

République Algérienne Démocratique et Populaire
**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

*Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie-Microbiologie*

N° d'ordre : **185 / TE / 2007**

N° de série : **12 / SN / 2007**

*Thèse de Doctorat d'Etat
en Biochimie Appliquée*

Présentée par
Abderrahmane BENSEGUENI

Thème

Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase

Soutenue le 30 décembre 2007

Devant le Jury d'examen :

Président **Mr. D. KHELIFI**
Rapporteur **Mr. M. BENCHARIF**
Examineurs **Mr. H. AIT AMAR**
 Mr. A.E. GUECHI
 Mr. M. LAHOUEL

Professeur **Université de Constantine**
Professeur **Université de Constantine**
Professeur **USTHB Université d'Alger**
Professeur **Université Ferhat Abbès de Sétif**
Maître de Conférences **Université de Jijel**

A la mémoire

de ma Mère

A mon Père

A ma Femme

Chafika

A mes enfants

Mohamed Reda

Meriem

Abdeljalil

A la mémoire

de mon Beau-Père

de mon Beau-Frère

A toute ma famille et ma belle-famille

A toutes et tous, qu'ils trouvent en ce mémoire, ma profonde gratitude, mon éternelle reconnaissance

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur Mustapha BENCHARIF du laboratoire de Chimie des Matériaux de l'Université de Constantine pour m'avoir confié ce sujet que j'ai réalisé avec le plus grand plaisir. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mes remerciements vont également au Professeur David PERAIHIA , directeur de Recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli chaleureusement au Laboratoire de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire de l'Université de Paris Sud, et avoir mis à ma disposition les programmes et moyens informatiques qui ont été essentiels dans l'aboutissement de ce travail.

Je voudrais exprimer ma plus vive gratitude à Monsieur le Professeur Jean-Claude Michalski, Directeur de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à l'université des Sciences et Technologie de Lille 1 et pour toute l'aide qu'il m'a accordée

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Douadi KHELIFI de l'université de Constantine d'avoir accepté de présider ce jury. Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma reconnaissance.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Abdelhadi GUECHI de l'université de Sétif, qui a très amicalement accepté de juger ce travail. Je suis très flatté de le compter parmi les juges.

Je tiens à remercier très sincèrement Monsieur le Professeur H. AIT AMAR de l'université USTHB d'Alger qui a bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse. Je voudrais lui exprimer ma plus vive gratitude.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur LAHOUEL Mesbah, Maître de Conférences à l'université de Jijel, pour avoir accepté sans hésiter d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.

J'exprime ma plus vive reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : LES STRUCTURES MISES EN JEU	4
1-LES LIGANDS	4
1.1-Les Flavonoïdes	4
1.1.1-Découverte des vitamines P par Albert Szent-Györgyi	4
1.1.2-Biosynthèse et structure chimique des flavonoïdes	5
1.1.3-Biodisponibilité des flavonoïdes	7
1.1.4-Propriétés antioxydantes des flavonoïdes	8
1.1.4.1-Stress oxydant	8
1.1.4.2-Les espèces réactives de l'oxygène	8
1.1.4.3-Implications biologiques des flavonoïdes	9
1.1.4.3.1-Capture directe de radicaux libres	9
1.1.4.3.2-Peroxydation lipidique	10
1.1.4.3.3-Interaction avec les cations métalliques	11
1.1.4.3.4-Prooxydation	12
1.1.4.3.5-Inhibition de diverses enzymes	12
1.1.1.3.5-a-Xanthine oxydase	12
1.1.1.3.5-b- NO synthases	13
1.1.1.3.5-c- Lipoxygénases	13
1.1.5-Différentes approches physico-chimiques pour étudier les propriétés des flavonoïdes	13
1.1.6-Choix des flavonoïdes	14
1.2-Les composés de synthèse	15
1.2.1-Les inhibiteurs de la 15-lipoxygénase (15-LOX)	15
1.2.1.1-Les dérivés de la Tryptamine	16
1.2.1.2-Les dérivés du Catéchol	20
1.2.2-Les inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (COX-2)	22
1.2.3-Les inhibiteurs simultanés de la 15-LOX et la COX-2	27
2-LES CIBLES ENZYMATIQUES	27
2.1-Lipoxygénases	28
2.2-Cyclooxygénases	28
CHAPITRE II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND	30
1-RECONNAISSANCE MOLECULAIRE	30
2-DOCKING MOLECULAIRE	32
2.1-Applications	32
2.2-Principes	33
2.2.1-L'approche systématique	33
2.2.2- L'approche par algorithme génétique	34
2.3-Programmes utilisés	35

2.3.1-FlexX	35
2.3.1.1-Flexibilité conformationnelle du ligand	36
2.3.1.2-Niveaux d'interactions	36
2.3.1.3-La construction incrémentale	37
2.3.2-Autodock	39
2.4-Préparation des molécules	43
2.4.1-Les ligands	43
2.4.2-Les protéines	43
CHAPITRE III : LES METHODES D'EVALUATION DES ENERGIES D'INTERACTIONS : LA FONCTION DE SCORE	44
1-METHODES SEMI-EMPIRIQUES	44
2-METHODES EMPIRIQUES	44
3-POTENTIELS BASES SUR DES CONNAISSANCES	46
4-METHODE BASEE SUR LE PREMIER PRINCIPE DE LA THERMODYNAMIQUE	47
CHAPITRE IV RESULTATS ET DISCUSSIONS	49
1-COEFFICIENT DE CORRELATION	49
1.1-Cas de la 15-lipoxygénases	49
1.2-Cas de la cyclooxygénase-2	53
1.3-Conclusion	56
2-APPRECIATION DU RMSD	56
2.1-Interactions avec la lipoxygénase	56
2.2-Interactions avec la cyclooxygénase	59
2.3-Conclusion	61
3-ETUDE DES INTERACTIONS AVEC LES LIPOXYGENASES PAR FLEXX	61
3.1-Interaction avec la 15-lipoxygénase	61
3.1.1-Cas du composé I	62
3.1.2-Cas de la lutéoline	63
3.2-Interactions avec la 3-lipoxygénase	64
4-ETUDE DES INTERACTIONS AVEC LA CYCLOOXYGENASE-2 PAR AUTODOCK	68
4.1-Interaction des ligands co-cristallisés	68
4.2-Interaction des ligands de synthèse	70
4.3-Proposition de la lutéoline comme nouveau ligand	72
5-LE FILTRAGE ADME/Tox	74

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	75
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	77
ANNEXES	

INTRODUCTION

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle. La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles, et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments.

Les flavonoïdes sont des composés naturels qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et légumes consommés quotidiennement par l'être humain. En plus de leur rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêts, telles que des actions anti-radicalaires et antioxydantes. En effet, par complexation avec des enzymes spécifiques, les flavonoïdes sont capables, par exemple, de métaboliser le dioxygène et l'oxyde nitrique ou de stopper l'action de radicaux tels que l'anion superoxyde. En revanche, sous certaines conditions, elles peuvent présenter une activité prooxydante responsable de la peroxydation lipidique et de l'altération de l'ADN et de certaines protéines.

Leur grande variété de structure (plus de 8000 composés identifiés) et d'activités biologiques (antioxydante, prooxydante, et inhibitrice) font des flavonoïdes un objet d'étude particulièrement complexe. Afin d'établir et de rationaliser les relations entre un grand nombre de composés et une activité ou une propriété, les méthodes QSAR/QSPR sont des méthodes de choix. Une revue récente [1] a montré que les multiples modes d'action des flavonoïdes et l'emploi de nombreuses méthodes de détection, d'identification et de mesure de ces processus offre une explication à l'obtention de résultats souvent divergents. Le nombre important de publications concernant ces substances atteste de l'origine très hétérogène des données utilisées pour établir les descripteurs QSAR/QSPR : une recherche sur le Chemical Abstract donne plus de 52000 références avec le seul mot clé *flavonoid*, dont plus de 50% d'entre elles publiées ces dix dernières années.

Afin de rationaliser au mieux les propriétés des flavonoïdes et de déterminer les processus réactionnels impliquant ces composés, nous nous sommes tournés vers les approches de chimie théorique. En regard du nombre de publications énoncé ci-dessus, très peu d'études de modélisation moléculaire sur cette famille de substances naturelles ont été réalisées à ce jour. L'intérêt majeur de ces méthodes est de permettre la caractérisation des grandeurs électroniques, structurales et énergétiques d'un système moléculaire mais également de permettre l'élucidation des mécanismes d'interactions mis en jeu entre un ligand et son récepteur. La puissance de calcul actuelle des ordinateurs, mise en place pour le calcul scientifique intensif, est telle que des systèmes de plus en plus complexes sont à la portée des utilisateurs. Les méthodes de mécanique moléculaire et de dynamique moléculaire permettent de prendre en compte un nombre très important d'atomes et/ou de molécules. Ceci est particulièrement intéressant pour l'étude dynamique de systèmes complexes. Les processus biologiques des flavonoïdes impliquent très souvent des systèmes moléculaires complexes tels qu'une enzyme ou un fragment d'ADN. Il est alors possible de simuler le comportement d'une protéine en phase aqueuse,

d'analyser l'évolution des conformations du complexe protéine-ligand au cours du temps et de caractériser les interactions hydrophiles et hydrophobes entre le ligand et le récepteur.

Avec le développement des outils informatiques dans les 20 dernières années, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire (assemblage ou arrimage moléculaire) a très vite pénétré le domaine de la recherche en biologie. Celui-ci peut-être défini comme la recherche du meilleur appariement entre deux molécules. Le docking moléculaire sert à prédire et à reproduire les interactions protéine-ligand [2,3] comme il peut servir à l'optimisation de molécules et au criblage de base de données. En pharmacie, la découverte et la mise au point de nouvelles substances médicamenteuses peut passer par le criblage de bases de données avec des millions de composés pour une même protéine cible, ce qui ne serait pas réalisable en biologie classique. En général, la cible est une protéine et le ligand peut être une petite molécule organique ou une protéine.

Les lipoxygénases et les cyclooxygénases sont des dioxygénases responsables de l'oxydation des acides gras polyinsaturés [4,5]. L'hydroperoxyde ainsi produit entre dans divers processus cellulaires selon l'acide gras initial et l'enzyme considérée. Par exemple, les leucotriènes, molécules impliquées dans les processus de réponses inflammatoires, sont formés à partir du linoléate au sein de la 5-lipoxygénase. L'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) est en partie la cause des lésions dues à l'accumulation des dépôts lipidiques (essentiellement cholestérol) dans les vaisseaux sanguins provoquant l'artériosclérose. Enfin, les peroxydes interviennent dans certaines pathologies impliquant le stress oxydant [4]. Bloquer la formation de ces métabolites par inhibition de ces enzymes peut constituer un excellent moyen pour contrôler et surmonter de tels troubles.

Dans ce contexte, Il nous a semblé judicieux d'étudier les propriétés biologiques de différentes structures de synthèse dérivées des 1,3-diphényl propyne-2-one et des métabolites secondaires de végétaux relevant de la vaste classe des flavonoïdes notamment. Il s'agit de relier les propriétés structurales de ces molécules avec leur activité biologique par modélisation de leur énergie d'interaction avec la lipoxygénase et la cyclooxygénase en utilisant les techniques de docking moléculaire.:

L'objectif du présent travail est, dans un premier temps, de tester la fiabilité des programmes FlexX et Autodock utilisés dans cette étude. Nous nous sommes servis du RMSD (root mean square deviation) ou critère de déviation de la structure obtenue par docking par rapport à la structure donnée par diffraction aux rayons X. L'analyse par régression linéaire nous a permis de rechercher la corrélation entre l'activité biologique des composés de synthèse, représentée par l'IC₅₀, et leur énergie d'interaction avec les deux enzymes, obtenue par docking moléculaire.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre les flavonoïdes et les deux enzymes considérées dans cette étude: la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Dans la mesure où aucune étude préalable de modélisation par docking moléculaire de ces composés n'a été réalisée, il nous a paru alors important de développer cet

aspect en vue d'évaluer l'énergie d'interaction de ces composés et aussi de visualiser les liaisons qu'ils impliquent avec le site actif de ces enzymes.

Enfin, dans une troisième partie, nous avons tenté de proposer, à la lumière des résultats précédents, des structures nouvelles avec une meilleure affinité vis-à-vis de la cyclooxygénase-2 et de la lipoxygénase-3. Ceci aura pour but d'ouvrir une voie à la chimie de synthèse qui pourra poursuivre ce travail de manière plus appliquée et industrielle.

CHAPITRE I : LES STRUCTURES MISES EN JEU

Pour simuler les interactions entre molécules, il faut bien évidemment une structure des molécules impliquées. L'obtention de telles structures se fait de manière idéale depuis l'expérimentation. Mais cela n'est pas toujours possible, d'autres techniques sont alors disponibles.

1-LES LIGANDS

Quand aucune référence n'est disponible, il est possible, de créer la molécule de manière totalement artificielle. Ceci peut se faire avec des programmes de construction moléculaire comme Sybyl [6]. Ils possèdent une banque d'atomes sous différents états d'hybridation permettant de construire tous les groupements chimiques éventuels. Il est possible de déterminer exactement les torsions. Ce type de construction ne peut se faire sans une étape de minimisation importante de l'énergie potentielle, durant laquelle le choix du champ de force est primordial. Pour les flavonoïdes comme pour les composés de synthèse, cette solution est la seule qui nous permet d'obtenir une structure.

1.1-Les Flavonoïdes

1.1.1- Découverte des vitamines P par Albert Szent-Györgyi

C'est au début du XX^{ème} siècle que les chimistes et les biochimistes se sont initialement attachés à étudier la composition de l'alimentation humaine et animale. Ils ont pour la première fois identifié une classe de composés qui seront appelés, un peu plus tard, vitamines. Leur découverte est due au biochimiste Casimir Funk qui, en 1910, le premier isola la vitamine B₁. Le terme vitamine provient de la contraction du mot *vita*, signifiant vie en latin, et du mot *amine*, terme associé à cette époque aux composés issus de la chimie de l'ammoniac. Le mot vitamine sera par la suite associé aux substances nutritives indispensables dont l'organisme ne peut faire la synthèse.

En 1937, Albert Szent-Györgyi reçoit le prix Nobel de physiologie et de médecine pour ses découvertes dans le domaine des processus de combustions biologiques, notamment concernant la vitamine C et la catalyse de l'acide fumarique [7]. C'est en s'intéressant au transfert d'énergie dans les plantes (métabolisme des carbohydrates) et au processus d'oxydation qu'il découvre une nouvelle classe de composés, les vitamines P [8].

Il travaille sur l'oxydation de la vitamine C et s'intéresse au rôle de la l'enzyme peroxydase. Il démontre qu'une classe de composés polyphénoliques hydrosolubles (flavone, flavonol, flavanone) provenant essentiellement des pigments des plantes, intervient dans l'oxydation de l'acide ascorbique. La peroxydase transforme ces phénols en quinone, lesquels oxydent ensuite la vitamine C. Il détecte une grande concentration de ces composés dans le paprika (*Capsicum annuum*, de la famille des Solanaceae) et s'attache à expliquer leurs propriétés biologiques notamment pour mieux comprendre leur rôle (en synergie avec la vitamine C) dans la guérison

du scorbut. Il en conclut que ces polyphénols agissent sur la protection des vaisseaux sanguins, en réduisant leur perméabilité et leur résistance. Il montre que certains membres de la famille des flavonoïdes possèdent des propriétés similaires aux vitamines et les nomment alors vitamines P. A l'heure actuelle, cette notation a été abandonnée puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines.

Dans les années trente, les flavonoïdes, sont connues essentiellement pour la protection des parois cellulaires et des vaisseaux sanguins ainsi que pour leur rôle dans la pigmentation des végétaux.. Et ce n'est que 60 ans plus tard, avec l'intensification de la recherche sur les radicaux libres que, les scientifiques se sont de nouveaux intéressés aux flavonoïdes. La grande diversité de leurs structures en fait l'une des familles de substances naturelles les plus étendues et confère aux flavonoïdes un large spectre d'activité biologique.

1.1.2-Biosynthèse et structure chimique des flavonoïdes

L'objectif n'est pas de faire ici une étude complète mais de mieux saisir les relations structurales entre les différentes flavonoïdes et de montrer la grande variété de structures de cette famille.

Les composés polyphénoliques des végétaux constituent un groupe d'une très grande diversité dont les flavonoïdes font partie [9-11]. A l'origine, les flavonoïdes proviennent de la désamination d'un acide aminé essentiel, la phénylalanine. La réaction de désamination est catalysée par la phényl ammonia lyase (PAL) et conduit à la formation de cinnamate. Ce dernier est ensuite transformé en acide coumarique puis en 4-coumaroyl-coenzyme A, respectivement par l'enzyme cinnamate-4-hydroxylase (C4H) et la CoA-ligase (4CL). Cette réaction préliminaire précède la biosynthèse de tous les flavonoïdes mais également celle des composés de la voie des phénylpropanoïdes, composés très importants pour la vie d'un végétal. Le coumaroyl-CoA est ensuite transformé en chalcone en faisant intervenir le malonyl-CoA et la chalcone synthase. Le motif chalcone est ainsi le point de départ de la synthèse des différents groupes des flavonoïdes (Fig. 1).

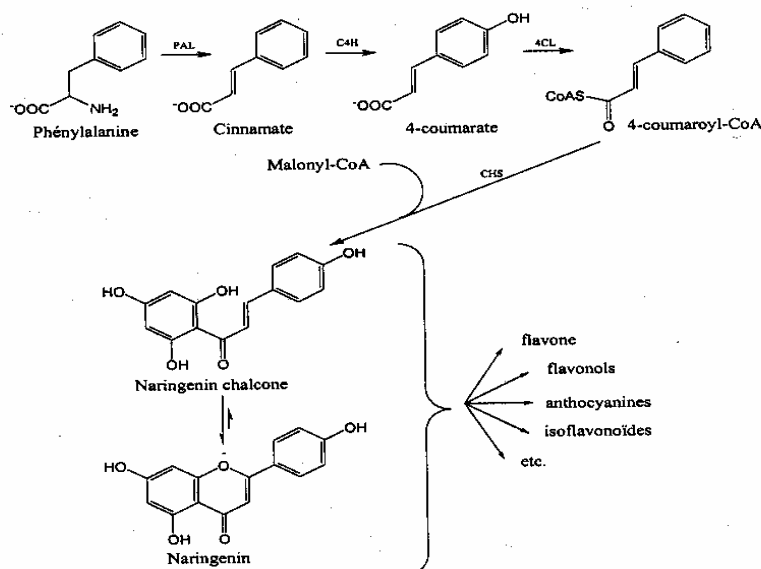


Figure 1 : Etapes de la biosynthèse des Flavonoïdes

Leur structure chimique commune est le motif flavone dérivant lui-même du motif flavane constitué de deux noyaux aromatiques A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C [12-14]. La figure 2 présente la nomenclature des flavonoïdes ainsi que la numérotation utilisée.

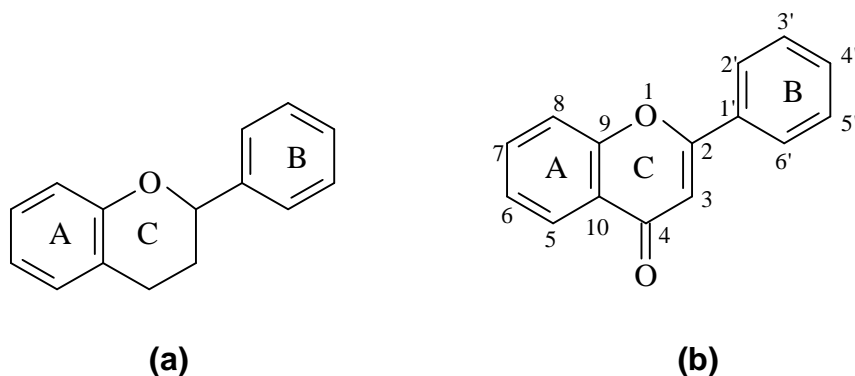


Figure 2 : motif flavane (a) et flavone (b) et numérotation systématique

Les flavonoïdes sont classés selon plusieurs critères : présence ou non d'une double liaison en position 2, et présence ou non d'un groupement hydroxyle en position . Des groupements hydroxyles (et méthoxyles) peuvent le plus souvent se situer en position 2', 3', 4' et 5' ainsi qu'en position 5 et 7. les isoflavones proviennent d'une transposition du noyau aromatique du carbone 2 vers le carbone 3 ; les flavones et flavonols d'une oxydation (formation de la double liaison sur le cycle C) respectivement des flavanones et des dihydroflavonols (Fig. 3).

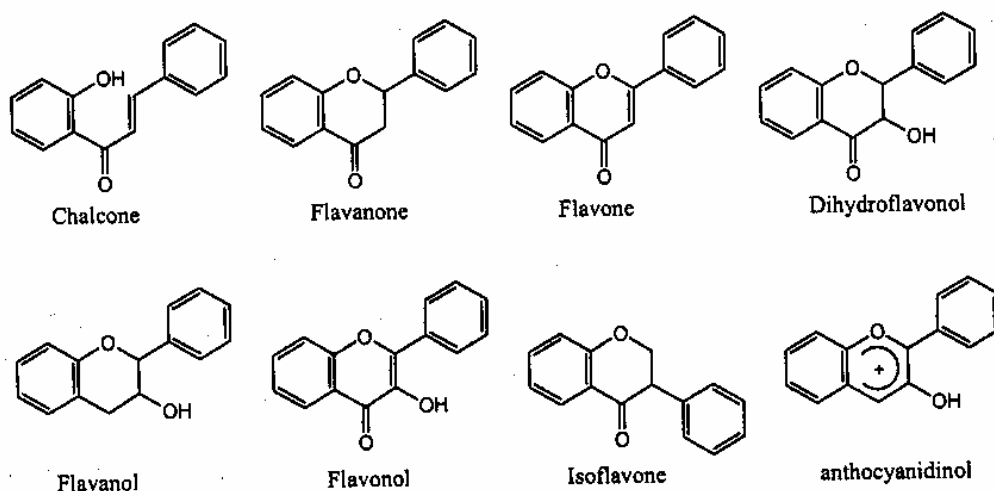


Figure 3 : Structure des différents sous-groupes de flavonoïdes

Les flavonoïdes se rencontrent soit sous forme glycosylée (O et C-hétérosides) soit sous forme d'aglycone ou forme non substituée par un ose. La substitution par les sucres peut avoir lieu soit en position 3, 5 ou 7 des flavones et flavonols. Le cas des flavanols est singulier car en plus des formes glycosylées, il est possible de les rencontrer substituées par l'acide gallique ou encore sous formes polymériques. La

configuration des carbones asymétriques augmente la complexité de structure des flavonoïdes (Fig. 4)..

