et hydrophobes.

- **Interactions électrostatiques**

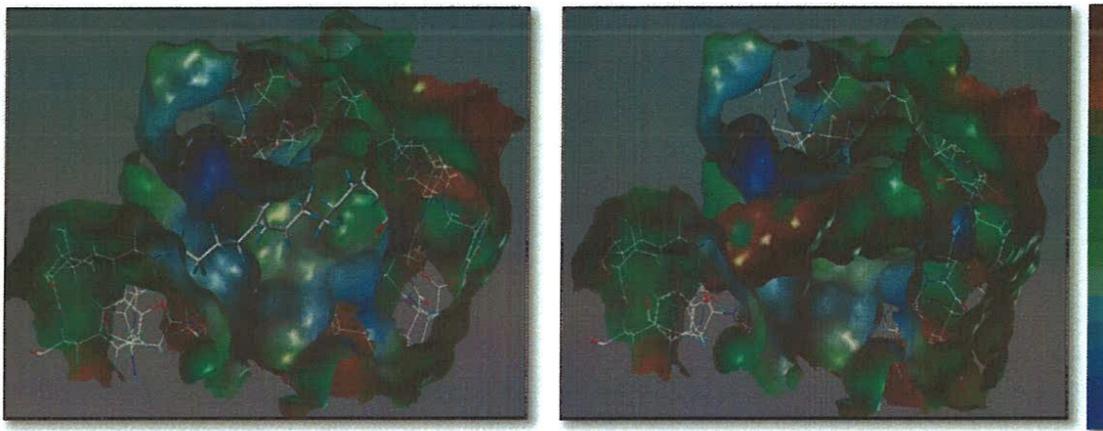
La figure 3.10 illustre une interaction électrostatique moyenne entre H de groupement amine du résidu VAL103 « bleu » et O de groupement peroxyde « marron ». Il existe aussi des interactions faibles (vert avec bleu).



**Figure 3.10 :** Interactions électrostatiques moyennes LOX-ligand.

- **Interactions hydrophobes**

Les complexes LOX-ligand sont stabilisés aussi par des interactions hydrophobiques avec les résidus ALA41, PHE171, LEU168. Elles sont schématisées par différentes couleurs : bleu pour hydrophobe, marron pour hydrophile, et vert entre les deux.



**Figure 3.11** : Visualisation des interactions hydrophobiques.

### **3. Inhibition**

Dans les aliments, la présence d'enzymes peut favoriser l'oxydation lipidique. Par exemple, la lipoxygénase, enzyme présente dans de nombreuses plantes, peut catalyser l'oxydation des lipides. Une oxydation prolongée génère des composés indésirables et dans la plupart des temps toxiques, pour minimiser les effets néfastes de ce phénomène on fait appel à l'inhibition.

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.

Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) sont des antioxydants synthétiques lipophiles. Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Néanmoins, leur utilisation reste controversée, les produits de dégradation du BHA et du BHT étant suspectés d'être cancérogènes [2,3].

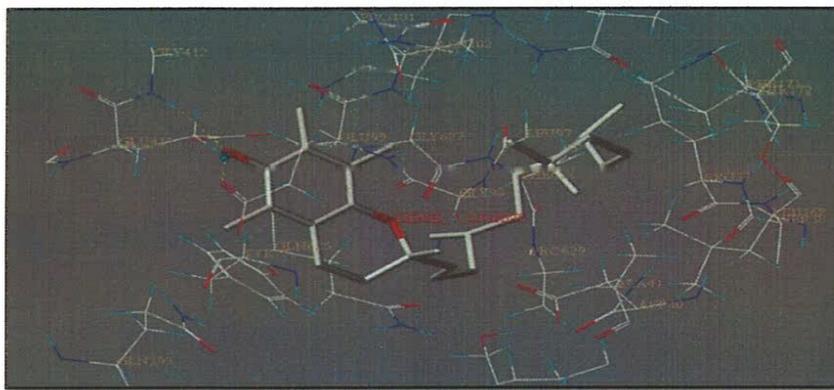
Les tocopherols (vitamine E) sont des antioxydants naturels et leur présence confère une certaine stabilité à l'huile d'olive. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer comme exemple l' $\alpha$ -tocophérol, le  $\beta$ -tocophérol, le  $\delta$ -tocophérol et le  $\gamma$ -tocophérols. La teneur en tocophérol dans l'huile d'olive varie entre 50 et 150 mg/kg [4].