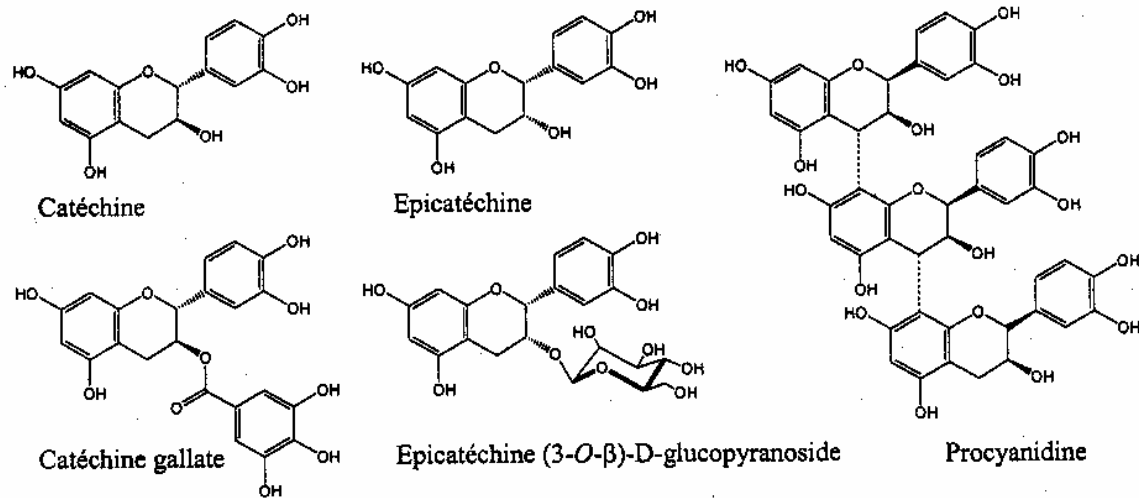


Figure 4 : complexité structurale des flavanols

Cette grande diversité de structures fait des flavonoïdes l'une des plus grandes familles de substances naturelles connues. En effet, les techniques d'analyse récentes ont permis d'identifier plus de 8000 flavonoïdes [14-17].

1.1.3-Biodisponibilité des flavonoïdes

L'organisme humain ne synthétise pas de flavonoïdes mais, de manière générale, elles sont largement rencontrées dans le règne végétal. Elles sont cependant rares chez les végétaux inférieurs puisque ce sont des métabolites secondaires -composés non issus de la photosynthèse mais de réactions chimiques ultérieures. Nous retrouvons les flavonoïdes dans notre alimentation quotidienne [12,14,18,19]. Les fruits (orange, raisin, etc..) , les légumes (oignon, laitue, etc..) mais également les graines (fève, cacao) ou encore les racines des plantes sont, pour l'homme , des sources importantes de flavonoïdes. Les feuilles de thé sont également connues pour être riches en flavonoïdes.

La quercétine et la lutéoline sont parmi les composés les plus représentatifs de cette famille en cela qu'elles présentent une activité importante dans les processus biologiques impliquant ces composés [20]. La consommation journalière en flavonoïdes n'a jamais été étudiée de manière systématique au vu du très grand nombre de composés et de matrices naturelles à prendre en considération. Les seules estimations précises sur la consommation en flavonoïdes concernent essentiellement les flavonols et les flavones [21,22]. Ainsi la consommation journalière en flavones et flavonols est de l'ordre de quelques dizaines à une centaine de mg.

La recherche sur les flavonoïdes a reçu un écho particulier au sein de la communauté scientifique lors de la découverte du paradoxe français [23-25]. En effet, des études épidémiologiques ont montré qu'une population ayant une alimentation riche en acides gras polyinsaturés présentait un taux de mortalité accru dû aux maladies cardiovasculaires. En revanche, les populations méditerranéennes, bien que présentant ce même type d'alimentation, étaient moins sujettes à ces maladies. L'explication pourrait provenir en partie de la consommation quotidienne de flavonoïdes présents dans les jus de raisin et dans l'huile d'olive. Ces études suggèrent un rôle protecteur des flavonoïdes contre les maladies coronariennes, en empêchant le dépôt de graisses sur les parois des artères. Ces travaux ont été initiés dans les années 1990 et dès lors les chercheurs ont tenté de mieux comprendre les mécanismes d'action des flavonoïdes.

1.1.4-Propriétés antioxydantes des flavonoïdes

1.1.4.1-Stress oxydant

Le stress oxydant se définit comme étant le résultat d'un déséquilibre en faveur des espèces prooxydantes par rapport au système de défense de l'organisme (antioxydants) contre ces substances. Ce déséquilibre a pour conséquence l'apparition de dégâts souvent irrésistibles pour les cellules [26].

La source principale des Espèces Réactives de l'Oxygène ERO dans les cellules des mammifères est d'origine enzymatique. La NADPH oxydase, les peroxyosomes, la xanthine oxydase, les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont parmi les sources endogènes d'ERO les plus importantes. Les mitochondries, éléments essentiels au fonctionnement cellulaire puisqu'elles métabolisent le dioxygène, produisent également en permanence des ERO. Ces ERO sont particulièrement réactives et sont dotées de propriétés oxydantes qui les amènent à réagir avec toutes une série de substrats biologiques (lipides, protéines, ADN,...). Au niveau moléculaire, les ERO peuvent aussi agir comme messagers de secondaires et activer différents facteurs ou gènes impliqués dans le développement de diverses pathologies. Les ERO sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, l'absorption d'alcool ou de médicaments, l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme. Toutes ces situations provoquent une surproduction d'ERO dans notre organisme.

Pour se protéger contre les effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de contrôler et parfois réguler la production des ERO. Dans ces systèmes de défense, on inclut des composés antioxydants (glutathion, vitamines A, C et E, etc.), des oligoéléments (cuivre, zinc, sélénium, etc..) ainsi que des protéines (superoxyde dismutase, catalase, glutathion transférase, etc..) qui régulent la concentration des ERO. En tant qu'antioxydants exogènes, les flavonoïdes entrent également dans le système de défense contre les stress oxydant et peuvent intervenir à différents niveaux.

1.1.4.2-Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non-radicalaires très réactifs. Certaines espèces réactives de l'azote (ERA) sont parfois mentionnées comme appartenant à cette classification puisqu'elles possèdent un atome d'oxygène et qu'elles se comportent de manière similaire (espèces généralement radicalaires, pouvoir oxydant important, générées et régulées par l'organisme) aux ERO vis-à-vis du stress oxydant. Les principales espèces réactives de l'oxygène sont regroupées dans le tableau 1

Tableau 1 : espèces réactives de l'oxygène

ERO	Formule chimique
Oxygène moléculaire	O ₂
Dioxygène singulet	O ₂
Anion superoxyde	O ₂ ^{·-}
Radical hydroxyle	OH [·]
Radical hydroperoxyl	HOO [·]
Radical peroxyde	ROO [·]
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	ROO [·]
Peroxyde d'hydrogène	H ₂ O ₂
Radical oxide nitrique	NO [·]
Peroxinitrite	ONOO [·]
Hypochlorite	ClO ⁻

1.1.4.3-Implications biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant [12, 13,27-29] : par capture directe des espèces réactives de l'oxygène, par chélation de métaux de transition comme le fer et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production d'ERO. Sous certaines conditions, les flavonoïdes sont susceptibles de se comporter comme agent prooxydant [30-35].

1.1.4.3.1-Capture directe de radicaux libres

Les flavonoïdes possèdent une structure chimique aromatique permettant une délocalisation électronique importante, donc une stabilisation de leurs formes radicalaires. C'est pourquoi, les propriétés antioxydantes des flavonoïdes sont souvent associées à leur potentiel radicalaire.

De nombreuses études soutiennent le fait que l'activité antioxydante des flavonoïdes est essentiellement liée à leur capacité à piéger les espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux superoxyde, hydroxyle et alkyle [36-43]. La plupart des résultats proviennent d'études expérimentales de radiolyses pulsées, initialement développées par l'équipe de Bors et coll. [36,44], permettant de générer spécifiquement les formes réactives des flavonoïdes capables de capturer ces radicaux. Cette approche est combinée avec diverses techniques d'analyse physico-chimique (spectroscopie d'absorption UV/vis notamment) afin de déterminer les constantes de vitesse associées à ces processus de capture des composés radicalaires [37,38,43,45-48].

La méthode spectrophotométrique de prédiction du pouvoir antioxydant vis-à-vis des ERO, mise au point au début des années 1990 par Miller et coll. [49-53], reste d'actualité. Il s'agit de mesurer le pouvoir antioxydant d'un composé vis-à-vis du 2,2' -azinobis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), et de le comparer à un antioxydant de référence, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchromane-2), analogue de la vitamine E mais soluble dans l'eau. Cela a permis de comparer une série de flavonoïdes et de prédire certaines des activités antioxydantes de celles-ci. Cette méthode a donné le nom à un indice de pouvoir antioxydant, le CAET (Capacité Antioxydante Equivalente au Trolox). Il s'agit de la concentration exprimée en millimoles d'une solution de Trolox ayant la même activité antioxydante qu'une solution millimolaire de la substance testée. En conséquence, plus la valeur du CAET est élevée plus le composé possède une activité antioxydante importante.

D'autres méthodes basées sur le même principe existent. On pourrait citer la méthode DPPH [54] (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle). Ce dernier est un radical libre stable possédant une couleur rouge en solution (maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm) et virant au jaune lorsqu'il est capturé par un antioxydant.

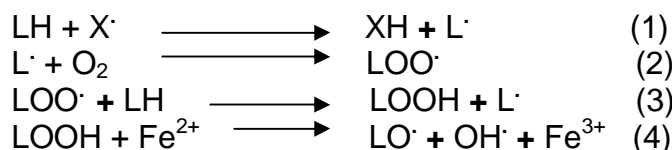
1.1.4.3.2-Peroxydation lipidique

Les lipides sont les constituants essentiels des membranes cellulaires et des lipoprotéines. Leur peroxydation est un processus qui intervient dans certaines pathologies impliquant le stress oxydant [26]. La peroxydation lipidique est un mécanisme de dégradation en chaîne des acides gras conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, responsables notamment de la diminution de la fluidité membranaire.

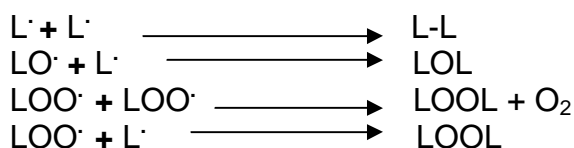
L'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) est en partie la cause des lésions dues à l'accumulation des dépôts lipidiques (essentiellement cholestérol) dans les vaisseaux sanguins. Le mécanisme d'oxydation des LDL reste encore l'objet de débats et de nombreux laboratoires travaillent actuellement à une meilleure compréhension de cette étape importante dans l'artériosclérose. Depuis les résultats obtenus par Rankin et coll. en 1988 [55,56] démontrant le rôle inhibiteur des flavonoïdes sur l'oxydation in vitro des lipoprotéines de faible densité (LDL), cette famille de substances naturelles a fait l'objet de très nombreuses publications sur le sujet.

Il est admis que les acides gras polyinsaturés sont oxydés en présence de radicaux libres et d'un cation métallique (Fe^{2+} ou Cu^+) [57]. Dans les équations ci-dessous, LH équivaut à un acide gras polyinsaturé, X \cdot à un radical libre, L \cdot au radical

alkyl dérivant de l'abstraction de H[•] par le radical libre X[•]; LOO[•] au radical peroxyde, LOOH à l'hydroperoxyde, et LO[•] au radical alkoyle.



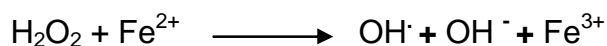
L'équation (1) correspond à la phase d'initiation de la peroxydation lipidique; les équations (2), (3) à la phase de propagation du radical. Un ion Fer (II) réagit généralement avec l'hydroperoxyde produit lors de l'étape (3) pour former un radical alkoyle et d'un ion hydroxyle (4). Simultanément les réactions de terminaison font intervenir diverses espèces :



Les flavonoïdes peuvent intervenir à différents niveaux de ce processus de peroxydation [58-60]. Elles sont capables de capturer directement les composés radicalaires, et ainsi d'interrompre la propagation de la réaction en chaîne radicalaire. Les flavonoïdes présentes à la surface des membranes sont capables de régénérer la vitamine E, l'un des antioxydants essentiels dans la protection des membranes cellulaires [61-63]. Les flavonoïdes sont aussi capables d'inhiber les enzymes responsables de la production des ERO : la lipoxygénase et la cyclooxygénase et donc d'empêcher la production de l'hydroperoxyde LOOH [63-68]. Enfin, étant de bons chélatants, elles sont capables de coordonner le fer libre et donc d'empêcher la formation des ERO [69-75].

1.1.4.3.3-Interaction avec les cations métalliques

Les ions métalliques présents dans notre organisme, comme le fer et le cuivre, peuvent être à l'origine de la production de radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce moins réactive H₂O₂ via la réaction de Fenton [26,57] :



Les flavonoïdes sont connues pour leur capacité à former des complexes stables avec les ions métalliques et sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production d'ERO. La capacité des flavonoïdes à interagir avec les cations métalliques peut être mise en évidence par les modifications spectrales provoquées par la complexation. Les effets bathochromes au maximum d'absorption sont caractéristiques de la chélation du métal avec le composé. Plus le complexe est stable plus le décalage vers les grandes longueurs d'onde sera important. Les études d'électrochimie sont ici utiles pour obtenir les potentiels d'oxydation des différents couples mis en jeu (flavonoïde/métal) [73]. Il est alors possible de classer les flavonoïdes selon leur capacité à chélater un cation, et par voie de conséquence selon leur activité antioxydante. Il s'avère que l'un des

éléments essentiels d'une flavonoïde concernant sa capacité à complexer un métal est la présence ou non d'un motif catéchol [74].

Des études récentes [74,76-78] laissent supposer que les flavonoïdes, en subissant une réaction d'oxydoréduction en présence de métal, possèdent une activité accrue. La forme radicalaire ainsi obtenue, une semiquinone, serait plus active que la forme initiale.

1.1.4.3.4- Prooxydation

Un nombre croissant de publications traitent de l'effet prooxydant des flavonoïdes. Certains auteurs attribuent ces effets à la capacité d'autoxydation des flavonoïdes, engendrant les formes quinones et semi-quinones ainsi que la production de ERO [30,31,33,79-83]. La présence d'une double liaison en position 2,3 et de la fonction carbonyle en position 4 permet une isomérisation de la forme quinone en quinone méthides connues pour être des formes responsables d'altérations sur les acides aminés et nucléiques. Les travaux sont très récents et les mécanismes encore mal identifiés.

1.1.4.3.5- Inhibition de diverses enzymes

Les flavonoïdes sont responsables de l'inhibition de très nombreuses enzymes. Deux revues très complètes rendent compte de l'incroyable potentialité des flavonoïdes [84,85]. Les enzymes directement impliquées dans le stress oxydant et pouvant être inhibées par les flavonoïdes sont la glutathione S-transférase, les lipoxygénases, les cyclooxygénases, la xanthine oxydase et les nitrique oxyde synthases (NOS), certaines flavonoïdes inhibent les kinases. A titre d'exemple, la quercétine et la myricétine inhibent la phosphoinositide 3-kinase, protéine intervenant dans la signalisation cellulaire. Les modes d'inhibition peuvent être différents selon la flavonoïde et l'enzyme étudiées.

1.1.4.3.5-a-Xanthine oxydase

Depuis que Mc Cord et Fridovich [86] ont démontré en 1968, la participation de la xanthine oxydase dans la production de radicaux libres, cette enzyme a été largement étudiée. Elle catalyse la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et cette dernière en acide urique. Cette réaction s'accompagne de la génération des ERO O_2^- et H_2O_2 à partir du dioxygène (Fig. 5)

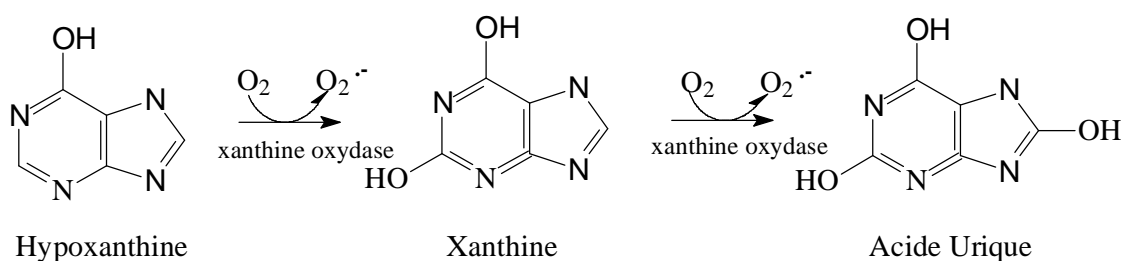


Figure 5 : processus enzymatique catalysé par la xanthine oxydase

A l'aide des méthodes de chimie quantique, il a été montré une similarité au niveau structural et électronique du cycle purique de la xanthine et du cycle A des flavonoïdes [87].

D'autres facteurs entrent en jeu comme l'absence de substitution en position 6 ou la présence d'hydroxyle en position 3, 7 et /ou 5 [27]. Les flavonoïdes avec de tels critères sont des inhibiteurs potentiels. Différents modes d'inhibition ont été rencontrés : compétitif, non compétitif ou mixte [27,88]

1.1.4.3.5-b- NO synthases

Les nitrique oxyde synthases constituent un groupe d'enzymes responsables de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) à partir de l'atome terminal d'une L-arginine en présence d'oxygène (O₂) et de différents cofacteurs comme la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NAPDH) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) [57]. Un atome de fer (au sein d'un hème) est responsable de la réaction d'oxydo-réduction nécessaire à la formation de monoxyde d'azote.

De nombreux travaux traitent de ce sujet et font références aux flavonoïdes comme inhibiteurs potentiels de la NOS [88-92].

1.1.4.3.5-c- Lipoxygénases

Les lipoxygénases constituent une classe d'enzymes à fer non-hème responsables de l'oxydation des acides gras polyinsaturés [26,57]. L'hydroperoxyde ainsi produit entre dans divers processus cellulaires selon l'acide gras initial et la lipoxygénase considérés. Par exemple, les leucotriènes, molécules impliquées dans les processus de réponses inflammatoires, sont formées à partir du linoléate au sein de la 5-lipoxygénase.

Bien que le cycle catalytique des lipoxygénases ait été étudié et le mécanisme d'oxydation des acides gras soit relativement bien connu, leur inhibition par les flavonoïdes a fait l'objet d'études récentes [63-68, 93]. A titre d'exemple, l'inhibition de la 3-lipoxygénase par la quercétine suit un mécanisme particulier. En effet, la quercétine semble être dégradée au sein de l'enzyme, et le produit de dégradation (l'acide protocatéchuique) serait responsable de l'inhibition de cette enzyme [67].

1.1.5-Différentes approches physico-chimiques pour étudier les propriétés des flavonoïdes.

Le champ d'investigation est vaste lorsque l'on cherche à connaître les propriétés d'une substance naturelle. Dans le cas des flavonoïdes, les méthodes employées sont nombreuses et nous allons nous focaliser sur certaines d'entre elles. Les paramètres physico-chimiques les plus importants pour connaître les propriétés antioxydantes d'une flavonoïde sont les potentiels redox, les valeurs de pK et les paramètres cinétiques de capture de radicaux libres.

La radiolyse pulsée permet de contrôler les radicaux initialement formés et les coefficients de vitesse de capture des ERO par les flavonoïdes peuvent être déterminés par différentes méthodes [37,38,43,45-48] dont la plus utilisée est la spectrophotométrie UV/vis. Deux bandes d'absorption sont caractéristiques des flavonoïdes. La première se situe dans la région de 210-290 nm et la deuxième à 320-380 nm (pouvant aller jusqu'à 490-540 nm dans le cas des anthocyanes).

Il existe d'autres méthodes couramment employées dans la chimie radicalaire comme la spectroscopie ESR ou EPR [30,42,47,70,94].

Les structures obtenues par diffraction des RX sont traditionnellement utilisées pour obtenir les structures cristallisées des protéines et/ou des complexes enzymes/substrats [67,95]. Elles sont également employées pour connaître les caractéristiques de chélation des flavonoïdes vis-à-vis d'un métal de transition [96].

En tant que composés possédant de nombreux groupements OH, les constantes de dissociation de chaque fonction hydroxyle ne sont pas facilement accessibles [97,98]. Les propriétés acido-basiques des flavonoïdes ne peuvent pas être déterminées par titrations spectrophotométriques car ces méthodes ne donnent qu'une valeur de pK macroscopique. Seules les études par RMN sont capables de donner accès aux constantes de dissociation individuelles des groupements hydroxyles [99].

Les potentiels redox des flavonoïdes sont obtenus par les méthodes électrochimiques comme la voltampérométrie cyclique [97,100]. Là encore, la détermination n'est pas aisée puisque les réactions aux électrodes génèrent des radicaux phénoxyes qui sont susceptibles de se polymériser et de se fixer sur l'électrode.

Toutes ces méthodes fournissent d'excellents renseignements sur le comportement des flavonoïdes et de précieux descripteurs moléculaires pour les approches basées sur les relations structures/propriétés et structures/activités (QSPR et QSAR) [101-104]. Malgré la diversité de structures des flavonoïdes, il est possible d'établir des correspondances entre une structure particulière et une activité [105]. La présence du motif catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4 semblent être les facteurs déterminants de l'activité antioxydante des flavonoïdes.

Les méthodes de chimie théorique donnent accès à des informations au niveau moléculaire comme : la densité électronique ou de spin dans le cas des formes radicalaires [106-110], les énergies des niveaux HOMO et LUMO utiles dans les études de réactivité [102,108,111,112], l'énergie de la barrière de rotation de l'axe C2-C1' [108,113], les énergies de dissociation de liaisons O-H (appelée BDE pour *Bond Dissociation Energy*) [114]. Ces méthodes, permettent de mieux comprendre le rôle d'un composé dans des processus biologiques encore mal identifiés [115]. Dans le cas présent, les modes d'action des flavonoïdes dans les processus enzymatiques ne sont pas clairement déterminés. L'emploi de ces méthodes ainsi que celui de la dynamique moléculaire permet de mieux comprendre la réactivité de ces systèmes et les interactions entre les différents protagonistes.

C'est dans ce même contexte que nous orientons nos travaux de modélisation moléculaire inhérents aux interactions des flavonoïdes et des composés de synthèse dérivés des 1,3 diphénylprop-yne-2-ones avec les lipoxigénases et les cyclooxygénases, à l'aide des techniques de docking (arrimage) moléculaire.

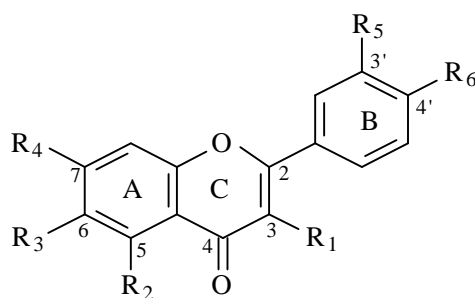
1.1.6-Choix des flavonoïdes

Dans cette étude, nous nous sommes limités à deux types de molécules les plus représentatifs de la famille des flavonoïdes : les flavones et flavonols. Ces molécules interviennent dans la quasi-totalité des mécanismes cités précédemment et se trouvent être l'objet de la plupart des études. Des études récentes ont montré

que les deux flavones lutéoline et baicaléine et la flavonol fisétine (Tab.2) sont des inhibiteurs potentiels de la 15-lipoxygénase [116,117]. La structure particulière de leur squelette de base leur confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'une flavonoïde : le cycle catéchol et l'insaturation en position 2 conjuguée avec la fonction carbonyle en position 4. Pour toutes ces raisons, ces trois flavonoïdes sont les molécules modèles par excellence pour aborder l'étude des interactions enzyme-inhibiteur à l'aide des méthodes de chimie théorique, notamment la modélisation par docking moléculaire.

Tableau 2. Structure chimique des flavonoïdes inhibant l'enzyme 15-LOX (le squelette de base figure en dessous du tableau)

Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Lutéoline	H	OH	H	OH	OH	OH
Baicaléine	H	OH	OH	OH	H	H
Fisétine	OH	H	H	OH	OH	OH



En plus de ces trois flavonoïdes, nous avons utilisés deux autres composés polyphénoliques naturels : l'acide nordihydroguaiarétique (ANDG) et le jaspauinol . Ces molécules ont servies avec les composés de synthèse à tester les programmes FlexX et Autodock. Leur structure moléculaire est donnée avec les composés de synthèse.

1.2-Les composés de synthèse

Beaucoup de travaux sur l'activité biologique des composés de synthèse furent menés aussi bien sur les cyclooxygénases [118-123] que sur les lipoxygénases [124-127]. Nous retrouvons également des composés de synthèse qui inhibent simultanément les lipoxygénases et les cyclooxygénases [128]. Leur dualité ainsi que la disponibilité des valeurs de leur IC₅₀ sont parmi les critères de choix de ces molécules que nous avons retenues pour l'étude de simulation de l'activité biologique par FlexX et Autodock.

1.2.1-Les inhibiteurs de la 15-lipoxygénase (15-LOX)

Les inhibiteurs utilisés dans cette partie du travail sont des dérivés de la tryptamine et du catéchol. Ils nous ont servis à tester la fiabilité des méthodes FlexX et Autodock à l'aide du coefficient de corrél

1.2.1.1-Les dérivés de la Tryptamine

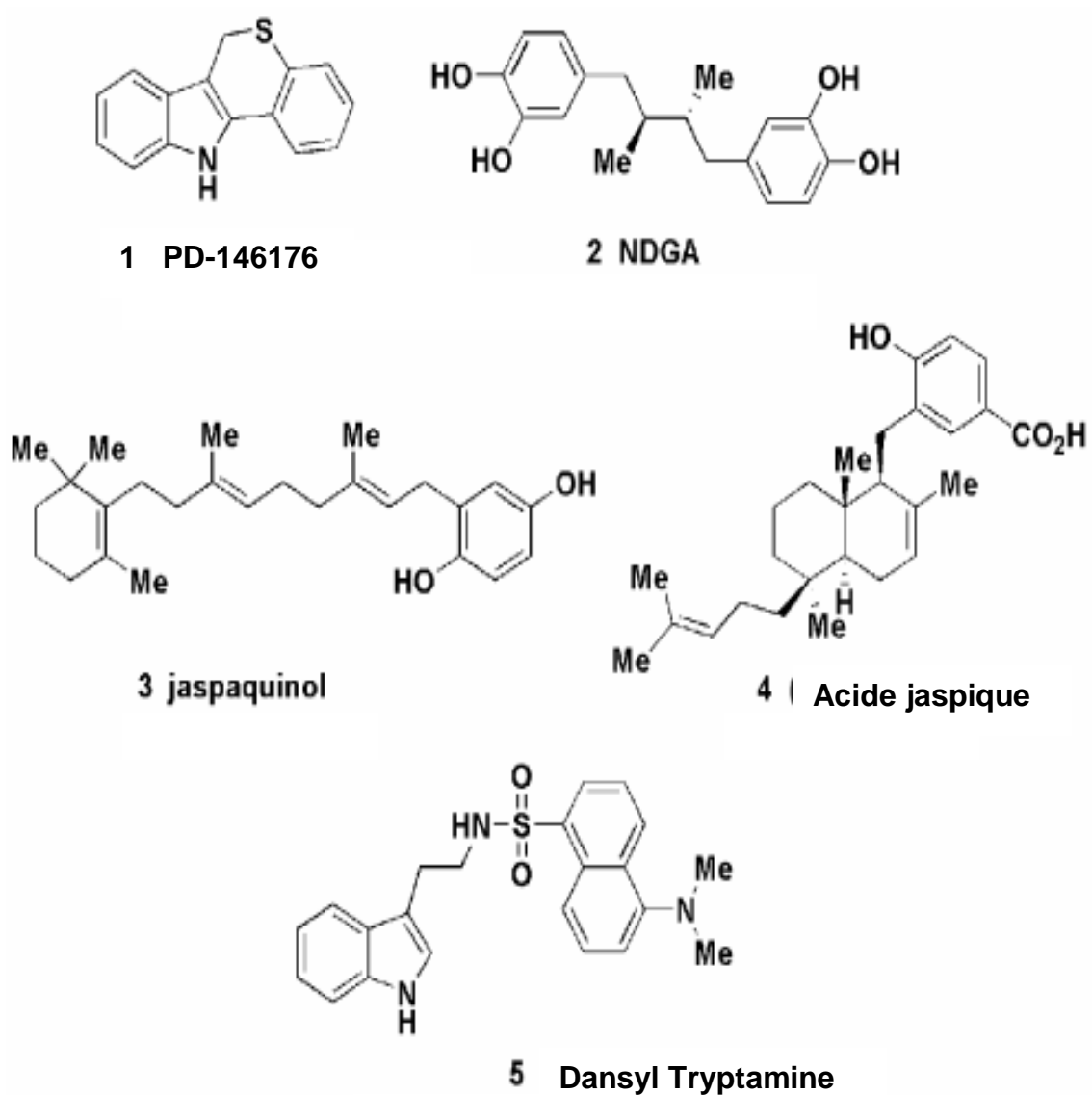
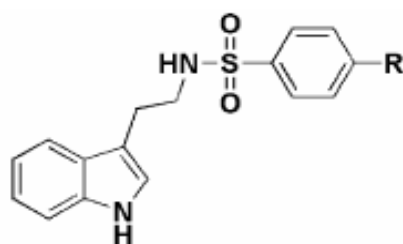
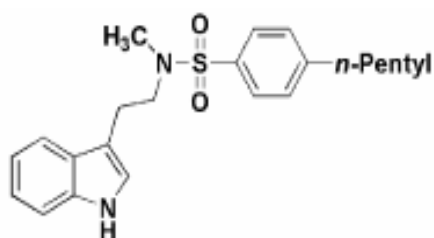


Figure 6: Structures de quelques inhibiteurs connus de la 15-lipoxygénase

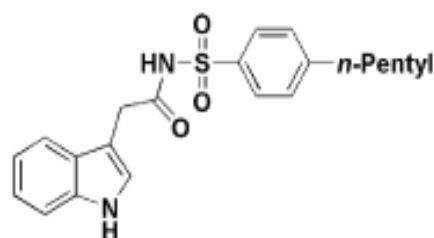
Tableau 3 : Structures des dérivés sulfonamides tryptamine



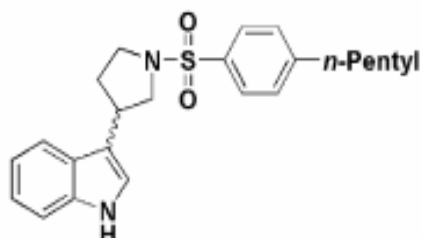
Composé	R
6	CH ₃
7	Et
8	<i>n</i> -Propyl
9	<i>n</i> -Butyl
10	<i>n</i> -Pentyl
11	Ph
12	2-Me-Ph
13	3-Me-Ph
14	4-Me-Ph
15	4-Et-Ph
16	4- <i>i</i> -Pr-Ph
17	4- <i>n</i> -Butyl-Ph
18	4- <i>i</i> -Butyl-Ph
19	4- <i>t</i> -Bu-Ph
20	4-OMe-Ph



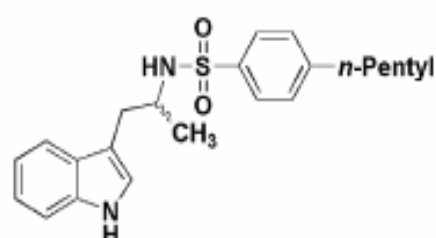
22
(IC₅₀ > 10 μM)^a



23
(IC₅₀ > 10 μM)^a



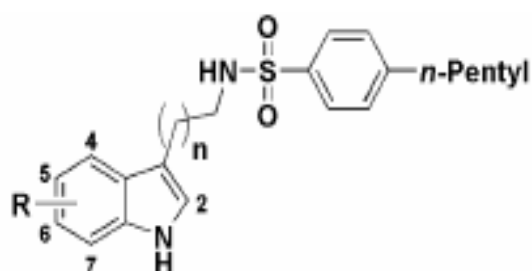
24



25

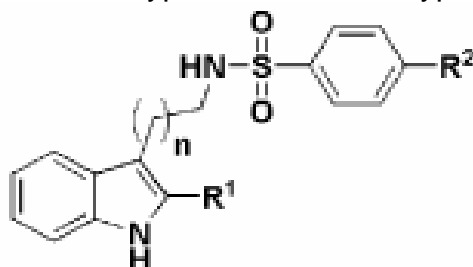
Figure 7: Structures particulières de quelques dérivés de la tryptamine

Tableau 4 : Autres dérivés de la tryptamine et de l'homotryptamine



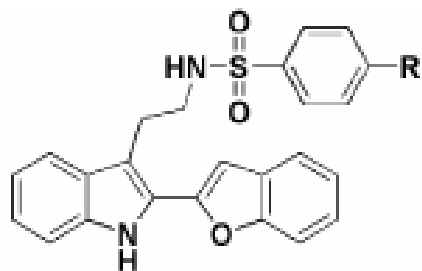
Composé	n	R
25	2	H
26	3	H
27	1	7-CH ₃
28	1	5-CH ₃
29	1	5-F
30	1	6-F
31	1	6-CO ₂ CH ₃
32	1	6-CO ₂ H

Tableau 5 : Dérivés sulfonamides tryptamine et homotryptamine substitués en C-2



Composé	n	R ¹	R ²
33	1	(4-OCH ₃)Ph	CH ₃
34	1	(4-OCH ₃)Ph	<i>n</i> -Butyl
35	1	(4-OCH ₃)Ph	<i>n</i> -Pentyl
36	1	(4-OCH ₃)Ph	CO ₂ H
37	1	(4-OCH ₃)Ph	Ph
38	1	Ph	<i>n</i> -Pentyl
39	1	(3-CH ₃)Ph	<i>n</i> -Pentyl
40	1	(4-Cl)Ph	<i>n</i> -Pentyl
41	1	(4-OEt)Ph	<i>n</i> -Pentyl
42	1	(4-CF ₃)Ph	<i>n</i> -Pentyl
43	1	(2,5-DiOMe)Ph	<i>n</i> -Pentyl
44	2	2-Benzofuranyl	<i>n</i> -Pentyl
45	2	2-Benzofuranyl	<i>n</i> -Pentyl
46	1	2-Benzofuranyl	Ph
47	1	2-Dibenzofuranyl	<i>n</i> -Pentyl

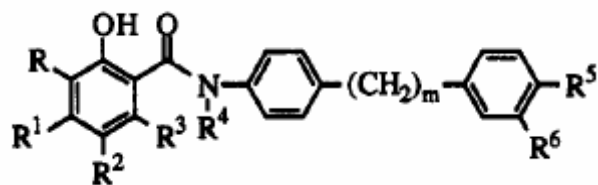
Tableau 6 : Structures des dérivés 2-(2'-benzofuranyl) sulfonamides tryptamine



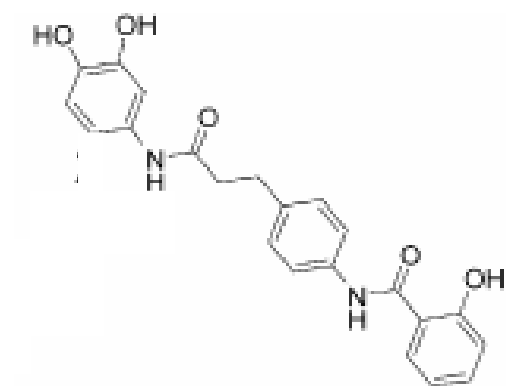
Composé	R
48	CH ₃
49	Br
50	C(O)NHPh
51	C(O)NH(4-OCH ₃)Ph
52	C(O)NH <i>n</i> -butyl
53	C(O)NHcyclohexyl
54	C(O)NHNH ₂
55	C(O)N(CH ₃)- (CH ₂) ₂ OH
56	C(O)N(CH ₃)- (CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂

1.2.1.2-Les dérivés du Catéchol

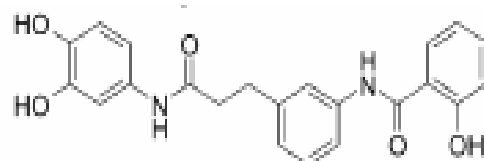
Tableau 7 : Structure moléculaire des dérivés du catéchol



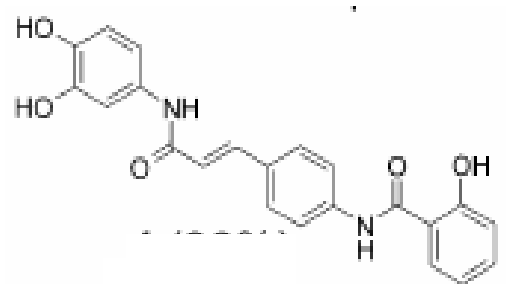
Composé	R	R1	R2	R3	R4	R5	R6	m
1	H	H	H	H	H	OH	OH	2
2	H	H	H	H	H	OMe	OMe	2
3	H	Me	H	H	H	OH	OH	2
4	H	Me	H	H	H	OH	OMe	2
5	H	Me	H	H	Me	OH	OH	2
6	H	H	H	H	H	OH	OH	3
7	H	H	H	H	H	OH	OH	4
8	Cl	H	H	H	H	OH	OH	2
9	CO ₂ H	H	H	H	H	OH	OH	2
10		H	H	H	H	OH	OH	2
11	H	OH	H	H	H	OH	OH	2
12	H	Cl	H	H	H	OH	OH	2
13	H	Ph	H	H	H	OH	OH	2
14	H	H	Br	H	H	OH	OH	2
15		H	H	H	H	OH	OH	2
16	H	H		H	H	OH	OH	2



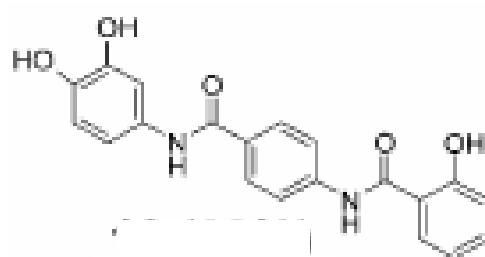
Composé 17



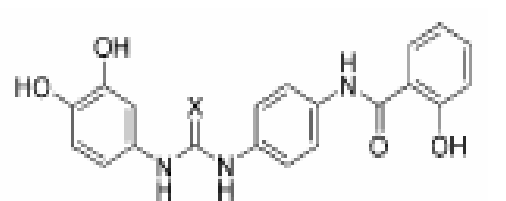
Composé 18



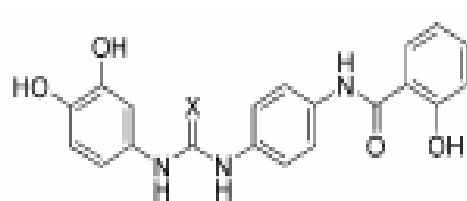
Composé 19



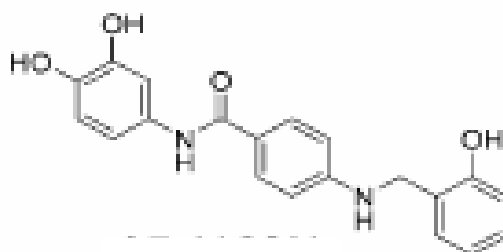
Composé 20



Composé 21 (X = O)



Composé 22 (X = S)



Composé 23

Figure 8 : Autres structures dérivées du catéchol

1.2.2-Les inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 (COX-2)

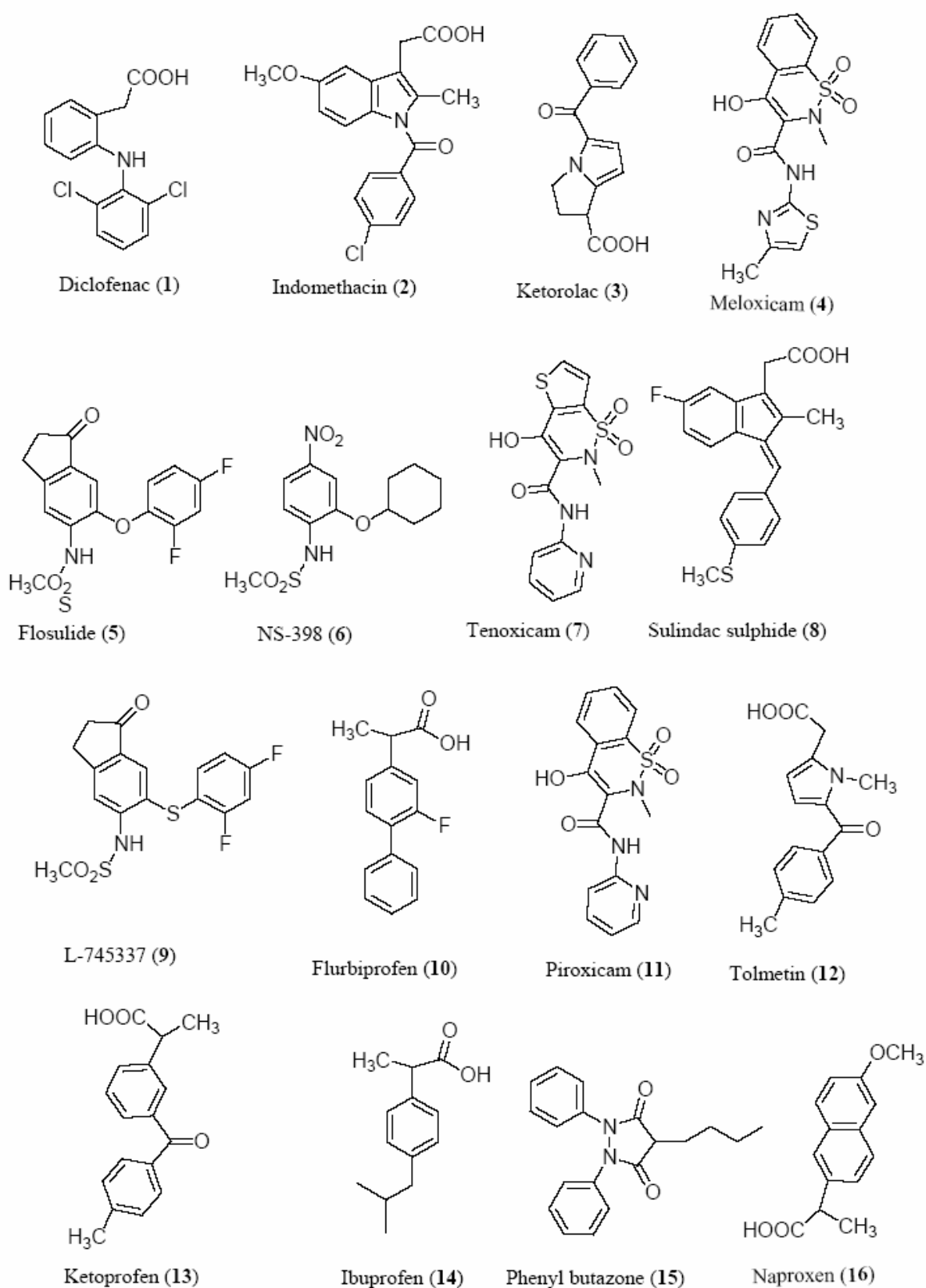
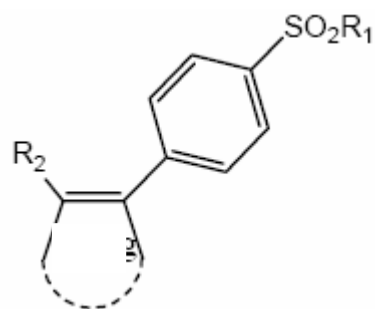


Figure 9 Structure des composés sélectionnés pour le docking moléculaire

Tableau 8: Structure des composés de la classe des 1,2 diaryl hétérocyclique



N°	Cycle	R ₁	R ₂
17		CH ₃	4-F-C ₆ H ₄
18		NH ₂	4-CH ₃ -C ₆ H ₄
19		CH ₃	C ₆ H ₅
20		NH ₂	C ₆ H ₅
21		CH ₃	
22 ^o		SCH ₃	4-OCH ₃ -C ₆ H ₄
23		CH ₃	
24		CH ₃	4-F-C ₆ H ₄
25		NH ₂	3,4-di-Cl-C ₆ H ₃
26		CH ₃	
27		CH ₃	
28		CH ₃	3,5-di-F-C ₆ H ₃
29		CH ₃	3,4-di-F-C ₆ H ₃

Tableau 8 (suite) ??