Les polyphénols possèdent un large éventail d'activités biologiques *in vitro* (antibactériennes, anti-cancérogène, anti-inflammatoire, antioxydante etc...) liées à leur caractère réducteur et à leur affinité pour les protéines et les ions métalliques. Les polyphénols présentant ainsi des propriétés antioxydantes bien établies et en lien avec l'inhibition de l'oxydation aussi bien dans le domaine alimentaire (oxydation des lipides) que physiologique (stress oxydant) [5].

Dans cette partie, nous nous sommes attachés à l'étude des inhibiteurs naturels tels que les tocophérols ( $\alpha$ -tocophérol,  $\beta$ -tocophérol,  $\delta$ -tocophérol,  $\gamma$ -tocophérol et acétate d' $\alpha$ -tocophéryle) et les polyphénols (2-Phenyl-4-chromanol, (-)-épigallocatechine gallate et Hydroxytyrosol) (annexe 2).

### 3.1. Alpha-tocophérol

Le docking moléculaire du complexe LOX-  $\alpha$ -tocophérol a fourni les modes d'interaction illustrés dans la figure 3.12.



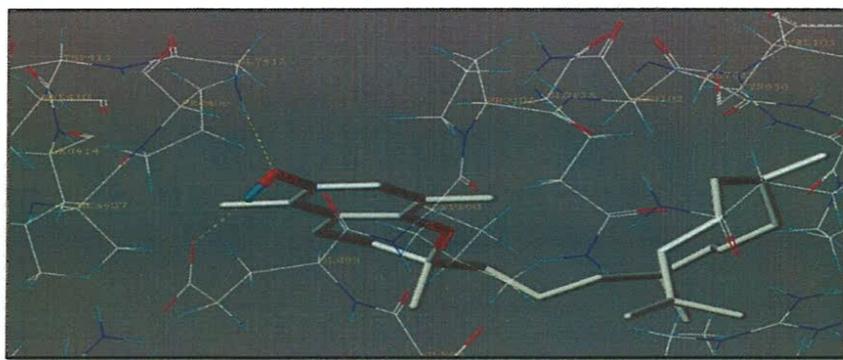
**Figure 3.12 :** Mode d'interaction LOX-  $\alpha$ -tocophérol.

Le complexe formé est stabilisé par deux liaisons hydrogène. La première est formée entre H du groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroxyle du ligand ( $d=2.038 \text{ \AA}$ ). La deuxième apparaît entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle du ligand ( $d=1.868 \text{ \AA}$ ).

### 3.2. Beta-tocophérol

L'analyse visuelle du complexe LOX-  $\beta$ -tocophérol (figure 3.13), nous montre deux liaisons hydrogène : La première entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroxyle du ligand ( $d=1.857 \text{ \AA}$ ), la deuxième est formée entre O de