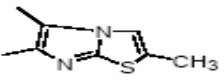
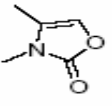
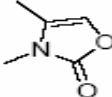
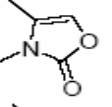
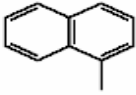
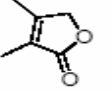
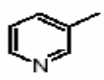
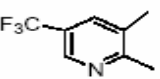
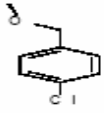
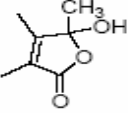
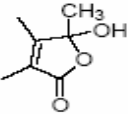

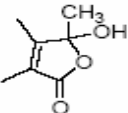
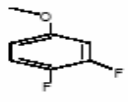
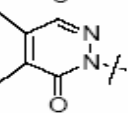
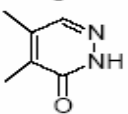
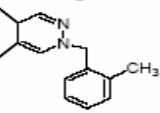
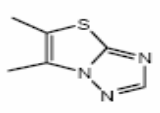
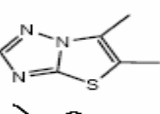
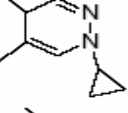
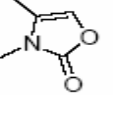
30		CH ₃	3,4-di-F-C ₆ H ₃
31		NH ₂	4-CF ₃ -C ₆ H ₄
32		NH ₂	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁
33		NH ₂	
34		CH ₃	
35		CH ₃	
36		CH ₃	4-OH-C ₆ H ₄
37		CH ₃	
38		CH ₃	
39		CH ₃	C ₆ H ₅
40		CH ₃	C ₆ H ₅
41		CH ₃	C ₆ H ₅
42		CH ₃	3,4-di-F-C ₆ H ₃
43		CH ₃	C ₆ H ₅
44		CH ₃	C ₆ H ₅
45		NH ₂	4-COOH-C ₆ H ₄

Tableau 8 (suite) ??

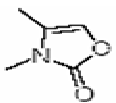
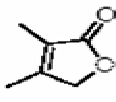
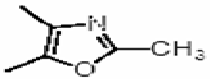
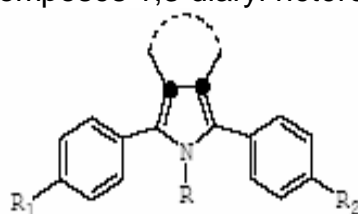
46		NH ₂	3-COOH-C ₆ H ₄
47		CH ₃	C ₆ H ₅
48 ^b		NH ₂	<i>c</i> -C ₆ H ₁₁

Tableau 9. Structures des composés 1,3 diaryl hétérocycliques


















N°	Cycle	R	R1	R2
49		H	H	H
50		H	H	H
51		CH ₃	H	H
52		NH ₂	H	H
53		NHMs	H	H
54		CH ₂ COOH	H	H
55		H	F	F
56		H	CH ₃ S	CH ₃ S
57		H	CH ₃	CH ₃
58		H	OCH ₃	OCH ₃
59		H	Cl	Cl
60		H	F	Imidazol-1-yl
61		H	Imidazol-1-yl	Imidazol-1-yl
62		H	H	H
63		H	H	H

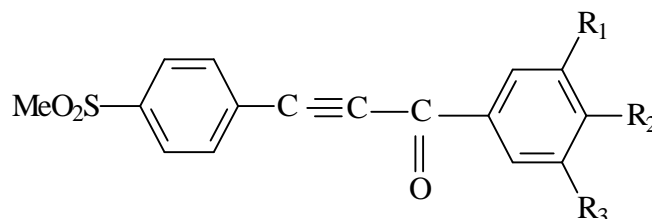
Tableau 9.(suite)

64		CH ₃	H	H
65		H	H	H
66		H	F	F
67		H	H	H
68		H	H	H
69		H	H	H
70		H	F	F
71		H	F	F
72		H	F	CH ₃ SO ₂
73		H	CH ₃ SO ₂	CH ₃ SO ₂
74		H	H	H
75		H	F	F
76		H	H	H
77		H	4-F 3-NHAc	4-F 3-NHAc
78		H	4-F 3-NHCH ₃	4-F 3-NHCH ₃
79 ^a		H	-	-
80				
81				
82				

1.2.3-Les inhibiteurs simultanés de la 15-LOX et la COX-2

Parmi ces composés nous retrouvons les dérivés du 1,3 diphenyl propyne-2-one (Tab. 10). Ces composés ont été synthétisés et évalués biologiquement comme inhibiteurs à la fois des cyclooxygénases et des lipoxygénases. [128]. Leur dualité ainsi que la disponibilité des valeurs de leur IC₅₀ sont parmi les critères de choix de ces molécules que nous avons retenues pour tester FlexX et Autodock.

Tableau 10. Structure chimique des inhibiteurs de synthèse des enzymes 15-LOX et COX-2



Composé	R1	R2	R3
a	H	H	H
b	H	Me	H
c	H	CF ₃	H
d	H	CN	H
e	H	OMe	H
f	H	OH	H
g	H	H	H
h	OMe	H	H
i	OH	OMe	OMe
j	OMe	F	H
k	H	F	H
l	F	OH	H
m	OMe OH	OMe	H

2-LES CIBLES ENZYMATIQUES

Afin d'obtenir de manière expérimentale la structure d'une protéine, plusieurs étapes sont nécessaires. Il faut isoler le gène, le cloner et l'exprimer dans un organisme adéquat, puis purifier la dose de protéine obtenue et parfois éliminer le fragment rajouté à la protéine pour la chromatographie d'affinité [129]. Ces étapes de biologie moléculaire restent encore délicates et limitent le travail. La structure tridimensionnelle est le plus souvent obtenue à partir de l'échantillon par diffraction de rayons X. pour ces méthodes, les molécules doivent auparavant être préparées sous forme de cristal, mais la cristallogénèse reste une étape hautement empirique et difficile [130]. La possibilité d'obtenir des cristaux complexe protéine-ligand est bien plus intéressante mais aussi plus difficile à réaliser. Il est également possible

d'obtenir des structures par RMN dans les cas où la protéine ne comporte pas plus de 200 acides aminés ou par microscopie cryo-électronique [131,132].

La plupart des structures obtenues sont disponibles via la « Protein data Bank » [133], le nombre de structures d'une même molécule avec ou sans ligand permet d'avoir une information pertinente. Néanmoins certains cas restent difficiles car il existe dans la PDB peu ou pas de structures en interaction avec les inhibiteurs. A titre d'exemple, la 15-lipoxygénase qui nous intéresse dans cette étude, est représentée par un seul complexe appelé 1LOX.

2.1-Lipoxygénases

Les lipoxygénases constituent une classe d'enzymes à fer non-hème, présentes dans les règnes végétal et animal. Elles sont responsables de la dioxygénation régiosélective et stéréospécifique des acides gras polyinsaturés, selon la réaction suivante [134-138] :



L'hydroperoxyde ainsi formé entre dans divers processus cellulaires en fonction de l'acide gras initial et de la lipoxygénase considérée.

Les structures cristallographiques de la lipoxygénase du lapin [139] (15-LOX) et du soja [140,141] (les isoenzymes LOX-1 et LOX-3) ont été résolues. La protéine comporte un petit domaine N-terminal en comparaison au domaine C-terminal qui contient le site catalytique. Le domaine N-terminal est constitué d'un tonneau de 8 feuilletts β antiparallèles.

Le domaine C-terminal contient de 18 à 22 hélices alpha et un (enzyme du lapin) ou deux (soja) feuillet(s) béta antiparallèle(s). Les deux longues hélices alpha au centre de l'enzyme traversent le site catalytique et comportent les trois résidus histidines coordonnées au centre métallique. En plus des liaisons avec les atomes NE des trois histidines, l'ion fer, au centre du site actif, est lié à l'un des atomes d'oxygène de la fonction carboxylate du résidu C-terminal et à un ion hydroxyle.

Dans les lipoxygénases des végétaux, les deux domaines peuvent être clivés enzymatiquement en deux fragments toujours en interaction alors que l'enzyme reste active. En revanche, si le domaine C-terminal est complètement séparé du domaine N-terminal, l'enzyme perd son activité.

2.2-Cyclooxygénases

Les cyclooxygénases sont des enzymes présentes au niveau du réticulum endoplasmique. Ces enzymes homodimériques glycosylées existent sous deux formes: COX-1 et COX-2 (dont l'homologie de séquence est de 60%). Chacune d'entre elles est responsable de deux réactions consécutives: une réaction de cyclooxygénation et une réaction de peroxydation. L'acide arachidonique s'y trouve transformé en prostaglandine, agent responsable des phénomènes inflammatoires dans certains tissus. La cyclooxygénase de type 2 est induite par des EGF (epidermal growth factor), cytokines et mitogènes. Son inhibition conduit à réguler puis diminuer l'effet inflammatoire qu'elle induit au sein de tissus. Une inhibition de la

forme I conduit à des effets secondaires ulcéro-gastriques ainsi que des dérèglements rénaux. Plusieurs travaux sur les inhibiteurs de ces enzymes ont montrés l'importance dans le site catalytique des résidus Arg120, Tyr385 et de Ser530 [142].

CHAPITRE II : LES METHODES DE MODELISATION DES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND

L'utilisation de méthodes théoriques pour l'obtention de modèles qui puissent prédire et comprendre les structures, les propriétés et les interactions moléculaires est connue sous le nom de « Modélisation Moléculaire ». Celle-ci permet de fournir des informations qui ne sont pas disponibles par l'expérience et joue donc un rôle complémentaire à celui de la biochimie expérimentale

1-RECONNAISSANCE MOLECULAIRE

Au niveau du site actif , le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes.

Le premier modèle de reconnaissance moléculaire fut proposé par Emile Fischer en 1894. Il s'agit du modèle clé-serrure où la reconnaissance est stérique. Le ligand s'encastre dans la macromolécule biologique de manière rigide comme une clé dans une serrure. Cette reconnaissance moléculaire est spécifique [143] et s'utilise par modélisation moléculaire dans le cas du docking rigide.

Une amélioration de ce modèle a conduit à celui de Koshland [144]. Dans ce cas, il y a une reconnaissance moléculaire commune avec adaptation des formes du ligand et du récepteur. Ce modèle a été implémenté dans les algorithmes de docking permettant la prise en compte de la flexibilité du ligand.

Il s'ensuit la sélection d'une conformation privilégiée des 2 protagonistes pour parvenir à une complémentarité préférentielle de l'interaction ligand-récepteur. Les états conformationnels choisis lors de l'interaction ne sont pas nécessairement ceux de plus basse énergie en solution, mais des états transitoires stabilisés par celle-ci [145]. Les complexes formés sont alors plus stables que les formes dissociées. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes. Au niveau du processus biochimique, elles s'expriment par différentes interactions : électrostatiques, hydrophobiques, de van der Waals et des ponts hydrogène.

Les interactions de van der Waals sont des dipôles non permanents de faible rayon d'action (Fig. 10). Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice.

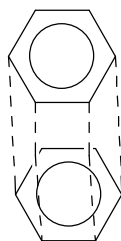


Figure 10 :Interactions de Van Der Walls

Les ponts 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) entre un H lié à un O ou un N avec un O ou un N (Fig. 11). Ils sont peu nombreux et s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°) .

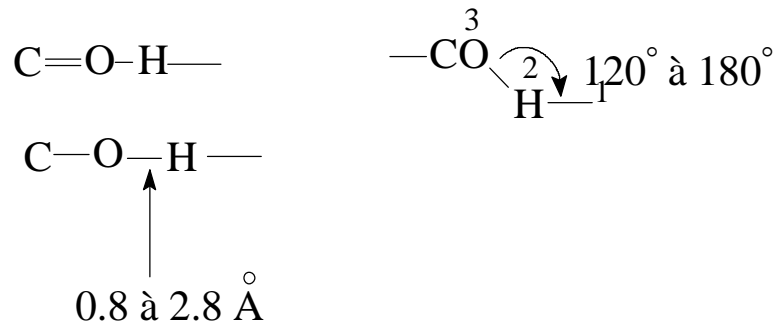


Figure 11 : ponts hydrogène

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 (Fig. 12), 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.

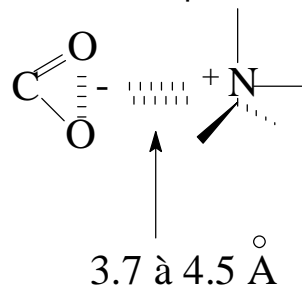


Figure 12 : Interactions électrostatiques

En docking moléculaire, la désolvatation n'est que partiellement compensée par la formation des ponts hydrogène et des interactions électrostatiques. Ces derniers, jouant un rôle primordial dans la spécificité de l'interaction ligand-récepteur.

Au contraire, la désolvatation provoquée par enfouissement des groupements non polaires à l'intérieur du complexe constitue l'effet hydrophobe [146]. Il en résulte un gain d'entropie au profit d'une meilleure stabilité du complexe formé.

La reconnaissance moléculaire est donc la résultante de l'arrangement géométrique des 2 protagonistes et de l'échange électronique.

Une fois le complexe formé, les forces d'interaction qui le maintiennent traduisent ce qu'on appelle l'affinité. Celle-ci s'exprime par la constante à l'équilibre K_{eq} que l'on retrouve directement liée à l'enthalpie libre (ou énergie libre ΔG) au niveau de la relation de Gibbs (Equation 1) :

$$\Delta G = - RT \ln K_{eq} \quad \text{Equation. 1}$$

L' énergie libre est un terme qui permet de nous renseigner directement sur la stabilité du complexe formé.

La modélisation de l'interaction ligand-protéine fait appel à un champ de forces qui calcule l'énergie en pénalisant les déviations de longueur, d'angle, d'angle

dièdre par rapport à l'idéal. L'enthalpie libre d'interaction est évaluée par différence entre les formes complexes et les formes libres (Equation 2).

$$\Delta G = G_{\text{complexe}} - (G_{\text{récepteur}} + G_{\text{ligand}}). \quad \text{Equation. 2}$$

La modélisation par docking moléculaire présente l'avantage d'estimer rapidement et sans trop d'approximation la valeur de cette énergie [147]; d'où l'intérêt particulier portée à cette méthode.

2-DOCKING MOLECULAIRE

2.1-Applications

Il y a au moins deux applications principales au programme de Docking. La plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction. L'autre utilisation est de parcourir une banque de données pour en retirer les éléments les plus intéressants. Différentes techniques sont utilisées pour évaluer les performances des différents algorithmes de Docking pour chaque application. 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 derivation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal. Le ratio admis est une différence maximum de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non pertinente [148,149]. La norme actuelle pour évaluer les performances d'un programme de docking est de faire un test à partir de plusieurs centaines de complexes ligands-protéines cristallisés [150,151]. Les erreurs de docking peuvent être dues, dans ce cas, à un échantillonnage incomplet ou à une mauvaise précision de la fonction de score. Afin de déterminer quel type d'erreur s'est produite, il faut comparer le score d'énergie la plus basse obtenue par la conformation du Docking avec le score de la structure cristalline. Si le score du complexe de Docking possède une valeur supérieure (moins favorable) à celle de la structure cristalline il s'agit d'un problème de la partie chargée de parcourir l'espace conformationnel. Cet échantillonnage incomplet n'a pas permis de trouver le conformère correspondant au minimum global d'énergie potentielle [152]. Dans le cas où le score de docking serait bien plus bas que celui de la structure cristalline il s'agit d'une erreur de la fonction de score. Pour remédier à ces problèmes, dans le premier cas il faut augmenter le nombre de conformères évalués, dans le deuxième il faut revoir la fonction de score. Il s'agit là de cas classiques qui supposent que l'espace conformationnel autour de la structure expérimentale est parfaitement parcouru et que la structure cristalline est bien celle correspondant au minimum global d'énergie potentielle. Il faut donc l'adapter selon son propre calcul.

Le rôle d'un programme de docking, quand il est utilisé pour examiner une banque de données, consiste à identifier parmi les milliers de composés le petit nombre actif sur le récepteur qui nous intéresse. Il existe deux types de mesures couramment admises pour évaluer la pertinence de l'algorithme. La première est le taux de réussite qui est défini par le nombre de molécules actives trouvées parmi les x premiers éléments classés. Plus ce taux est élevé et moins il est nécessaire d'effectuer des recherches expérimentales pour trouver un composé actif. La

seconde mesure est le facteur d'enrichissement, qui est défini par le ratio de l'équation 3.

$$EF = \frac{a/n}{A/N} \quad \text{Equation. 3}$$

où a représente le nombre de composés actifs parmi les n premiers composés, et A est le nombre total de composés dans la base comptant N composés. Il a été montré que le taux de réussite n'est pas seulement dépendant de l'algorithme et de sa fonction de score mais aussi des molécules mises en jeu. Ceci rend chaque étude particulière [153-155].

Si cette vision fait apparaître ces méthodes comme bien différenciées, le Docking fait le plus souvent parti d'un processus à plusieurs étapes. La prédiction du mode d'interaction précède, ou fait suite, souvent à une étape de minimisation ou de dynamique moléculaire. L'examen d'une banque de données est souvent suivi d'une étape d'optimisation des molécules sélectionnées. Pour optimiser les molécules à activité pharmacologique, le programme doit être capable de ranger correctement des molécules semblables chimiquement. La fonction de score doit être capable de limiter les faux positifs et les faux négatifs.

2.2-Principes

Le docking moléculaire s'accomplit en deux étapes complémentaires. La première consiste à rechercher les conformations du ligand aptes à établir des interactions idéales avec le récepteur. La deuxième est une fonction de score qui permet d'évaluer ces conformations par un calcul rapide de leur énergie d'interaction avec ce récepteur. La partie de recherche doit parcourir au mieux l'espace conformationnel pour trouver l'énergie minimale globale. En docking rigide il s'agit pour le programme d'explorer l'espace autour du récepteur en utilisant des mouvements de translation et de rotation. En docking flexible il faut ajouter les mouvements de torsion intramoléculaire. Plus le ligand comporte de points de flexibilité et plus l'espace conformationnel est grand, donc plus difficile à parcourir. Dans cette étude deux approches différentes de recherche de la flexibilité du ligand ont été choisies : l'approche systématique et l'approche par algorithme génétique.

2.2.1-L'approche systématique

L'approche systématique est basée sur des grilles de valeurs pour chaque degré de liberté, et chacune de ces grilles est explorée de manière combinatoire au cours de la recherche. A cause de l'effet combinatoire, le nombre d'évaluations augmente bien plus rapidement que le nombre de degrés de liberté. Afin d'éviter une croissance trop importante, des critères de fin sont mis pour éviter à l'algorithme de parcourir des portions de l'espace dont nous savons qu'il ne conduirait qu'à de mauvaises solutions. L'exemple type d'un algorithme systématique est celui de la méthode incrémentale. La première étape consiste à découper le ligand en partie rigide et flexible. Une ou plusieurs «ancres» rigides sont définies entre les points où des rotations sont possibles. Ensuite une première partie rigide est mise en

interaction avec le récepteur puis les parties flexibles sont ajoutées de manière séquentielle avec une exploration systématique des angles de torsion. Le choix des fragments de base à placer en premier dans le site est primordial car il est très difficile pour les algorithmes de compenser un mauvais positionnement initial. Les différentes implémentations changent par la manière dont le premier segment rigide est placé dans le site et dans les procédures d'élimination quand le nombre d'angles de rotation augmente. Nous supposons que la position du segment rigide de départ (ancree) fait partie des n positions de plus basse énergie possibles. Le nombre n détermine la largeur de l'arbre de recherche. Cette hypothèse peut s'avérer être un biais dans le cas de petits segments 'ancres' car ceux-ci sont susceptibles de s'adapter à de nombreux endroits à la surface du récepteur entraînant la construction de branches sans intérêt. Cette méthode a été implémentée dans plusieurs programmes dont FlexX [156] sur lequel nous reviendrons plus en détails ultérieurement et Dock [157]. La suite de programmes qui constituent Dock est destiné à effectuer des simulations de Docking flexible-rigide, c'est à dire des calculs dans lesquels seul le ligand peut être modifié via des mouvements de translation, rotation ou torsion. La construction des orientations du ligand se fait suivant une méthode incrémentale. Dans cette implémentation différents fragments rigides du ligand sont adaptés de manière indépendante. Dans un deuxième temps, chaque fragment rigide placé correctement est rattaché à un voisin si les distances entre les 2 sont correctes. La reconstruction du ligand se continue ainsi de proche en proche. Pour éviter une explosion du temps de calcul le nombre d'angles diédraux à explorer pour chaque angle flexible est fixé. Cette méthode implémente aussi une procédure de retour arrière pour permettre d'optimiser à nouveau les angles dans le but de prévenir un conflit stérique à un autre endroit de la reconstruction et pour encore éviter une explosion des combinaisons possibles [158]. Le programme DOCK effectue donc le placement de l'ancree en respectant la complémentarité stérique donnée par les sphères du sous-programme SPHGEN. Les parties flexibles sont ajoutées de manière incrémentale, les angles diédres sont évalués et minimisés. Une sélection est effectuée à chaque pas pour garantir l'exploration du domaine conformationnel. Quand le ligand est complet il est minimisé à nouveau et le score final est calculé.