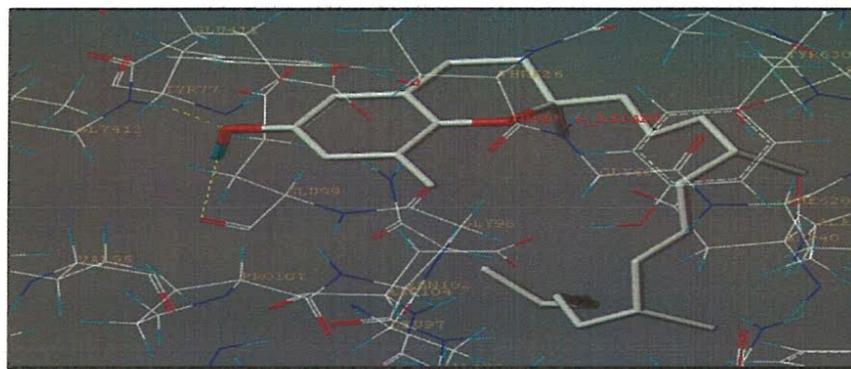
groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle du ligand ( $d= 1.841 \text{ \AA}$ ).



**Figure 3.13 :** Mode d'interaction LOX-  $\beta$ -tocophérol.

### 3.3. Delta-tocophérol

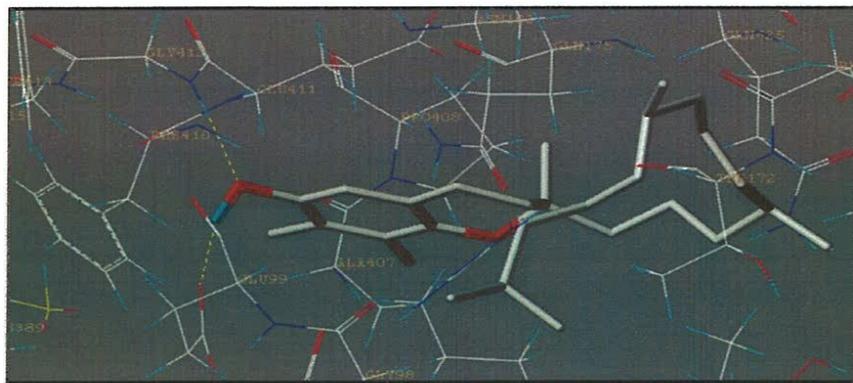
Les modes d'interaction qui régissent la formation du complexe LOX-  $\delta$ -tocophérol (La figure 3.14) présentent deux liaisons hydrogène : La première est établie entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroxyle du ligand ( $d=1.724 \text{ \AA}$ ). La deuxième est formée entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle du ligand ( $d= 2.101 \text{ \AA}$ ).



**Figure 3.14 :** Mode d'interaction LOX-  $\delta$ -tocophérol.

### 3.4. Gama-tocophérol

L'arrimage du complexe LOX-  $\gamma$ -tocophérol a fourni les modes d'interaction illustrés dans la figure 3.15.



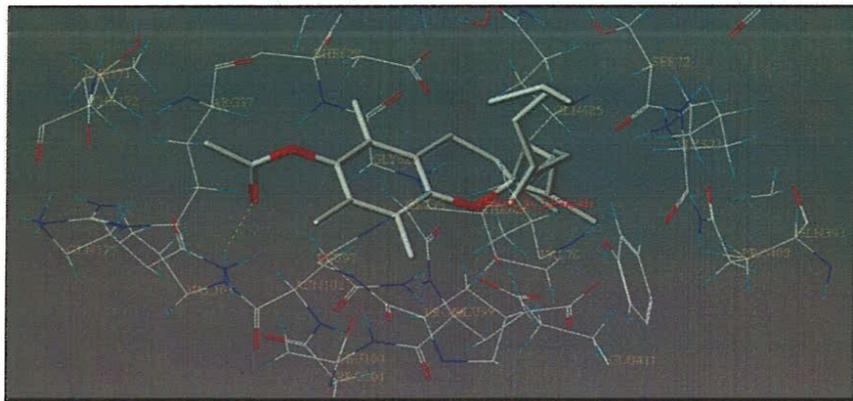
**Figure 3.15 :** Mode d'interaction LOX-  $\gamma$ -tocophérol.

Le complexe ainsi formé montre la présence de deux liaisons H : La première est établie entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroxyle du ligand ( $d=1.821 \text{ \AA}$ ). La deuxième entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle du ligand ( $d= 1.730 \text{ \AA}$ ).