2.2.2- L'approche par algorithme génétique

La méthode par algorithme génétique est fondée sur le principe de l'évolution adapté ici à la recherche de la structure correspondant au minimum global d'énergie. Les algorithmes génétiques fonctionnent par une génération successive d'individus ou structures du ligand pour notre cas. Chaque individu possède des gènes se sont ses caractéristiques. La méthode comporte 3 phases : reproduction, crossover, mutation. La phase de reproduction vise à identifier les individus pouvant donner une autre génération. Pour la première génération les éléments sont créés au hasard pour éviter la dépendance vis-à-vis de la structure de départ. Pour les générations suivantes elles sont composées des meilleurs éléments de la génération précédente sélectionnés par une fonction d'évaluation. Dans notre cas il s'agit souvent d'une fonction basée sur l'énergie. Durant la phase de crossover, Les gènes des individus sélectionnés sont échangés 2 à 2 pour créer la nouvelle génération, le lieu de croisement est déterminé au hasard. La troisième étape est la mutation. La mutation permet d'engendrer des individus non accessibles. En effet, des valeurs de

gènes peuvent se retrouver absentes d'une population. Cela peut engendrer des maxima locaux. La mutation consiste à changer aléatoirement quelques gènes (en règle générale, entre 5 et 10 pour mille) afin de créer des opportunités. Le processus est répété de manière itérative. Le calcul est arrêté soit au bout d'un nombre déterminé de générations soit lorsque la population n'évolue plus assez, il y a alors convergence.

Il existe un autre type d'algorithme génétique dit Lamarckien. Dans ce cas il est possible de faire marche arrière entre les générations pour effectuer une recherche locale, en suivant la théorie de Lamarck qui veut que des caractéristiques phénotypiques puissent être transmises à la descendance. L'algorithme génétique Lamarckien est celui qui se montre le plus fiable et le plus efficace [159]. Plusieurs logiciels utilisent ces méthodes dont notamment GOLD [160,161], Autodock [162], Dockvision [163].

Le programme GOLD utilise l'algorithme génétique classique mais avec plusieurs sous-populations du ligand plutôt qu'une seule grande, et il travaille simultanément sur toutes les populations. Il autorise les passages d'individus d'une sous-population à une autre. Le programme Autodock sera abordé plus en détail plus loin.

Le programme Dockvision offre de choisir suivant les cas entre algorithme génétique classique et Lamarckien via son sous programme Gamma ou par une technique de Monte Carlo par recuit simulé hybride utilisant une grille basée sur une fonction de score stérique en premier puis énergétique via son sous programme Research.

Au vu de ces différentes méthodes, il est possible de tirer plusieurs hypothèses quant à leur éventuel comportement vis-à-vis de nos structures. En premier la méthode incrémentale, le découpage en segments rigides autour des angles de torsion s'adapte bien aux structures utilisées. Elle permet de découper la molécule en fragments simples facilitant ainsi la phase de reconstruction incrémentale de la molécule.

Pour la méthode par algorithme génétique, l'expérience montre qu'il s'agit d'une méthode fiable. Le problème de flexibilité pouvant augmenter l'espace conformationnel et empêcher les programmes de converger n'étant pas posé.

Ces éléments ont été parmi les critères de choix des programmes FlexX et Autodock utilisés dans cette étude.

2.3-Programmes utilisés

2.3.1-FlexX

Le programme FlexX positionne l'ancre à partir d'une modélisation des interactions chimiques et effectue une sélection automatique des fragments de base [164,165]. Les fragments sont ajoutés de manière incrémentale. Chaque angle possible est construit et les angles qui produisent des recouvrements avec le récepteur ou des conflits internes sont rejetés. A chaque ajout, le calcul de l'énergie est pratiqué et les molécules partiellement construites sont classées. Cette procédure est répétée jusqu'à la construction complète de la molécule.

Lors du docking moléculaire, le programme FlexX tient compte de trois paramètres importants : la flexibilité conformationnelle du ligand, le niveau ou le type d'interaction entre la protéine et son ligand et enfin le classement des solutions de

docking par évaluation de leur énergie d'interaction. Le dernier aspect sera abordé plus en détail dans le chapitre suivant.

2.3.1.1-Flexibilité conformationnelle du ligand

Le programme MIMUMBA implémenté dans FlexX permet de tenir compte de la flexibilité du ligand. Il contient une base de données de 900 fragments moléculaires qui seront affectés automatiquement à chaque liaison simple.

Le rôle de ce programme est de classer les conformations qui ont une basse énergie. Il utilise les valeurs à partir des données de la structure en ce qui concerne la longueur et l'angle de la liaison.

2.3.1.2-Les niveaux d'interaction

Les interactions entre le ligand et le récepteur sont des interactions polaires (ponts hydrogène et ioniques) et des interactions hydrophobiques (contacts entre des groupes hydrophobes). Les interactions sont classées en trois niveaux (Tab. 11) :

a) les interactions du 1^{er} niveau

Ces interactions représentent les contacts hydrophobiques non spécifiques entre les atomes de carbone aliphatique ou aromatique. Ces interactions sont généralement sphériques avec un rayon de 4 Å

b) les interactions du 2^{ème} niveau

Il s'agit des interactions hydrophobiques entre le centre d'un cycle aromatique et les atomes d'un autre cycle, d'une amide ou des groupements méthyle. La géométrie de ce type d'interaction est légèrement moins restrictive, on peut alors le séparer des interactions purement hydrophobiques. Ces interactions sont les plus fréquentes.

c) les interactions du 3^{ème} niveau

Elles concernent les interactions polaires telles que les ponts hydrogène et salins. Elles sont les plus restrictives géométriquement à cause de leur courte distance H-accepteur -----H-donneur (1.9 Å).

Lors du docking moléculaire, les interactions du 3^{ème} niveau sont utilisées en premier puisqu'elles sont les plus restrictives géométriquement., ensuite celles du 2^{ème} niveau, et enfin celles du 1^{er} niveau.

Tableau 11: Types d'interactions rencontrés dans les complexes protéine-ligand

Groupe	Contre-groupe	Niveau
Carbone aliphatique Carbone aromatique Sulfure		1
Atome d'un cycle Aromatique Méthyle ; Amide	Centre d'un cycle aromatique	2
H-accepteur Métal accepteur	H-donneur Métal	3

Pour chaque groupe ou atome il y a un type d'interaction et une géométrie correspondante. La géométrie de l'interaction est représentée par un centre (l'atome d'oxygène par exemple), un rayon et une surface d'interaction. En général, la surface d'interaction est soit une sphère soit un cône ou une combinaison des deux (Fig. 13)

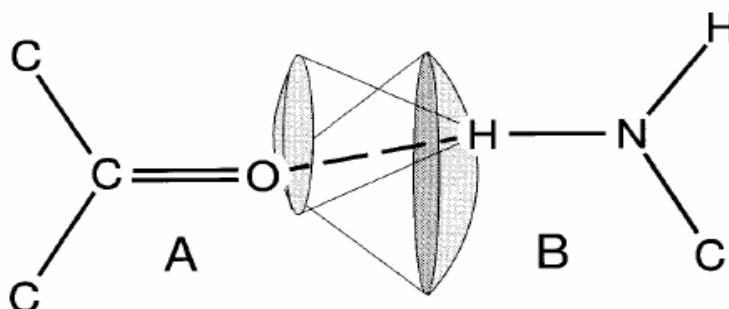


Figure 13. Géométrie de l'interaction entre deux groupements A et B

Il y a interaction seulement si :

- les types d'interaction des deux groupes A et B sont compatibles
- le centre d'interaction de A est lié approximativement à la surface d'interaction de B et vis versa.

2.3.1.3-La construction incrémentale

Le programme FlexX est basé sur la stratégie de la construction incrémentale. Son principe de fonctionnement est très simple : après avoir cherché, lors de la première itération, tous les placements et conformations possibles du fragment, seuls les meilleurs placements sont pris en considération dans l'itération suivante. Le docking se déroule en trois étapes : la sélection du fragment de base, son placement dans le site actif de la protéine et enfin sa reconstruction finale.

a) Sélection du fragment de base

La première étape du docking consiste à couper les liaisons simples acycliques non terminales du ligand de manière à dégager le fragment de base qui doit interagir en premier avec le récepteur.

b) Placement du fragment de base dans le site actif

Le fragment de base choisi par l'algorithme dans l'étape précédente est ensuite placé dans le site actif de la protéine par la technique dite « geometric hashing ». Celle-ci, traite toutes les paires de points qui ont une distance dans l'intervalle de 0.5 à 10 Å. Elle génère tout les triplets (ou paires) des centres d'interaction du fragment et définit tous les triplets compatibles. Les deux triplets définis précédemment, sous forme de triangles, sont compatibles seulement s'ils ont les mêmes longueurs d'arêtes et que leurs sommets ont des types d'interaction compatibles (Fig. 14)

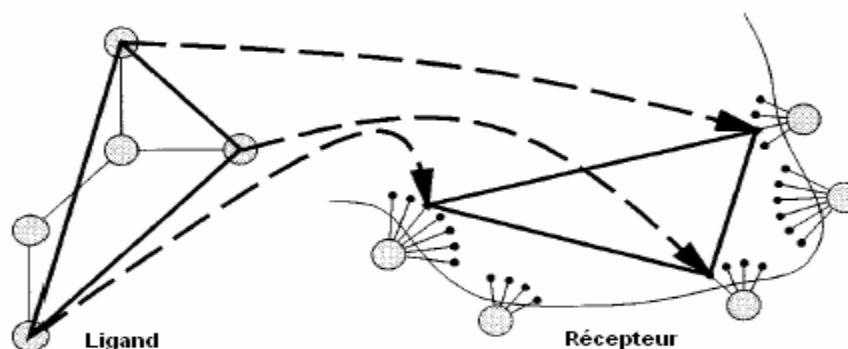


Figure 14. Technique utilisée pour placer le fragment. Les trois centres d'interaction du ligand (en gris). Les trois points d'interactions du site actif (en noir).

Pour des raisons géométriques les surfaces d'interactions du site actif sont présentées par des points

Le fragment de base est ensuite ajusté en tenant compte des contraintes angulaires ou géométriques (le centre d'interaction du ligand coïncide avec la surface d'interaction du récepteur et vice-versa). Aussi, le ligand et le récepteur ne doivent pas se chevaucher.

Enfin, l'algorithme regroupe tous les placements qui ont un rms de déviation minimale, (rms : root mean square ≤ 2 Å). Ces placements vont convergés vers une seule solution, celle qui correspondra à l'orientation finale du ligand

Dans le cas d'un petit fragment de base, l'interaction aura lieu entre les paires des centres d'interactions du ligand (au lieu des triplets) et les paires de points d'interactions du site actif. La rotation autour de l'axe défini par la paire de points d'interactions peut être fixé en tournant le ligand de telle sorte que les deux centres d'interactions du récepteur lient approximativement les deux centres d'interactions du ligand.

c) phase de construction du ligand

La dernière étape de la construction incrémentale consiste à rajouter au

fragment de base, tous les fragments préalablement découpés dans la première étape. La reconstruction du complexe se fait par la « technique arborescente » où chaque point sur l'arbre représente une position ou un placement d'une partie du ligand (Fig. 15)

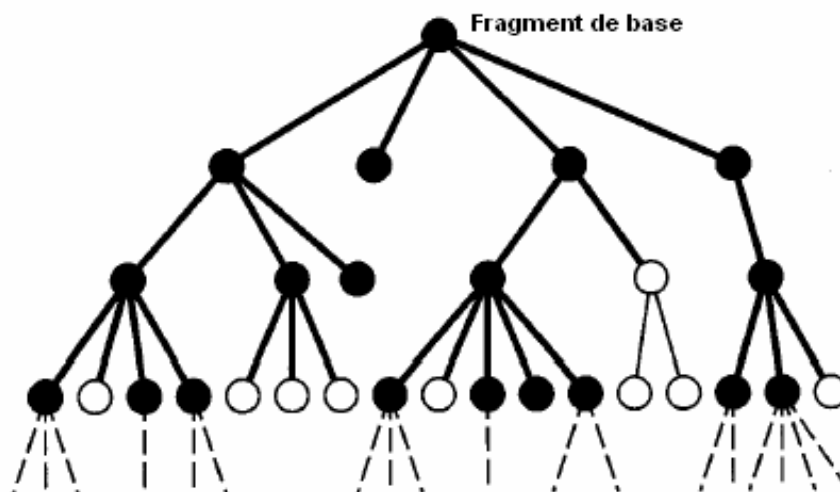


Figure 15 Construction incrémentale du complexe protéine-ligand. Les points noirs représentent les placements qui vont être pris en considération dans l'itération suivante

La taille de l'arbre augmente exponentiellement avec le degré de liberté du ligand.

Dans le premier niveau de l'arbre, se trouvent les différentes positions du fragment de base. Les niveaux suivants représentent les positions alternatives pour les autres fragments du ligand.

L'ordre selon lequel sont ajoutés les fragments reste constant durant toute la construction. Le fragment qui forme une liaison hydrogène ou ionique est ajouté en premier puisqu'elles sont les plus restrictives géométriquement. Le but de cette technique est de trouver toutes les positions (placements) qui ont une énergie libre favorable telle qu'elle est estimée par la fonction de score. Une telle approche permet d'éviter les minima locaux .

2.3.2-Autodock

Le programme Autodock est un ensemble de sous-programmes destinés à simuler un Docking flexible-rigide. Il comprend 3 parties : AutoTors, AutoGrid et AutoDock.

AutoTors permet à partir du fichier de coordonnées du ligand avec les charges associées de définir les angles de torsion qui seront explorés durant la simulation. Si l'utilisateur le souhaite, il est aussi possible d'enlever les atomes d'hydrogène non polaires et de réattribuer leurs charges aux atomes de carbone auxquels ils étaient liés. Ce sous-programme accepte en entrée des fichiers au format PDBQ (format propre à Autodock) et mol2. Il écrit les torsions en fin de fichier PDBQ, utilisant 3 termes pour définir les différentes possibilités. Le premier terme ROOT/ENDROOT

définit les parties du ligand qui restent fixes. Le terme BRANCH/ENDBRANCH définit les parties du ligand pouvant contenir des angles de torsion. Le dernier terme TORSION/ENDTORSION définit les liaisons sur lesquelles une torsion peut être définie. Le nombre maximum de torsions applicable est défini par la variable MAX_TORS du fichier autodock.h en cas de modification une nouvelle compilation s'impose.

Le programme AutoGrid est chargé de calculer des grilles d'interaction afin de maximiser l'étape d'évaluation des différentes configurations du ligand. Pour cela une grille entoure la protéine réceptrice et un atome sonde est placé à chaque intersection. L'énergie d'interaction de cet atome avec la protéine est calculée et attribuée à l'emplacement de l'atome sonde sur la grille. Une grille d'affinité est calculée pour chaque type d'atome du ligand ainsi que pour les termes de répulsion/dispersion et les liaisons hydrogène. Les énergies de répulsion/dispersion sont calculées suivant un potentiel de Lennard-Jones 6-12 et les ponts hydrogène avec un potentiel 10-12. Le temps de calcul de l'énergie en utilisant les grilles est proportionnel au nombre d'atomes du ligand uniquement, il est indépendant du nombre d'atomes du récepteur.

Le programme AutoDock effectue la partie de recherche et d'évaluation des différentes configurations du ligand. Il est possible d'utiliser plusieurs techniques pour obtenir les configurations (par recuit simulé [166], par algorithme génétique ou par algorithme génétique Lamarckien [167]). Pour la méthode Monte Carlo, à chaque pas un déplacement au hasard de tous les degrés de liberté est effectué (translation, rotation, torsion). Les énergies de la nouvelle et de l'ancienne configuration sont comparées. Si la nouvelle est plus basse elle est gardée, sinon elle est conservée ou rejetée suivant une probabilité dépendant de la température (Equation 4).

$$P(\Delta E) = e^{-\left[\frac{\Delta E}{k_B T} \right]} \quad \text{Equation 4}$$

ΔE est la différence d'énergie entre les 2 états, k_B la constante de Boltzmann et T la température. Il en découle qu'à haute température presque tous les états sont acceptés et que cela diminue avec la température. Pour l'implémentation de l'algorithme génétique, chaque chromosome est composé d'un ensemble de gènes représentant des valeurs réelles qui sont, 3 coordonnées cartésiennes pour définir les translations, 4 variables pour définir l'orientation et une variable pour définir chaque torsion. La variable de torsion correspond au numéro attribué à l'angle de torsion par AutoTors dans le fichier PDBQ. La méthode de recherche locale utilisée notamment par l'algorithme génétique Lamarckien s'appuie sur l'algorithme de Solis et Wets [168].

Concrètement l'utilisateur doit disposer d'un fichier récepteur comprenant tous les atomes d'hydrogène, les positions et charges partielles de chaque atome. Il s'agit le plus souvent d'un fichier mol2. La première étape consiste à déterminer la partie racine du ligand et les torsions, toute cette partie se fait en mode interactif avec AutoTors. Il reste à créer automatiquement 2 fichiers. Le premier *.gpf contient les paramètres d'AutoGrid pour créer les différentes grilles, les variables les plus importantes de ce fichier sont «npts » et «spacing » qui conditionnent la précision et en partie la taille des grilles (Fig. 16).

```

receptor hsg1.pdbqs # macromolecule
gridfld hsg1.maps.fld # grid_data_file
npts 60 60 60 # num.grid points in xyz
spacing 0.375 # spacing(A)
gridcenter 2.5 6.5 -7.5 # xyz-coordinates or auto
types CANOH # atom type names
smooth 0.5 # store minimum energy
w/in rad(A)
map hsg1.C.map # atom-specific affinity
map
nbp_r_eps 4.00 0.0222750 12 6 # C-C lj
nbp_r_eps 3.75 0.0230026 12 6 # C-N lj
nbp_r_eps 3.60 0.0257202 12 6 # C-O lj
nbp_r_eps 4.00 0.0257202 12 6 # C-S lj
nbp_r_eps 3.00 0.0081378 12 6 # C-H lj
nbp_r_eps 3.00 0.0081378 12 6 # C-H lj
nbp_r_eps 3.00 0.0081378 12 6 # C-H lj
sol_par 12.77 0.6844 # C atomic fragmental
volume,
constant 0.000 # C grid map constant
energy
map hsg1.A.map # atom-specific affinity
map
map hsg1.N.map # atom-specific affinity
map
map hsg1.O.map # atom-specific affinity
map
map hsg1.H.map # atom-specific affinity
map
elecmap hsg1.e.map # electrostatic potential
map
dielectric -0.1146 # <0, distance-dep.diel;>0,constant

```

Figure 16. exemple de fichier *.gpf pour AutoGrid

Le deuxième *.dpf est le fichier de paramètres de AutoDock. Il contient le choix de la méthode statistique ainsi que les critères d'arrêt du calcul (Fig. 17).


```

seed      time          # time-dependent
types     CNH           # atom type names
fld       3ptb.h_maps.fld # grid data file
map       3ptb.h_C.map   # C-atomic affinity map
...
move      ben.pdbq      # small molecule
about     -1.930 14.070 16.224 # small molecule center
tran0     random        # initial coordinates/A or random
quat0     random        # initial quaternion
tstep     3. 0.2        # translation step/A
qstep     24. 5.        # quaternion step/deg
intnbp_coeffs 2516582.400 1228.800 12 6 # C-C internal
energy non-bond parameters/
...
rt0       6160000.      # initial RT
linear_schedule # do not use geometric cooling
runs 10              # number of runs
cycles 50           # cycles
accs 25000          # steps accepted
rejs 25000          # steps rejected
select    m            # minimum or last
outlev    1            # diagnostic output level
rmstol    0.5          # cluster tolerance/A
rmsref    ben.pdbq    #
#rmsnosym # no symmetry checking in RMS calc.
write_all # write all conformations in a cluster
#trjfrq   0            # trajectory frequency
#trjbeg   1            # start trj output at cycle
#trjend   1            # end trj output at cycle
#trjout   b.trj        # trajectory file
#trjsel   E            # A=acc only;E=either acc or rej

```

```

#watch      b.buf.pdb # real-time monitoring
extnrg      1000.          # external grid energy
e0max       0. 10000      # max.allowable initial energy, max. num.
retries
# Perform Dockings
simanneal   # do as many SA runs as set by the \"runs\"
command above
# Perform Cluster Analysis
analysis     # do cluster analysis on results

```

Figure 17. Fichier *.dpf pour AutoDock par la méthode de recuit simulé (simulated annealing)

2.4-Préparation des molécules

2.4.1-Les ligands

Les ligands connus sont obtenus directement du fichier PDB et convertis au format SYBYL mol2. Les hydrogènes sont rajoutés et les types de liaison sont corrigés suivant l'état d'hybridation des atomes. Les autres molécules sont dessinées avec Sybyl et les charges de leurs atomes sont calculées par la méthode Gasteiger-Hückel. Après l'étape de minimisation d'énergie, les ligands sont enregistrés au format SYBYL mol2.

2.4.2-Les protéines

Les coordonnées des enzymes utilisées dans cette étude sont obtenues à partir des structures cristallographiques de la PDB. Il s'agit essentiellement des complexes 1CX2 pour la cyclooxygénase-2 de souris, 1LOX pour la 15-lipoxygénase de lapin et 1N8Q pour la 3-lipoxygénase de soja. Les caractéristiques de ces enzymes sont regroupées dans le tableau 12 ci-dessous.

Les structures obtenues au format pdb sont protonées et les charges de Kollman calculées avant leur conversion aux formats SYBYL mol2 et pdbqs par les programmes FlexX et Autodock respectivement.

Tableau 12. principales caractéristiques des enzymes 15-LOX, 3-LOX et COX-2

Enzyme	Code PDB	Résolution (Å)	Classification	Nombre de chaînes	Nombred'AA par chaîne	Nombre d'atomes par chaîne
15-LOX	1LOX	2.4	1.13.11.33	1	663	5110
3-LOX	1N8Q	2.1	1.13.11.12	1	857	6779
COX-2	1CX2	3.0	1.14.99.1	4	583	5441

CHAPITRE III : LES METHODES D'EVALUATION DES ENERGIES D'INTERACTIONS : LA FONCTION DE SCORE

La fonction de score permet d'estimer l'enthalpie libre d'interaction des différentes conformations du ligand avec le récepteur. Le meilleur score doit être attribué au complexe le plus réaliste déterminé expérimentalement. Pour effectuer ce choix la fonction de score procède au classement des différentes configurations ou ligands les uns par rapport aux autres. Elle donne aussi un aperçu du mode de fixation du ligand au récepteur sur la base de la complémentarité stérique et des fonctions des groupements chimiques. Lorsque les scores sont calculés dans les mêmes conditions, elle permet de comparer l'affinité du ligand pour différentes cibles [169]. Les termes se rapportant à l'entropie sont souvent négligés. Il existe plusieurs fonctions de score disponibles [170-174] et seule l'expérimentation permet de faire un choix judicieux de leur application [174,175]. On distingue quatre méthodes de score différentes : semi-empirique, empirique, basée sur des données (knowledge-based) et celle basée sur le premier principe de la thermodynamique [176],

1- MÉTHODES SEMI-EMPIRIQUES

Ces méthodes utilisent une approximation de l'énergie d'interaction sous la forme d'une combinaison linéaire de termes empiriques et quantiques. Il s'agit le plus souvent d'une approximation correcte pourtant toutes les forces impliquées dans la formation du complexe ne sont pas additives.

A titre d'exemple, la fonction de score semi-empirique utilisée dans le programme Dock est basée sur la combinaison du calcul des interactions de Van Der Waals par le potentiel de Lennard-Jones et la prise en compte des effets de solvation polaire et non polaire par un modèle de Born (GB/SA). Trois termes représentent les interactions de Van Der Waals ligand-récepteur, la surface hydrophobe du soluté exposé au solvant et les interactions de Van Der Waals favorables entre le soluté et le solvant sont pondérées par des facteurs empiriques. Le dernier terme de la fonction est calculé en utilisant l'équation de Born généralisée et est utilisé pour estimer les pénalités de désolvatation durant la formation du complexe. Les facteurs empiriques proviennent de valeurs expérimentales de l'enthalpie libre obtenues lors de tests à partir de la dihydrofolate réductase et de la trypsine en présence de différents ligands [177].

2- MÉTHODES EMPIRIQUES

Les fonctions de score utilisant les méthodes empiriques tentent d'évaluer l'énergie d'interaction par combinaison de quatre termes fondamentaux : les liaisons hydrogène, les interactions ioniques, la surface de contact ligand-récepteur et les contributions entropiques. Ces termes sont pondérés par des valeurs expérimentales de l'affinité d'un ensemble de complexes protéine-ligand. Toutefois, certains paramètres (pH, température, concentration en sel etc...) sont souvent ignorés lors du calcul de l'enthalpie libre à partir de données expérimentales. Ceci limite la précision des prédictions faites à partir de ces valeurs.

Les méthodes empiriques se servent de grilles de score précalculées qu'elles appliquent sur le récepteur. Chaque maille de la grille contient la résultante des atomes voisins. La première fonction de score développée par Böhm provient de l'étude de l'enthalpie libre d'interaction de 45 complexes différents [178] qu'on retrouve dans le programme LUDI. Elle est estimée par l'association de quatre termes représentant les ponts hydrogène, les ponts salins, l'effet hydrophobe et l'entropie du soluté. Le programme FlexX utilise la même fonction de score modifiée [179] par l'introduction de deux nouveaux termes $f^*(\Delta R)$ et ΔG_{aro} (Equation 5).

$$\Delta G = \Delta G_0 + \Delta G_H \sum_{\text{liaisons H}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{ionique}} \sum_{\text{int ion}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{aro}} \sum_{\text{int aro}} f(\Delta R, \Delta \alpha) + \Delta G_{\text{lipe}} \sum f^*(\Delta R) + \Delta G_{\text{rot}} \text{NROT} \quad \text{Equation 5}$$

Le terme $f(\Delta R, \Delta \alpha)$ est une fonction de pénalité qui tient compte des déviations autour des valeurs idéales de longueurs et d'angles des ponts hydrogènes et salins. La valeur idéale pour le pont hydrogène est 1.9 Å et l'angle 180°. La contribution énergétique des interactions hydrophobes est proportionnelle à la surface de contact entre le ligand et le récepteur. Le terme ΔG_{rot} prend en compte la perte d'entropie du ligand lors de la formation du complexe. Il est basé sur le nombre d'angles de torsion NROT lié à la libre rotation des liaisons acycliques du ligand. Le terme ΔG_0 donne les pertes d'entropie liées aux translations et rotations. Le terme $f^*(\Delta R)$ sert à ajuster les contacts dont les distances diffèrent de la distance idéale et le terme ΔG_{aro} permet de calculer les interactions π - π dans les cycles aromatiques.

Le programme Autodock utilise une fonction de score semblable [180] comportant cinq termes déterminés à partir de trente complexes protéiques (Equation 6) :

$$\Delta G = \Delta G_{\text{vdw}} \sum \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + \Delta G_{\text{hbond}} \sum_{ij} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^6} + E_{\text{hbond}} \right) + \Delta G_{\text{elec}} \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + \Delta G_{\text{tor}} N_{\text{tor}} + \Delta G_{\text{sol}} \sum_{ij} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)}$$

Equation 6

L'équation est calculée pour tous les atomes de carbone i du ligand et j du récepteur. Le premier terme prend en compte les interactions de Van Der Waals grâce à un potentiel Lennard-Jones d'attraction-repulsion. Le deuxième terme permet de calculer les liaisons hydrogène, basé sur un potentiel 12-10 avec un facteur de directivité $E(t)$ où t représente l'angle entre les deux atomes mis en jeu et E est l'énergie moyenne estimée d'une liaison hydrogène de l'eau avec un atome polaire. Le troisième terme détermine le potentiel électrostatique au moyen de la loi de Coulomb. Le quatrième terme estime la perte d'entropie due à la complexion du ligand qui limite les degrés de liberté des conformations ; ce terme est proportionnel au nombre d'angles de torsion du ligand N_{tor} . Enfin le cinquième terme prend en compte la désolvatation en calculant le volume autour d'un atome de carbone du ligand occupé par un atome de la protéine pondéré par un paramètre de solvation

atomique. La méthode de score se base sur différentes grilles calculées pour chaque type d'atome [181].

La méthode X-score [182] est une fonction de score qui tient compte de cinq termes déterminés à partir de 200 complexes protéine-ligand (équation 7)

$$\Delta G_{\text{interaction}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{H}} + \Delta G_{\text{déformation}} + \Delta G_{\text{hydrophobique}} + \Delta G_0 \quad \text{équation 7}$$

On retrouve les mêmes termes qui calculent les énergie liées aux forces de Van Der Walls, aux ponts hydrogène, aux contacts hydrophobiques. Le terme $\Delta G_{\text{déformation}}$ estime la perte d'entropie due à la complexion du ligand qui limite les degrés de liberté des conformations. Il est basé sur le nombre d'angles de torsion lié à la libre rotation des liaisons acycliques de type sp³-sp³ ou sp³-sp² entre 2 atomes autres que l'hydrogène. Le terme hydrophobique correspond à une moyenne calculée à partir de trois fonctions de score implémentées dans ce programme.

3- POTENTIELS BASES SUR DES CONNAISSANCES

Ces potentiels sont dérivés de données statistiques obtenues par l'analyse expérimentale des fréquences d'interaction entre atomes au sein de complexes protéine-ligand. Cette dérivation de fonction d'énergie est basée sur deux principes fondamentaux. Dans le premier, le complexe ligand-protéine est considéré dans un état thermodynamique d'équilibre représentant le minimum global d'enthalpie libre du complexe. Dans le deuxième, il est admis que la distribution des molécules à l'état microscopique obéit à la loi de Boltzmann. Il existe donc une corrélation entre l'énergie potentielle d'un système et la probabilité de trouver une molécule ou un complexe dans un état microscopique donné. Si ces fréquences sont converties en enthalpie libre grâce à une distribution de Boltzmann, les potentiels sont nommés "potentiels de force moyenne" (potential of mean force: PMF). Contrairement aux potentiels empiriques, les données d'interaction de type pont hydrogène, électrostatique ou de solvation ne sont pas introduites: les forces mises en jeu sont incorporées de manière implicite. Cependant, deux points majeurs sont à relever pour la construction du PMF. Le premier concerne l'état de référence qui se définit comme un état dans lequel la protéine et le ligand n'interagissent pas entre eux. Il est donné à partir d'une valeur spécifique empirique ou d'un potentiel moyen calculé à partir de toutes les données disponibles et avec une correction appropriée.

Le deuxième point concerne la collecte des statistiques d'interaction. Celles-ci, sont dépendantes de la distance et doivent permettre de bien dissocier l'état entre deux atomes où l'interaction peut avoir lieu et l'état où elle n'existe pas ou plus. Pour réduire les calculs, il existe une distance limite au-delà de laquelle les interactions sont considérées comme négligeables.

Comme dans le cas empirique, les PMF ne peuvent modéliser que les interactions qui existent ou qui sont proches des exemples qui ont servis à leur élaboration. Les différents potentiels varient suivant les types d'atomes définis, la nature et la taille des données expérimentales fournies, l'échelle des distances interatomiques parcourues et la variété de celles-ci.

Deux types d'approches sont possibles pour la prise en compte des distances et des interactions. La première correspond à un potentiel de type grossier qui ne tient compte que des interactions ayant lieu au dessous d'une distance limite définie

préalablement. L'autre approche dite fine évalue le potentiel en continu sur la distance interatomique.

PMFScore [183] est un potentiel de type grossier qui est dérivé de 697 complexes issus de la PDB. Il prend en compte cinquante types d'atomes dont 16 proviennent des protéines et 34 des ligands. La contribution du solvant est introduite par un terme de correction du volume qui prend en compte le degré moyen d'enfouissement de chaque type d'atome. Les distances limites prises en compte sont de 6 angströms pour les interactions carbone-carbone et de 9 angströms pour les autres paires d'atomes. La fonction de score PMF se définit comme la somme de toutes les interactions atomiques entre le ligand et la protéine (Equations 8 et 9)

$$PMF_score = \sum_{\substack{kl \\ r < r_{cut-off}^{ij}}} A_{ij}(r) \quad \text{Equation 8}$$

$$A_{ij}(r) = -k_B T \ln \left[f_{vol_corr}^j(r) \frac{\rho_{seg}^{ij}(r)}{\rho_{bulk}^{ij}} \right] \quad \text{Equation 9}$$

où r est la distance entre un atome i du ligand et j de la protéine, k_B la constante de Boltzmann, T la température en Kelvin, $f_{vol_corr}^j(r)$ est le facteur de correction du volume et le quotient qui suit est la fonction de corrélation entre les 2 atomes, prise d'une base de données de structures de complexes ; $r < r_{cut-off}^{ij}$ représente la distance limite des interactions.

Dans le cas des potentiels de type fin, on retrouve DrugScore qui est une fonction de score dérivée de 1376 complexes ligand-protéines tirés de la PDB. Elle ne traite que les contacts entre atomes autres que l'hydrogène avec une distance limite très courte. Ceci favorise les interactions spécifiques au sein du potentiel et n'est pas sans conséquence sur les effets du solvant qui sont calculés à part. Un potentiel dépendant de la surface moyenne accessible au solvant est ajouté pour chaque type d'atome.

4- METHODE BASEE SUR LE PREMIER PRINCIPE DE LA THERMODYNAMIQUE

Ces potentiels se basent sur les termes des fonctions des champs de forces. Contrairement aux potentiels précédents, ici les termes sont dérivés de la chimie et de la physique théorique. Autodock utilise les termes de Coulomb et de Van Der Waals du champ de forces AMBER [184]. La différence d'enthalpie d'interaction du complexe protéine-ligand est calculée en additionnant les contributions individuelles des différents types d'interactions. Elle est surestimée par rapport aux données expérimentales car l'énergie interne du ligand est considérée comme négligeable. Les interactions solvant-soluté sont prises en compte grâce à un solvant implicite.

Dans cette étude, nous avons conservé les méthodes de score implémentées dans FlexX, et Autodock afin de les évaluer. Nous avons également utilisé une autre

fonction de score empirique via le programme X-Score. Notre but est de tester la capacité de chaque méthode à affiner le classement des ligands issu du docking moléculaire et savoir dans quelle mesure ces résultats nous renseignent sur les points-clés et les mécanismes mis en jeu dans les interactions entre le récepteur et son ligand.

CHAPITRE IV RESULTATS ET DISCUSSIONS

Deux algorithmes de Docking moléculaire, FlexX 1.11 et Autodok 3.0.5 ont été sélectionnés pour simuler les interactions des composés naturels et de synthèse avec deux cibles enzymatiques : la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Ce choix est basé essentiellement sur la littérature et sur les résultats des tests de performance préalablement effectués au laboratoire. La qualité des résultats est d'abord jugée au moyen de deux critères : le RMSD (Root Mean Square Deviation) qui correspond à la moyenne de la déviation de chacun des atomes par rapport à ceux de la molécule d'origine et le coefficient de corrélation entre les valeurs d'énergie de Docking des molécules retenues dans cette étude et leurs IC₅₀.

L'étude est ensuite complétée par une analyse visuelle et par le nombre de liaisons hydrogène et d'interactions hydrophobes mis en jeu.

1- COEFFICIENT DE CORRELATION (r)

L'analyse par régression linéaire a été réalisée sur différents composés de synthèse dont l'activité biologique a déjà été testée sur la 15-lipoxygénase et la cyclooxygénase-2. La corrélation entre l'activité biologique et l'énergie d'interaction obtenue par docking moléculaire fut pour nous un des moyens pour tester la fiabilité des programmes FlexX et Autodock utilisés dans cette étude. L'analyse fut menée aussi bien sur la 15-lipoxygénase que sur la cyclooxygénase-2

1.1- Cas de la 15-lipoxygénase

Les deux programmes ont été testés de manière arbitraire sur deux groupes différents de molécules. L'analyse par régression linéaire a permis d'obtenir un coefficient de corrélation pour chacun des programmes utilisés (Tab 13)

Tableau 13: valeurs du coefficient de corrélation

Programmes	Autodock	FlexX
Coefficient de corrélation (r)	0,828	0,747

Le premier groupe correspond à des dérivés de la Tryptamine dont cinquante six structures ont été testées par Autodock (Tab. 14) Dans le deuxième groupe, le test a été réalisé par FlexX sur vingt trois structures dérivées du catéchol (Tab. 15)

Dans les deux cas, la valeur du coefficient de corrélation est supérieure à celle de la table de référence qui est de 0.422 au seuil de 5%. Il y a donc corrélation significative entre les deux paramètres analysés, à savoir l'activité biologique représentée ici par le pIC₅₀ et les énergies d'interaction données par les programmes Autodock et FlexX (Fig. 18,19)

Tableau 14 : résultats de l'analyse par régression linéaire sur les dérivés de la tryptamine

Composé	IC ₅₀ (μ M)	pIC ₅₀	Score_Autodock (Kj/mole)	Composé	IC ₅₀ (μ M)	pIC ₅₀	Score_Autodock (Kj/mole)
1	0,75	6,12	-32,70	29	6,30	5,20	-27,00
2	4,90	5,30	-21,05	30	2,90	5,54	-29,40
3	0,30	6,52	-46,85	31	0,47	4,33	-35,90
4	1,40	5,85	-41,47	32	>30	4,52	-13,20
5	3,73	5,45	-35,53	33	0,78	6,11	-39,34
6	>10	5,00	-18,08	34	0,11	6,96	-40,75
7	>10	5,00	-19,38	35	0,16	6,80	-38,70
8	3,20	5,50	-39,20	36	10,00	5,00	-18,70
9	4,00	5,40	-28,75	37	0,25	6,60	-35,40
10	1,02	6,00	-31,30	38	0,14	6,86	-47,03
11	4,20	5,38	-21,25	39	0,06	7,22	-50,46
12	0,46	6,33	-36,51	40	0,12	6,92	-43,10
13	0,32	6,50	-38,71	41	0,04	6,40	-50,17
14	0,47	6,33	-37,36	42	0,04	6,40	-50,20
15	0,47	6,33	-37,91	43	0,13	6,90	-41,20
16	0,14	5,85	-44,69	44	0,02	7,70	-50,66
17	0,20	6,70	-41,34	45	0,01	8,00	-53,18
18	0,17	6,77	-45,36	46	0,02	7,70	-50,46
19	0,23	6,64	-39,71	47	0,07	7,15	-51,07
20	1,09	5,93	-32,59	48	0,08	7,10	-51,90
21	>10	5,00	-12,30	49	0,16	6,80	-37,00
22	>10	5,00	-14,26	50	0,05	7,30	-52,05
23	>10	5,00	-17,12	51	0,03	7,52	-49,86
24	1,60	5,80	-30,76	52	0,11	6,96	-43,68
25	0,30	6,52	-39,32	53	0,03	7,52	-51,34
26	0,73	6,14	-32,55	54	0,14	6,85	-39,83
27	3,30	5,42	-28,87	55	4,05	5,40	-27,50
28	3,90	5,41	-25,41	56	0,38	4,42	-37,33

Tableau 15: résultats de l'analyse par régression linéaire sur les dérivés du catéchol

Composé	IC ₅₀ (μM)	pIC ₅₀	Score_FlexX (Kj/mole)
1	0,3	6,52	-22,92
2	>25	4,60	-15,10
3	0,4	6,39	-26,20
4	>25	4,60	-18,20
5	5	5,30	-17,20
6	0,3	6,52	-24,20
7	0,3	6,52	-23,90
8	1,2	5,92	-20,20
9	>25	4,60	-11,10
10	>25	4,60	-8,20
11	5	5,30	-14,50
12	0,4	6,39	-20,50
13	>25	4,60	-19,30
14	1,5	5,82	-21,31
15	0,4	6,39	-21,60
16	0,6	6,22	-20,20
17	1,45	5,83	-18,10
18	1,67	5,77	-17,56
19	1,47	5,83	-21,40
20	1,27	5,89	-28,00
21	1,51	5,82	-19,20
22	1,95	5,70	-18,56
23	1,01	5,99	-24,80

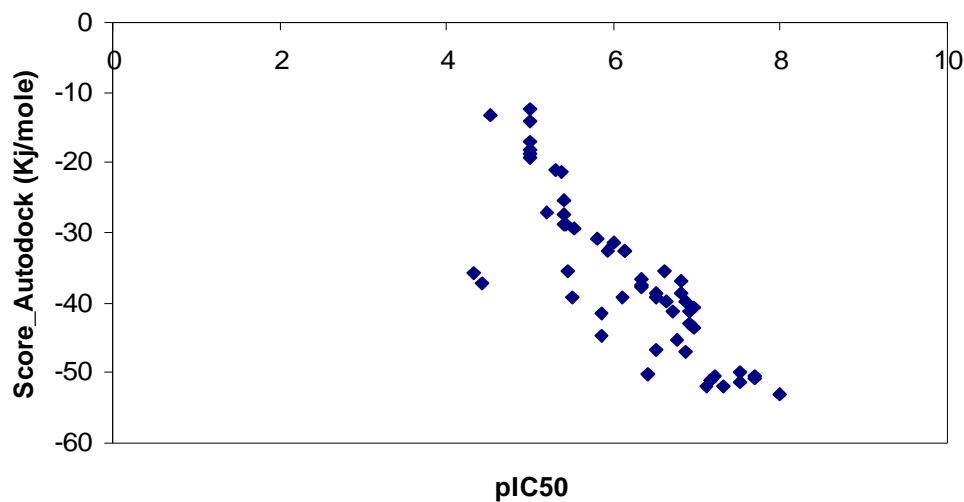


Figure 18: corrélation entre l'activité biologique (pIC_{50}) des dérivés de la Tryptamine et leurs énergies d'interaction avec la 15-LOX données par Autodock

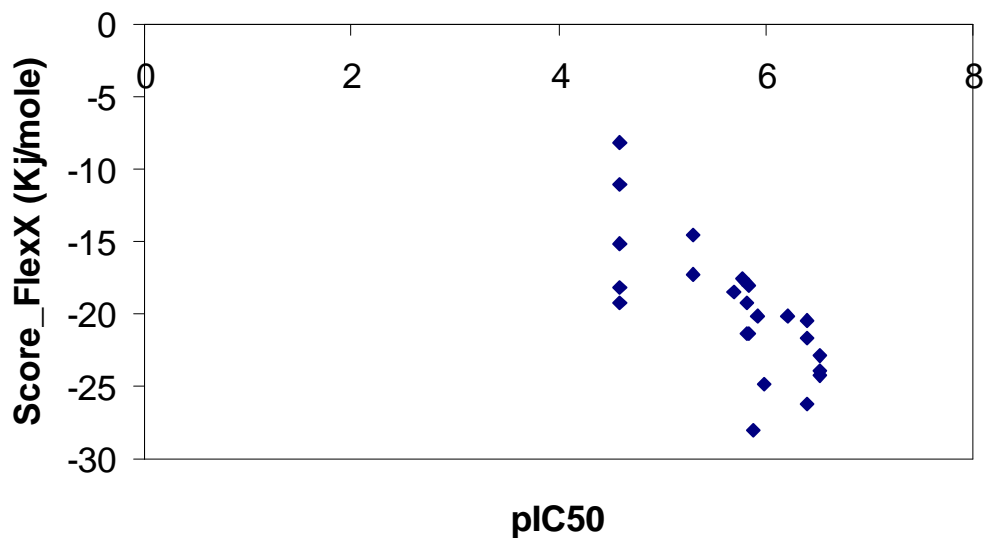


Figure 19: corrélation entre l'activité biologique (pIC_{50}) des dérivés du catéchol et leurs énergies d'interaction avec la 15-LOX données par FlexX