D'après ces résultats, nous pouvons remarquer que l'inhibition de LOX par les tocophérols est établi par deux interactions du type liaisons hydrogène : La première est formée entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroxyle du ligand. La deuxième entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle du ligand avec des longueurs de liaison variables. Les résidus GLU99 et GLY412 qui ont participé dans la formation du complexe LOX-acide linoléique ont été bloqué par la présence des tocophérols.

### 3.5. Acétate d'alpha-tocophéryle

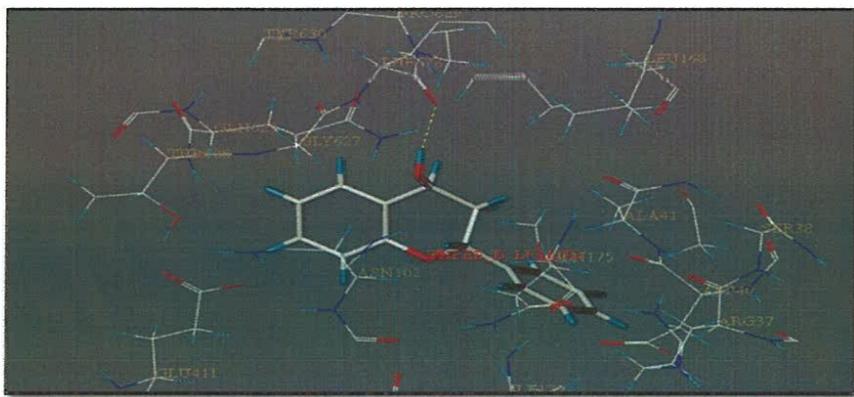
Le complexe LOX- Acétate d'alpha-tocophéryle est stabilisé (figure 3.16) par la formation d'une liaison hydrogène distante de  $2.038 \text{ \AA}$  entre O de la fonction carbonyle du ligand et H de la fonction amine du résidu VAL103.



**Figure 3.16:** Mode d'interaction de LOX- Acétate d'alpha-tocophéryle.

### 3.6. 2-Phenyl-4-chromanol

Le 2-Phenyl-4-chromanol appartient à la famille des polyphénols. Ce ligand a été étudié comme inhibiteur de LOX. D'après l'analyse visuelle du complexe LOX-2-Phenyl-4-chromanol formé (figure 3.17), on constate l'établissement d'une seule liaison hydrogène entre O de groupement carbonyle du PHE628 et H de groupement hydroxyle du ligand ( $d=2.014 \text{ \AA}$ ).



**Figure 3.17 :** Mode d'interaction LOX-2-Phenyl-4-chromanol.

### 3.7. (-) - épigallocatechine gallate

Le complexe LOX-(-) - épigallocatechine gallate (figure 3.18) est stabilisé par huit liaisons hydrogène la plus prononcée est celle formée entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle du ligand. Le résidu GLU99 qui participe dans la formation du complexe LOX-acide linoléique a été bloqué par (-) - épigallocatechine gallate.

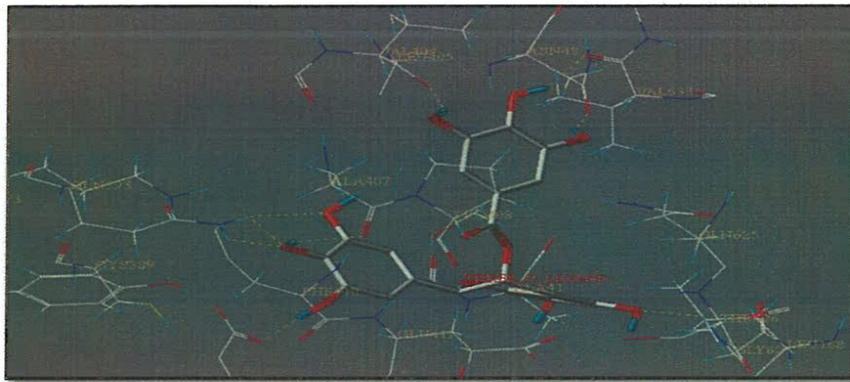


Figure 3.18 : Mode d'interaction LOX(-) - épigallocatechine gallate.

### 3.8. Hydrohytyrosol

L'analyse visuelle du complexe LOX- Hydrohytyrosol nous montre plusieurs interactions hydrogène les plus prononcées sont celles formées entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle porté sur le C<sub>28</sub> du ligand ( $d = 1.868 \text{ \AA}$ ) d'une part et O de groupement carbonyle du GLU99 et H de groupement hydroxyle porté sur le C<sub>31</sub> du ligand ( $d = 2.080 \text{ \AA}$ ) d'autre part. On assiste un double blocage du résidu GLU99. Une autre interaction a été remarquée entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroxyle porté sur le C<sub>31</sub> du ligand ( $d = 1.807 \text{ \AA}$ ).

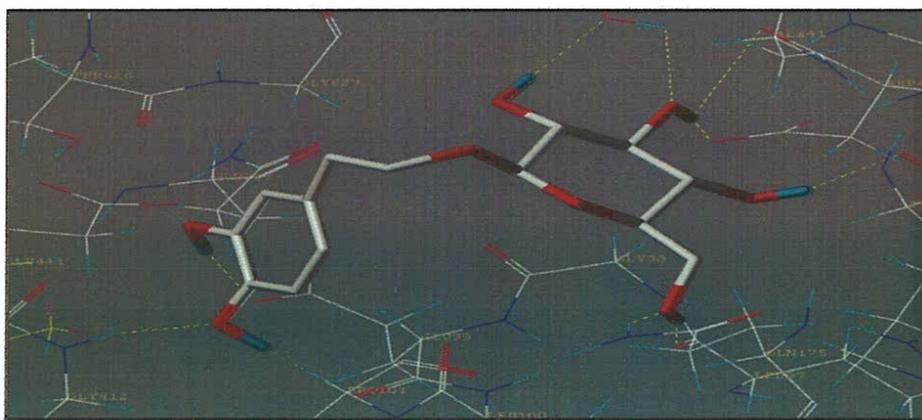


Figure 3.19 : Mode d'interaction LOX- Hydrohytyrosol.

### 4. Affinités des ligands

Cette procédure est basée sur l'arrimage 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.

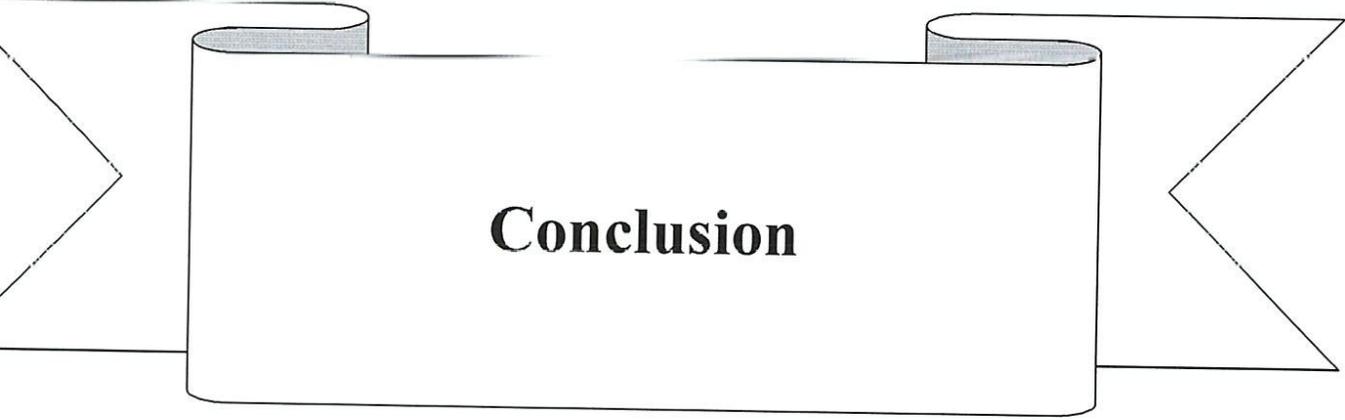
**Tableau 3.2 :** Classement des résultats de docking.