1.2- Cas de la cyclooxygénase

De la même manière que précédemment, les programmes Autodock et FlexX ont été testés sur deux ensembles de molécules. Le premier se compose de cinquante structures représentées essentiellement par des anti-inflammatoires non stéroïdiens et par des hétérocycles 1,2 diaryl (Tab. 16). Dans ce cas, le docking moléculaire a été réalisé par la méthode FlexX. Le deuxième ensemble représente la classe des composés 1,3 diaryl hétérocycliques. On y retrouve la structure de trente deux composés différents dont l'énergie d'interaction a été modélisée par la méthode Autodock (Tab. 117)

Tableau 16: relation entre l'activité biologique et l'énergie d'interaction donnée par FlexX

Composé	IC ₅₀ (μM)	pIC ₅₀	Score_FlexX (Kj/mole)	Composé	IC ₅₀ (μM)	pIC ₅₀	Score_FlexX (Kj/mole)
1	0,05	7,30	-25,80	26	9,08	5,01	-13,90
2	0,46	6,34	-20,50	27	5,20	5,28	-9,88
3	0,86	6,06	-28,70	28	13,40	4,87	-14,14
4	0,70	6,12	-20,20	29	2,20	5,66	-17,56
5	0,70	6,12	-21,60	30	17,50	4,76	-13,25
6	0,05	6,33	-10,60	31	2,00	5,70	-28,00
7	14,22	4,85	-19,67	32	18,90	4,72	-16,20
8	10,43	4,98	-11,77	33	4,70	5,33	-22,90
9	9,70	5,01	-13,58	34	>33	4,48	-16,01
10	6,46	5,19	-25,70	35	>33	4,48	-23,65
11	8,99	5,05	-20,00	36	>33	4,48	-15,47
12	7,09	5,15	-19,10	37	>33	4,48	-13,20
13	1,08	5,97	-26,80	38	>33	4,48	-11,97
14	>30	4,52	-8,84	39	>33	4,48	-6,85
15	>30	4,52	-12,15	40	>33	4,48	-15,29
16	73,74	4,13	-19,65	41	>33	4,48	-13,41
17	0,06	7,22	-20,30	42	>30	4,48	-15,62
18	1,00	6,00	-24,10	43	>30	4,48	-13,53
19	0,50	6,30	-21,60	44	>33	4,48	-15,20
20	0,89	6,05	-24,87	45	59,00	4,00	-31,00
21	1,00	6,05	-14,68	46	100,00	4,00	-32,00
22	0,19	6,72	-22,92	47	inactif	-	-23,25
23	0,03	7,52	-14,50	48	>33	4,48	-19,68
24	0,08	7,10	-28,54	49	0,08	7,10	-12,20
25	0,40	6,40	-28,10	50	0,12	6,92	-12,88

Tableau 17 Test de corrélation entre l'activité biologique et l'énergie d'interaction donnée par la méthode Autodock

Composé	IC50 (nM)	pIC50	Score_Autodock (Kj/mole)
51	1,5	8,82	-27,20
52	3,3	8,48	-24,80
53	>1000	6,00	-21,40
54	1,8	8,74	-20,30
55	500	6,30	-12,10
56	>100	7,00	-18,20
57	1,7	8,77	-27,20
58	500	6,30	-11,20
59	16,7	7,78	-12,00
60	21,3	7,67	-16,40
61	5	8,30	-21,00
62	42	7,38	-17,20
63	>100	7,00	-20,30
64	3,1	8,51	-27,50
65	14,5	7,84	-22,10
66	>1000	6,00	-5,90
67	0,7	9,15	-27,50
68	2,9	8,54	-26,00
69	>100	7,00	-11,10
70	>100	7,00	-16,70
71	2,6	8,58	-15,70
72	4,5	8,35	-18,80
73	700	6,15	-15,10
74	>10000	5,00	-14,50
75	1,6	8,79	-11,50
76	35,6	7,45	-14,50
77	>100	7,00	-30,70
78	>100	7,00	-19,60
79	>100	7,00	-17,80
80	50	7,30	-25,90
81	10,9	7,96	-16,20
82	28,7	7,54	-13,50

Les coefficients de corrélation obtenus à l'issue des tests inhérents aux méthodes FlexX et Autodock sont représentés dans le tableau 18

Tableau 18: valeurs du coefficient de corrélation

Programmes	Autodock	FlexX
Coefficient de corrélation (r)	0,670	0,731

Les valeurs du tableau montrent encore une fois, une corrélation significative entre l'activité biologique (pIC_{50}) et les scores d'énergie donnés par les programmes FlexX et Autodock. (Fig 20,21)

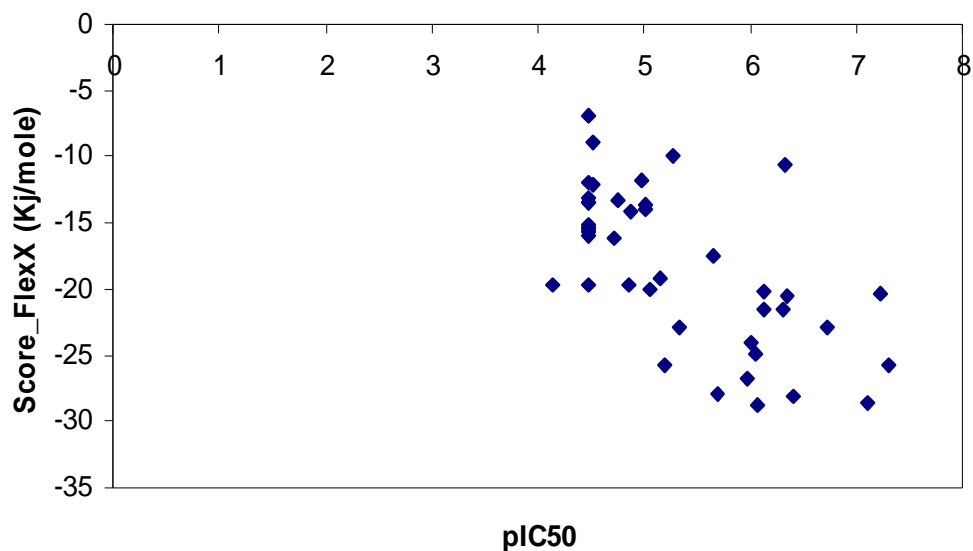


Figure 20 corrélation entre l'activité biologique (pIC_{50}) et l'énergie d'interaction avec la COX-2 donnée par FlexX

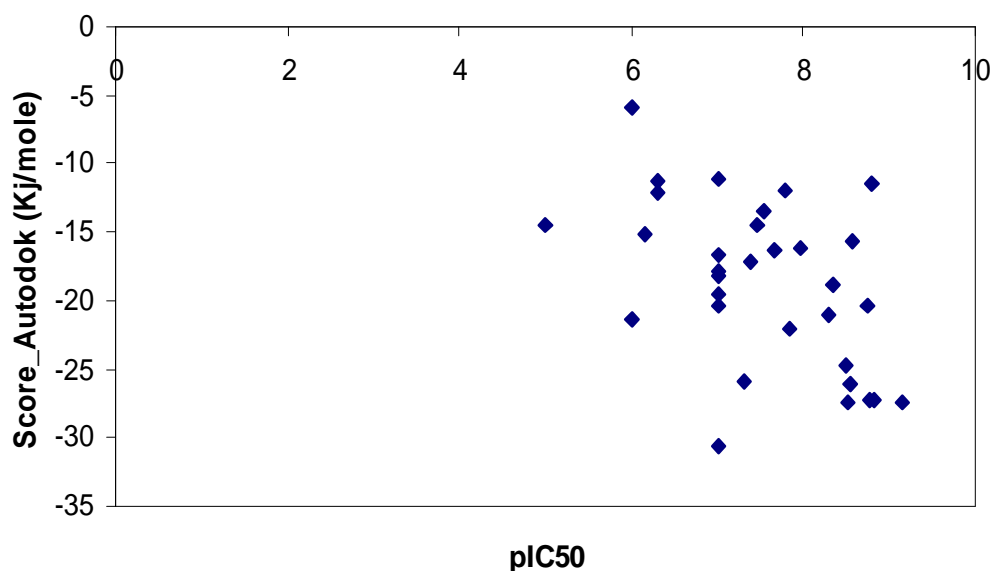


Figure 21 corrélation entre l'activité biologique (pIC_{50}) et l'énergie d'interaction avec la COX-2 donnée par Autodock

1.3- Conclusion

L'analyse par régression linéaire a permis de tester les méthodes FlexX et Autodock. Chaque programme a été testé sur près d'une centaine de molécules avec différentes structures chimiques. La détermination du coefficient de corrélation entre l'activité biologique et l'énergie d'interaction semble être un bon moyen pour tester la fiabilité des programmes considérés dans cette études. En effet les valeurs obtenues avec la 15-lipoxygénase et la cyclooxygénase-2 nous permettent de conclure que les programmes FlexX et Autodock représentent des outils de choix pour prédire les potentialités biologiques d'une structure moléculaire donnée.

2- APPRECIATION DU RMSD

Le test par le RMSD a été réalisé directement à partir de complexes de lipoxygénase et de cyclooxygénase disponibles au niveau de la Protein Data Bank. Les résultats sur le coefficient de corrélation des programmes FlexX et Autodock étant satisfaisants, nous avons choisi de réaliser les tests de déviation du RMS en attribuant un seul programme par cible enzymatique considérée. FlexX servira pour l'étude la lipoxygénase et Autodock pour la cyclooxygénase.

2.1-Interactions avec la lipoxygénase

Le programme FlexX a été testé sur deux types de lipoxygénase : la 15-lipoxygénase et la 3-lipoxygénase. Dans le premier cas, le test fut mené sur l'unique complexe de la 15-lipoxygénase de lapin disponible au niveau de la PDB portant le code 1LOX. Dans le deuxième cas, trois complexes différents de la 3-lipoxygénase de soja ont été utilisés : 1N8Q, 1NO3 et 1HU9.

Dans tous les cas, le docking moléculaire donne des valeurs de RMSD inférieures à 2 Å (Tab. 19). On obtient une superposition maximale de la conformation optimale du ligand obtenue par docking moléculaire avec la géométrie du même ligand donnée par diffraction des rayons-X (Fig. 22,23,24 et 25).

Tableau 19: Valeurs du RMSD des différents complexes proteine-ligand

Ligand	Code PDB	Enzyme	RMSD (Å)
AOP	1LOX	15-LOX	0.775
DHB	1N8Q	3-LOX	0.922
4NC	1NO3	3-LOX	0.911
4HM	1HU9	3-LOX	0.563

AOP = acide 3-(2- octylphenyl) propanoïque

DHB = acide 3,4 dihydrobenzoïque

4NC = 4-nitrocatéchol

4HM = 4-hydroperoxyméthyl 2-méthoxyphenol

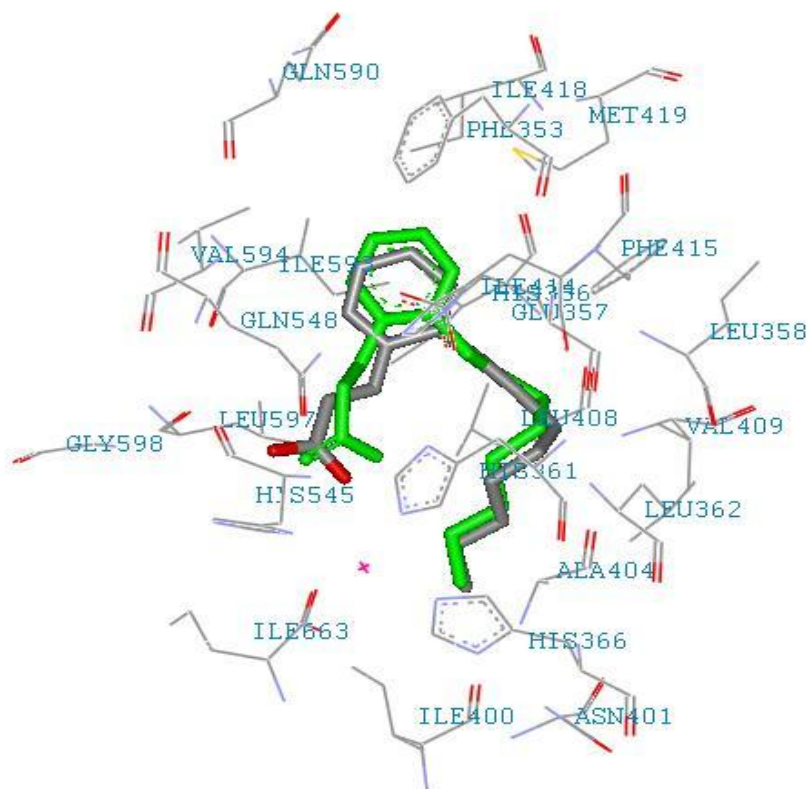


Figure 22. Superposition du ligand AOP donné par rayon-X (coloré par type d'atome) et par docking moléculaire (coloré en vert) avec FlexX. Pour la clarté de l'image les hydrogènes des acides aminés et du ligand ne sont pas représentés.

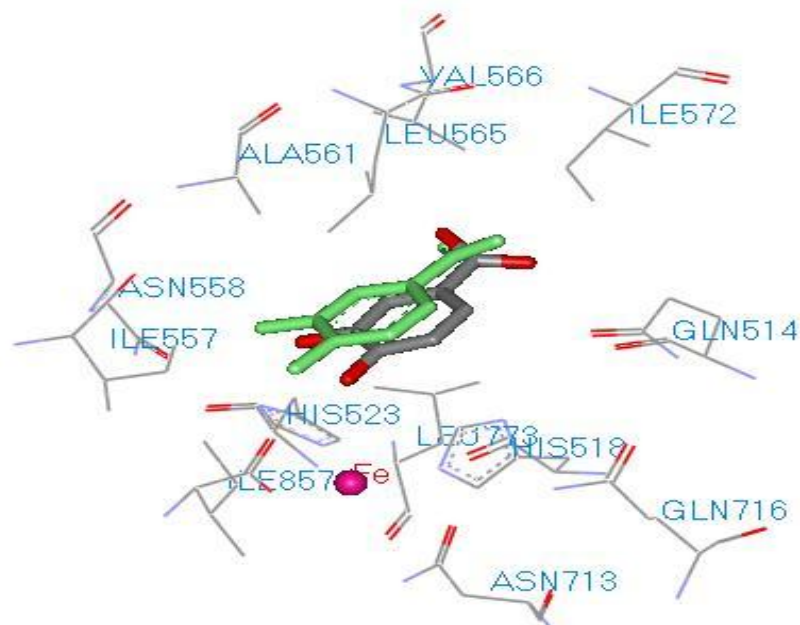


Figure 23. Comparaison de la géométrie du DHB donnée par rayon-X (coloré par type d'atome) avec celle obtenue par docking moléculaire (coloré en vert). Les hydrogènes des acides aminés et du ligand ne sont pas représentés pour plus de clarté .

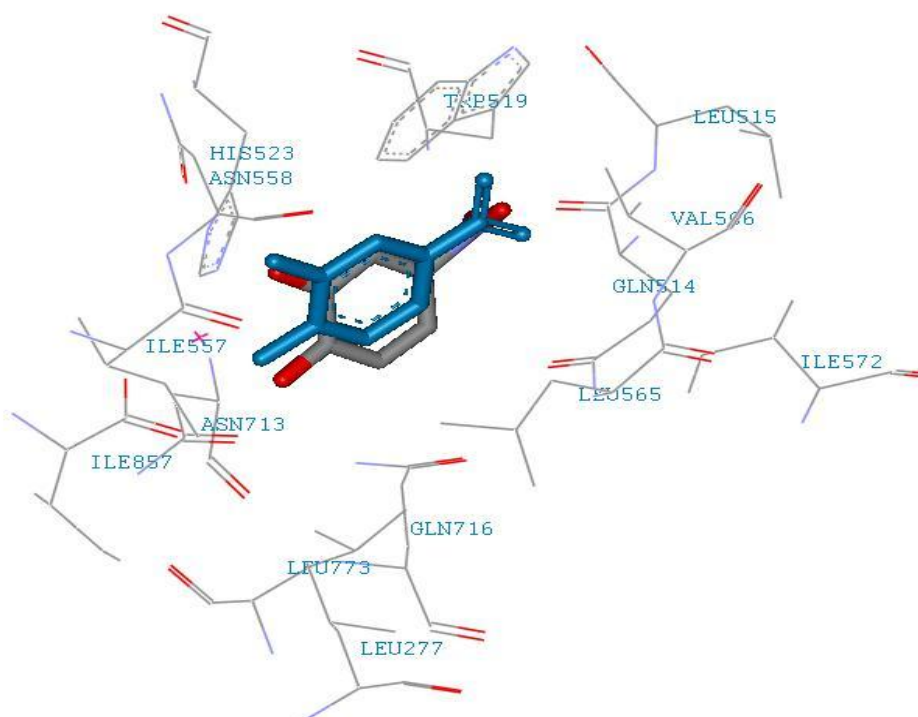


Figure 24. Superposition du ligand 4NC donné par rayon-X (coloré par type d'atome) et par docking moléculaire (coloré en vert) avec FlexX. Pour la clarté de l'image les hydrogènes des acides aminés et du ligand ne sont pas représentés

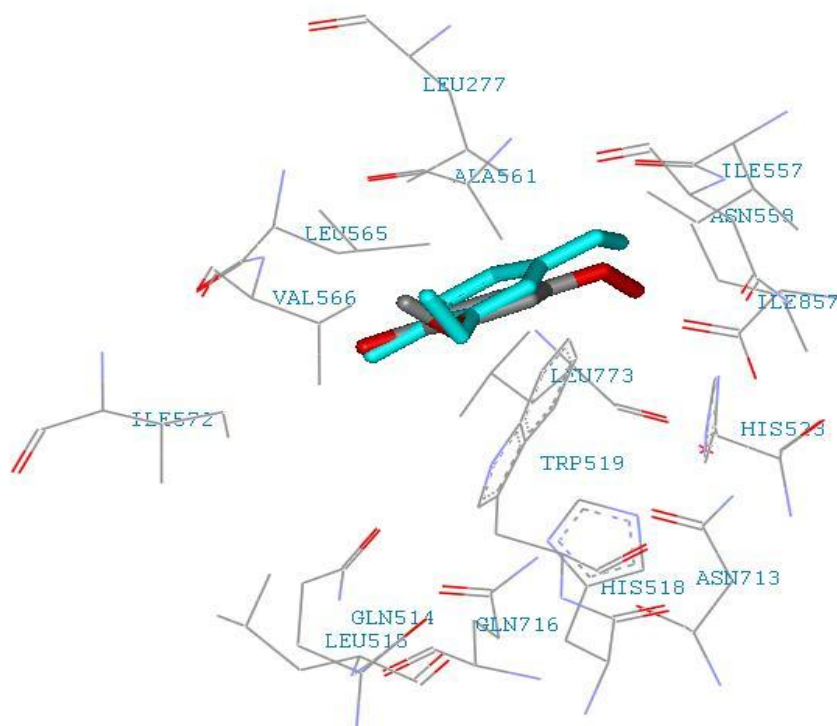


Figure 25. Comparaison des géométries de l'inhibiteur 4HM données par rayon-X (coloré par type d'atome) et par docking (coloré en vert) avec FlexX. Les hydrogènes des acides aminés et du ligand ne sont pas représentés pour plus de clarté .

La reproductibilité par FlexX, des modes de liaison des ligands co-cristallisés, avec de faibles valeurs du RMSD (≤ 2 Å) témoignent de la haute performance du programme utilisé.

2.2-Interactions avec la cyclooxygénase-2

Le programme Autodock a été testé sur trois complexes de la cyclooxygénase-2 (COX-2) de souris disponibles au niveau de la PDB : 1CX2, 3PGH et 4COX (Tab. 20).

Tableau 20 : valeurs du RMSD des trois ligands de la COX-2

Ligand	Code PDB	Enzyme	RMSD (Å)
SC-558	1CX2	COX-2	1.062
Flurbiprofen	3PGH	COX-2	1.524
Indomethacin	4COX	COX-2	0.799

Les conformations donnant la meilleure énergie de liaison sont alignées avec les conformations expérimentales des ligands. Il apparaît une bonne superposition des solutions du docking avec les coordonnées des structures observées expérimentalement (Fig. 26,27 et 28).

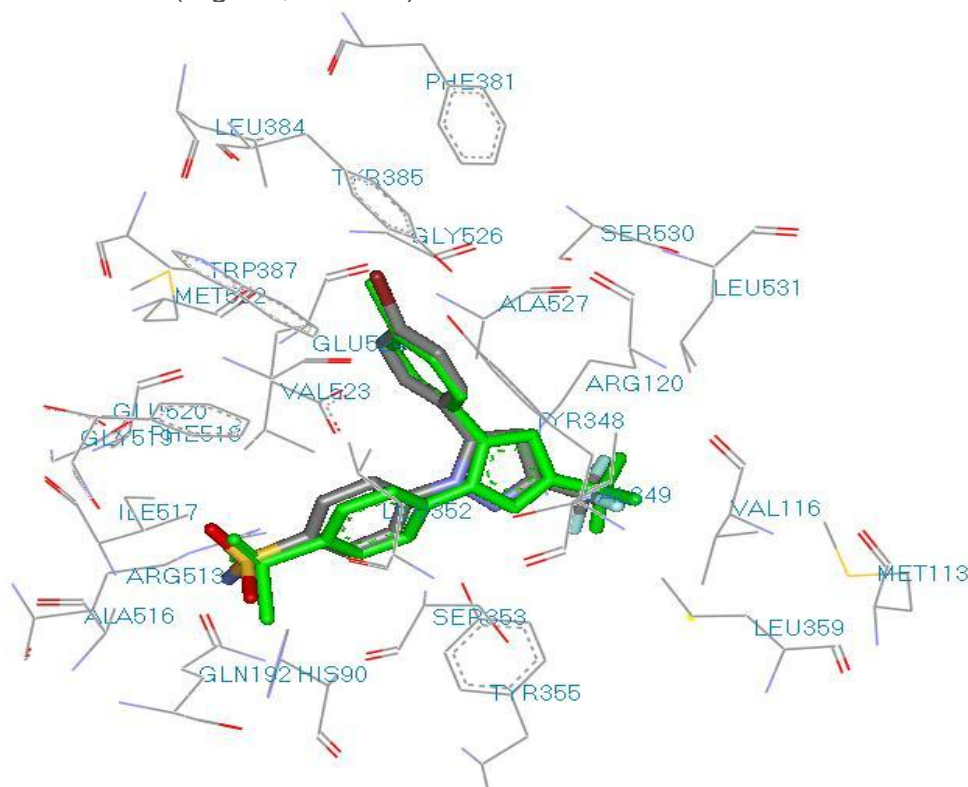


Figure 26. Aligment des conformations expérimentale (colorée par type d'atome) et calculée (colorée en vert) de l'inhibiteur SC-558. Les hydrogènes sont supprimés pour la clarté de l'image.