Classement	Structure	Total score
1	$\alpha$ -tocophérol	10.4385
2	$\beta$ -tocophérol	9.8174
3	$\delta$ -tocophérol	9.6029
4	$\gamma$ -tocophérol	9.0898
5	acétate d'alpha-tocophéryle.	9.0581
6	acide linoléique	8.3530
7	hydrohytyrosol	7.3395
8	2-Phenyl-4-chromanol	7.3023
9	(-)-épigallocatechine gallate	4.2713

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

## REFERENCES

- 1- Jain, A.N. "Surflex-Dock 2.1: Robust Performance from ligand Energetic Modeling, Ring Flexibility, and Knowledge-Based Search" .Journal of Computer-Aided Molecular Design. (2007)., vol 21. p281-306.
- 2- Ito. N., Fukushima S., Hagiwara A., M. Shibata, T. Journal of the National Cancer Institute (1983)., vol 70. p343-352.
- 3- Chen C., Pearson A.M., Gray J.I., Food of Chemistry. (1992).,vol 43.p177-183 .
- 4- Dionisi. F., Prodollit. J., Tagliaferri. E. Journal of the American Oil Chemists' Society. (1995).,vol 72.p 1505-1511.
- 5- Japon-Lujan R., Janeiro P., Luque de Castro M.D. Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2008)., vol 56. p7231–7235.



**Conclusion**

## **Conclusion**

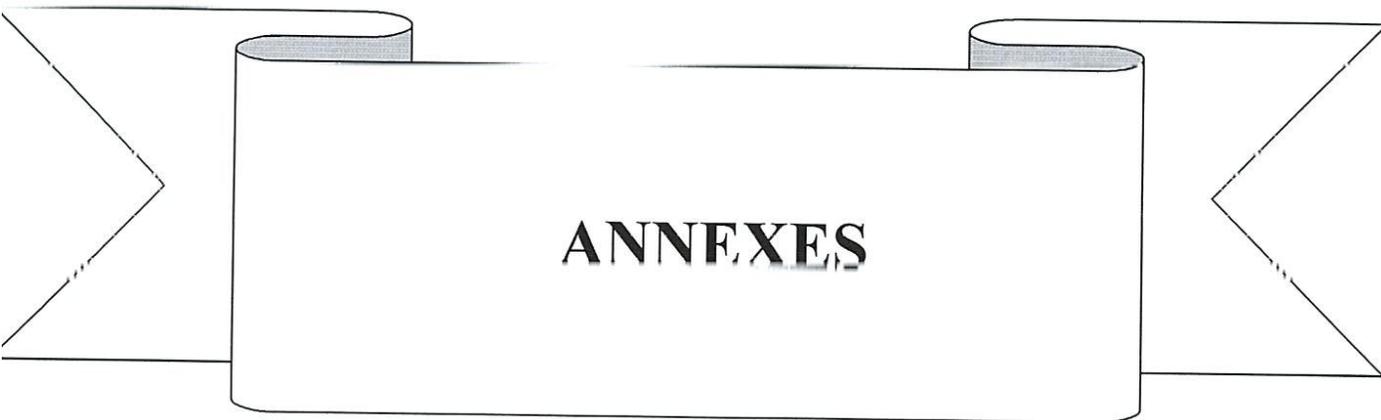
Ce travail axé sur la modélisation moléculaire par docking, a pour but essentiel d'étudier théoriquement l'oxydation de l'acide linoléique.

L'oxydation de l'acide linoléique catalysée par la lipoxygénase suivi par le docking moléculaire, a montré la formation d'un complexe LOX-ligand stabilisé par des liaisons hydrogène et des interactions hydrophobiques et électrostatiques.

Nous avons aussi étudié l'inhibition de l'enzyme lipoxygénase qui catalyse la réaction de l'oxydation de l'acide linoléique par des antioxydants naturels tels que les tocophérols et les polyphénols.

Les résultats exposent que les tocophérols ont des affinités supérieures à celle de l'acide linoléique. Ces tocophérols possèdent une meilleure activité inhibitrice que les polyphénols. Le  $\alpha$ -tocophérol forme le complexe protéine-ligand le plus stable.

Cette stabilité est établie par deux interactions du type liaisons hydrogène : La première est formée entre H de groupement amine du GLY412 et O de groupement hydroxyle du ligand. La deuxième entre O de groupement carbonyle de la fonction acide du GLU99 et H de groupement hydroxyle du ligand avec des longueurs de liaison variables. Les résidus GLU99 et GLY412 qui ont participé dans la formation du complexe LOX-acide linoléique ont été bloqué par la présence des tocophérols.

A decorative banner with a central rectangular section and two pointed ends. The word "ANNEXES" is written in a bold, serif font in the center of the banner. The banner has a slight 3D effect with a grey shadow on the top edge.

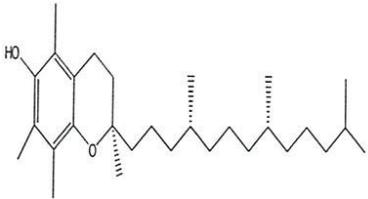
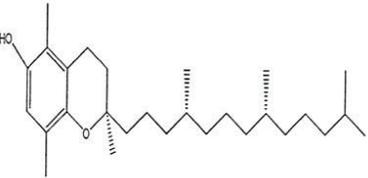
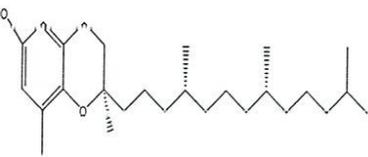
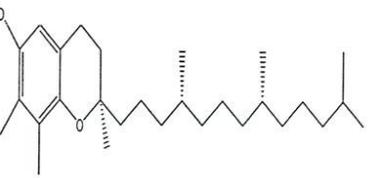
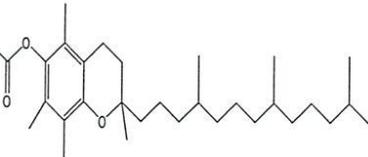
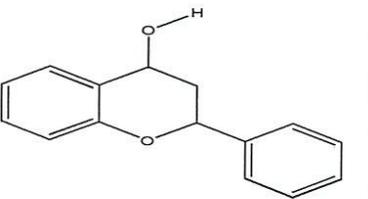
**ANNEXES**

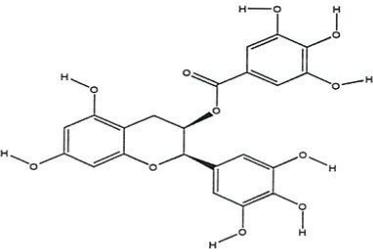
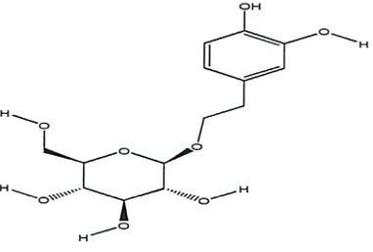
**Annexe 1: Tableau RMSD de 100 complexes**

<b>CODE PDB</b>	<b>RMSD</b>
1TRM	0.15
4OXY	0.02
2Q71	1.18
3A37	2.47
5HVX	0.67
1C23	1.29
1R19	1.49
2O9B	2.50
1SFY	2.31
2O9C	2.43
2ZSC	0.86
3V8K	0.57
4R9J	1.02
4YDQ	3.46
5G26	1.88
1CX2	1.28
3LN1	0.42
3NT1	1.04
1CK6	0.37
1EC3	4.79
1OPT	3.68
1SEU	5.81
1T8I	0.51
1TCX	2.83
2BPY	1.93
2BQV	2.27
8A3H	1.28
5IE3	1.44
3C34	0.95
5K7X	1.12
2IIV	1.08
4G32	0.68
4 M11	0.74
4NRE	1.17
4OTY	1.95
1AQ1	0.71
1JNQ	1.43
1R50	2.17
1VIJ	4.17
1VIK	5.16
2X7S	0.61
2X7T	0.37
2X7U	0.86
3BKK	0.85
3S7S	0.32
3V8I	3.76
3ZM5	1.87
4EEQ	0.79

4GL5	1.25
4LH7	0.72
4LH6	0.80
1EQG	0.87
1EQH	1.01
1HT5	0.97
3DJK	3.29
3KK6	1.22
3N8W	0.39
3N8X	1.09
4FM5	0.41
4M10	0.96
4M11	0.76
6COX	0.79
3KWF	0.61
1YVM	0.47
1YW8	0.53
2AIE	0.37
2AI7	1.09
2P9A	1.26
1XI M	0.75
3GCU	0.52
2WIH	1.33
1LOK	0.77
1KQO	0.32
1FT7	0.59
1CP6	0.93
1MT3	0.91
2B3H	0.75
2UG6	1.25
2P98	0.66
2EVO	1.25
3VH9	0.05
4G1F	0.62
4GLW	0.43
1QIT	0.87
1B59	2.28
1IK1	1.57
3NK2	0.41
4UYU	0.64
2WYZ	1.39
3QBJ	1.36
2I3Z	0.89
4COX	0.85
4OTY	0.99
2ONC	0.82
3GOG	1.02
3GOC	1.07
3RUG	0.93
1HU9	0.45
1NO3	0.46

Annexe 2 : structure des inhibiteurs.

CODE CID	Structure	Nom IUPAC	Nom systématique
14985		(2R)-2,5,7,8-tétraméthyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-triméthyltridécy]-3,4-dihydrochromen-6-ol	$\alpha$ -tocopherol
6857447		(2R)-2,5,8-triméthyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-triméthyltridécy]-3,4-dihydrochromen-6-ol	$\beta$ -tocopherol
92094		(2R)-2,8-diméthyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-triméthyltridécy]-3,4-dihydrochromen-6-ol	$\delta$ -tocopherol
92729		(2R)-2,7,8-triméthyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-triméthyltridécy]-3,4-dihydrochromen-6-ol	$\gamma$ -tocopherol
2117		2,5,7,8-tétraméthyl-2-[(4,8,12-triméthyltridécy]-3,4-dihydrochromen-6-yl] acétate	Acétate d' $\alpha$ -tocophéryle
319213570		2-phényl-3,4-dihydro-2H-chromen-4-ol	2-Phényl-4-chromanol

65064	 <p>The structure shows a 3,4-dihydro-2H-chromene core. At the 3-position, there is a 3,4,5-trihydroxybenzoate group attached via an ester linkage. At the 2-position, there is a 3,4,5-trihydroxyphenyl group attached via a carbon-carbon bond.</p>	<p>[(2R, 3R) -5,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphényl) -3,4-dihydro-2H-chromen-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate</p>	<p>(-) - épigallocatechi ne gallate</p>
5316821	 <p>The structure shows a six-membered oxane ring with a hydroxyl group at the 3-position and a hydroxymethyl group at the 6-position. At the 2-position, there is a 2-(3,4-dihydroxyphenyl)ethoxy group attached via an ether linkage.</p>	<p>(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[2(3,4 dihydroxyphenyl)ethoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol</p>	<p>Hydroxytyrosol</p>