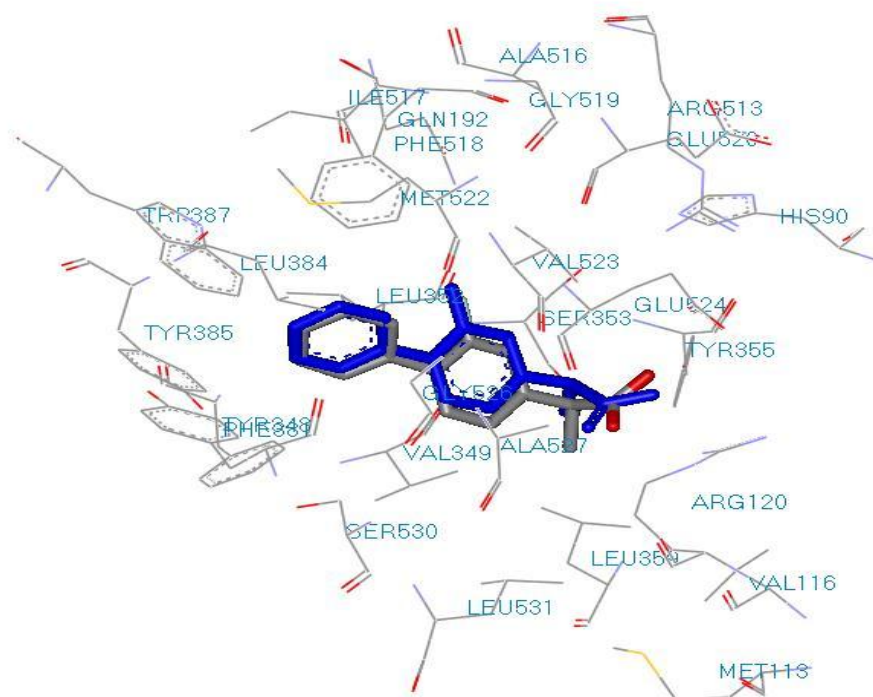


Figure 27. Alignement de la géométrie du Flurbiprofen donnée par rayon-X (coloré par type d'atome) avec celle obtenue par Autodock (coloré en bleu). Les hydrogènes ne sont pas représentés pour une meilleure clarté de l'image.

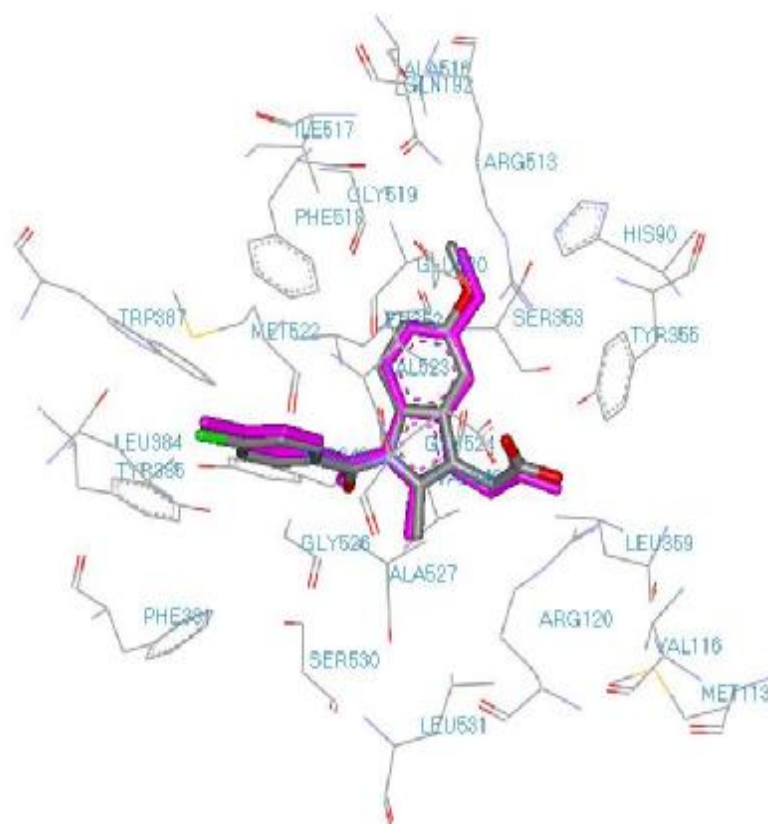


Figure 28. Comparaison de la conformation expérimentale de l'indométhacine (colorée par type d'atome) avec sa conformation optimale calculée avec Autodock (colorée en pourpre) .

Les faibles valeurs du RMSD ($\leq 2 \text{ \AA}$) entre les conformations expérimentales et calculées apportent la preuve de la fiabilité du programme Autodock.

2.3-Conclusion

Le test par le RMSD nous permet de conclure, en plus du test par le coefficient de corrélation, que FlexX et Autodock sont des méthodes qui fonctionnent correctement. Elles sont parfaitement adaptées au docking moléculaire de ligands de petite taille. Elles peuvent donc être utilisées, sans trop risque d'erreurs, dans l'étude des dérivés 1,3 diphényl et des flavonoïdes qui nous intéressent ici .

3- ETUDE DES INTERACTIONS AVEC LES LIPOXYGENASES PAR FlexX

Afin d'élucider les mécanismes de l'inhibition des lipoxygénases, deux types d'enzymes ont été retenus dans cette étude : la 15-lipoxygénase de lapin et la 3-lipoxygénase de soja.

3.1-Interactions avec la 15-lipoxygénase

La modélisation de l'énergie d'interaction a été réalisée avec des composés naturels appartenant à la classe des flavonoïdes et des composés de synthèse dérivés de la structure 1,3 diphényle propyne-2-one (Tab. 21).

Tableau 21. Résultats des tests in vitro des composés naturels et des composés dérivés 1,3 diphényl prop-2-yne-1-one

Composé	15-LOX			COX-2		
	IC50 (μM)	pIC50	Score_FlexX (Kj/mole)	IC50 (μM)	pIC50	Score_Autodock (Kj/mole)
a	>10	5.00	-8.84	10.0	5.00	-17.56
b	>10	5.00	-12.15	33.0	4.48	-14.14
c	>10	5.00	-16.01	>100	4.00	-23.25
d	3.2	5.49	-22.90	1.0	6.00	-24.10
e	3.5	5.45	-20.30	31.5	4.50	-13.25
f	0.32	6.49	-26.80	>10.0	5.00	-20.00
g	>10	5.00	-23.65	10.0	5.00	-19.10
h	0.5	6.30	-10.60	>100	4.00	-13.20
i	>10	5.00	-11.77	100	4.00	-6.85
j	1.0	6.00	-24.10	0.1	7.00	-28.54
k	3.2	5.49	-21.60	0.5	6.30	-20.50
l	0.1	7.00	-28.70	30	4.52	-19.67
m	0.3	6.52	-23.75	3.2	5.49	-22.90
Lutéoline	0.6	6.22	-27.50	---	---	---
Baicaléine	1.0	6.00	-24.80	---	---	---
Fiséline	1.5	5.82	-24.10	---	---	---
ANDG	4.9	5.30	-20.00	---	---	---
Jaspaquinol	0.3	6.52	-14.60	---	---	---

ANDG = Acide NorDihydro Guaiarétique

Les composés de synthèse inhibent aussi bien la 15-lipoxygénase que la cyclooxygénase-2. Cette dualité n'apparaît pas avec les flavonoïdes qui se présentent seulement comme inhibiteurs de la 15-lipoxygénase. Ceci nous offrira l'avantage de modéliser leur énergie d'interaction avec la cyclooxygénase-2 en vue d'étudier leur activité biologique vis à vis de cette enzyme.

La structure de la 15-lipoxygénase a été obtenue à partir du complexe 1LOX auquel fut retiré le ligand.

3.1.1- cas du composé I

Parmi les molécules de synthèse, le composé I présente la meilleure énergie d'interaction avec l'enzyme 15-LOX ($\Delta G = -28.70$ KJ/mol). Il y a une corrélation hautement significative entre son énergie d'interaction et son effet inhibiteur représenté par un IC_{50} de $0.1 \mu M$. Le substituant C3-p-MeSO₂ phényle de la molécule se situe à l'ouverture de la cavité où il est entouré par les résidus Met419, Gln590, Phe353, Phe415, Val594, Ile593 et Glu357 (Fig.29). Le groupement méthyle de cette substitution établit des contacts de Van Der Waals avec les résidus Val594 et Phe353 ($d < 3 \text{ \AA}$). Le substituant méthoxyphénol lié au C-1 de la molécule est orienté vers la région formée par les résidus His361, Ala404, Ile400, Asn401, His366 et Leu362. On y observe trois ponts hydrogènes dont l'un entre l'hydroxyle phénolique et Leu362 ($O-H \dots O=C-Leu362$, $d = 2.41 \text{ \AA}$), et les deux autres entre le groupement méthoxyle et les résidus Asn401 ($H_3C-O \dots H-ND_2-Asn401$, $d = 2.28 \text{ \AA}$) et His366 ($H_3C-O \dots H-ND_1-His366$, $d = 2.84 \text{ \AA}$). Enfin la chaîne prop-2-yne-1-one ($C=C-C=O$) reliant les deux phényles de la molécule est stabilisée par les résidus Leu408 et Leu597 par des interactions hydrophobiques.

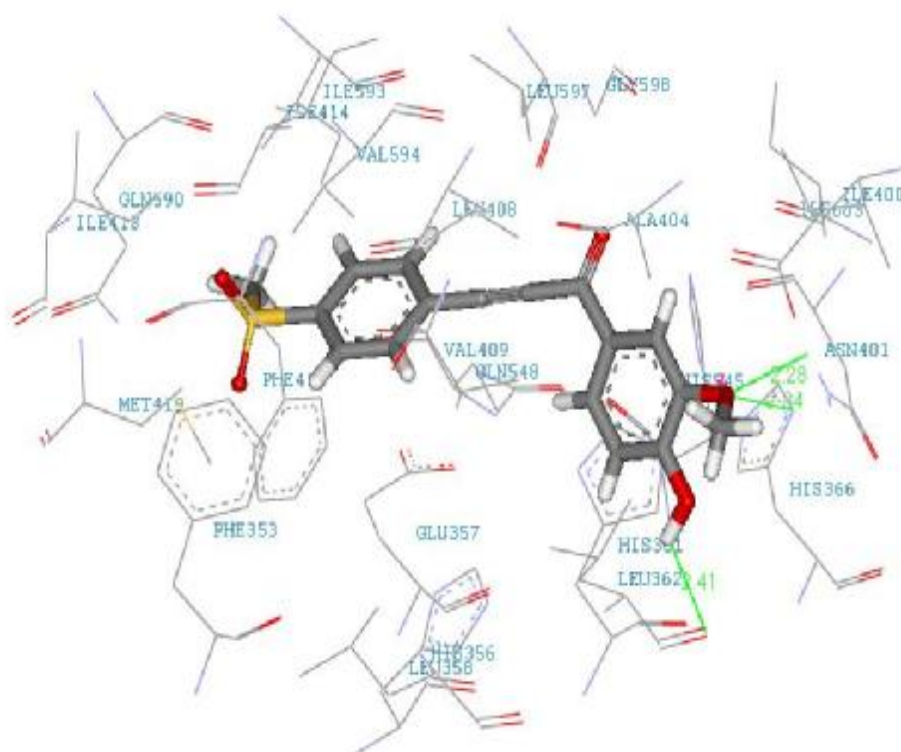
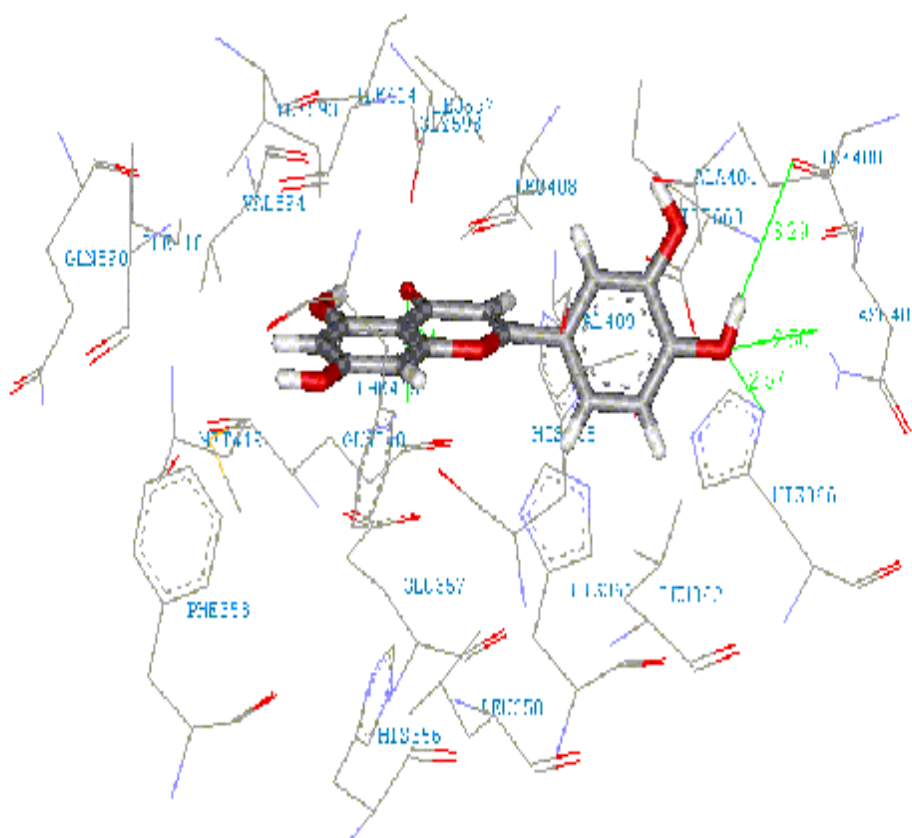


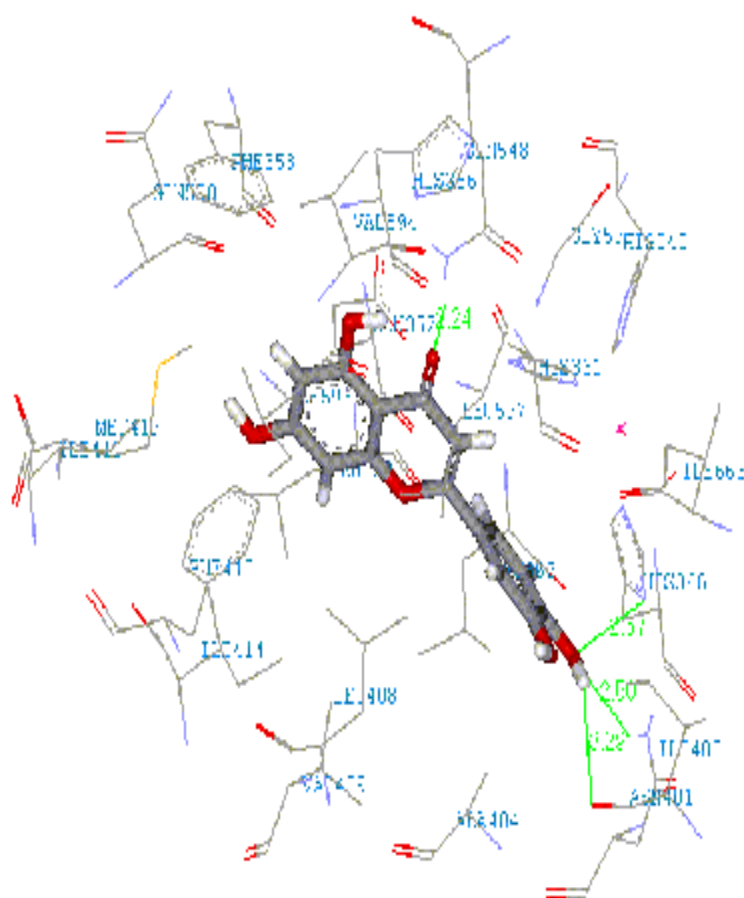
Figure 29 Mode de liaison du composé I avec le site actif de la 15-lipoxygénase

3.1.2- cas de la lutéoline

Dans le cas des substances naturelles, la lutéoline avec une énergie de liaison de -27.50 Kj/mole donne le complexe enzyme-inhibiteur le plus stable. De la même manière que le composé de synthèse I, l'énergie d'interaction de la lutéoline est corrélée à son activité biologique dont l'IC₅₀ ne dépasse pas 0.6 µM. La molécule est bien centrée dans le site actif de l'enzyme (Fig. 30). Son phényl latéral (noyau B) est entouré par les résidus His361, His366, Ile400, Asn401, Ala404 et Leu362. L'hydroxyle en position 4' établit, par l'intermédiaire de son atome d'oxygène, un pont hydrogène avec l'un des atomes d'azote du cycle du résidu His366 (H-O.....H-ND₁; d = 2.57 Å) et un pont hydrogène avec la fonction amine latérale de Asn401 (H-O....HND₂; d = 2.50 Å). Un troisième pont hydrogène est formé avec le carbonyle de Ile400 (C-4'O-H....O=C-Cα ; d = 3.29 Å). Le fer est situé à une distance d'environ 4.56 Å du noyau B. Le carbonyle de l'hétérocycle central de la molécule forme un quatrième pont hydrogène avec la fonction amine du résidu Gln548 (C=O....HNE2 ; d = 2.24 Å). Enfin, les cycles A et C de la lutéoline sont stabilisés par des contacts de Van Der Waals par les résidus Leu408, Phe415, Val594 et Leu597.



(a)



(b)

Figure 30. Docking de la lutéoline dans le site actif de 1LOX (a et b)

3.2- Interactions avec la 3-lipoxygénase

Le docking moléculaire réalisé antérieurement avec les trois complexes 1N8Q, 1NO3 et 1HU9 nous a permis d'obtenir, en plus du RMSD (Tab. 12), leurs énergies d'interaction (Tab.22).

Tableau 22: Energies d'interactions des trois complexes de la 3-Lipoxygénase

Ligand	Code PDB	Enzyme	Energie d'interaction(Kj/mol)
DHB (1)	1N8Q	3-LOX	-10.564
4NC (2)	1NO3	3-LOX	-8.337
4HM (3)	1HU9	3-LOX	-5.539

Il ressort de ce tableau que le composé 1, l'acide 3,4 dihydrobenzoïque (DHB) ou acide protocatéchuïque présente la meilleure énergie de liaison ($\Delta G = -10.564$ KJ/mol). Ce composé provient de la dégradation oxydative de la quercétine au sein de la 3-lipoxygénase et serait responsable de son inhibition [67].

L'analyse visuelle montre que son groupement C3-OH forme une liaison hydrogène avec l'azote ND1 du résidu His523 ($d = 2.91 \text{ \AA}$). Le groupement C4-OH établit une liaison hydrogène avec le carbonyle C=O du résidu C-terminal Ile857 ($d = 2.36 \text{ \AA}$) et le fer ($d = 3.48 \text{ \AA}$). Enfin, la fonction carboxylique est engagée dans une liaison hydrogène avec le résidu Gln514 (3.22 \AA)

Le changement de structure du DHB permet d'obtenir huit molécules (composés 4-11) (Tab.23) qu'on peut répartir en deux groupes. Dans le premier groupe (composés 4-8), la fonction carboxylique de l'inhibiteur DHB est remplacé par d'autres groupements fonctionnels tels que le groupement hydroxy-méthyl (composé 4), le groupement carboxy-méthyl (composé 5), le groupement amine (composé 6), le groupement amide (composé 7) et le groupement méthyl amine (composé 8).

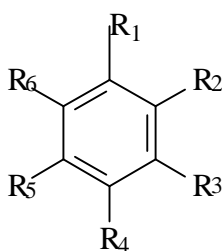
Tableau 23. Structure moléculaire des ligands co-cristallisés et proposés de 3-LOX
(Le squelette de base de ce composé figure en bas du tableau)

Ligand	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1 (DHB)	COOH		OH	OH		H
2 (4NC)	NO ₂		OH	OH		H
3 (4HM)	O-OH		OCH ₃	OH		H
4	CH ₂ OH		OH	OH		H
5	CH ₂ COOH		OH	OH		H
6	NH ₂		OH	OH		H
7	CONH ₂		OH	OH		H
8	CH ₂ NH ₂		OH	OH		H
9	COOH		OH	OH	OH	H
10	COOH	OH			OH	H
11	COOH		OCH ₃	OH		H

DHB = acide 3,4 dihydrobenzoïque

4NC = 4-nitrocatechol

4HM = 4-hydroperoxyméthyl 2-méthoxyphenol



Dans le second groupe (composés 9-11), il s'agit de composés similaires tirés directement de la banque de données PDB : la fonction carboxylique du DHB est maintenue, seule change la position ou la nature des groupements hydroxyles en 3 et ou 4.

Le but de ces modifications structurales est de diminuer l'énergie d'interaction du complexe protéine-ligand. Afin de faire une évaluation la plus réaliste de l'énergie d'interaction, nous avons fait appel, en plus de FlexX, à deux autres programmes : Autodock et X-score. Les calculs de docking révèlent une augmentation de l'énergie d'interaction de tous les nouveaux ligands (Tab. 24). Le meilleur résultat est donné par le composé 4 avec les trois programmes utilisés. Par ailleurs, FlexX et X-score attribuent un score d'énergie en faveur du composé 9 qu'on retrouve en deuxième position. Le résultat en faveur du composé 5 enregistré par Autodock, n'influence en rien ceux obtenus avec FlexX et X-score., en regard de la marge d'erreur de 2 KJ/mol tolérée par le premier programme.

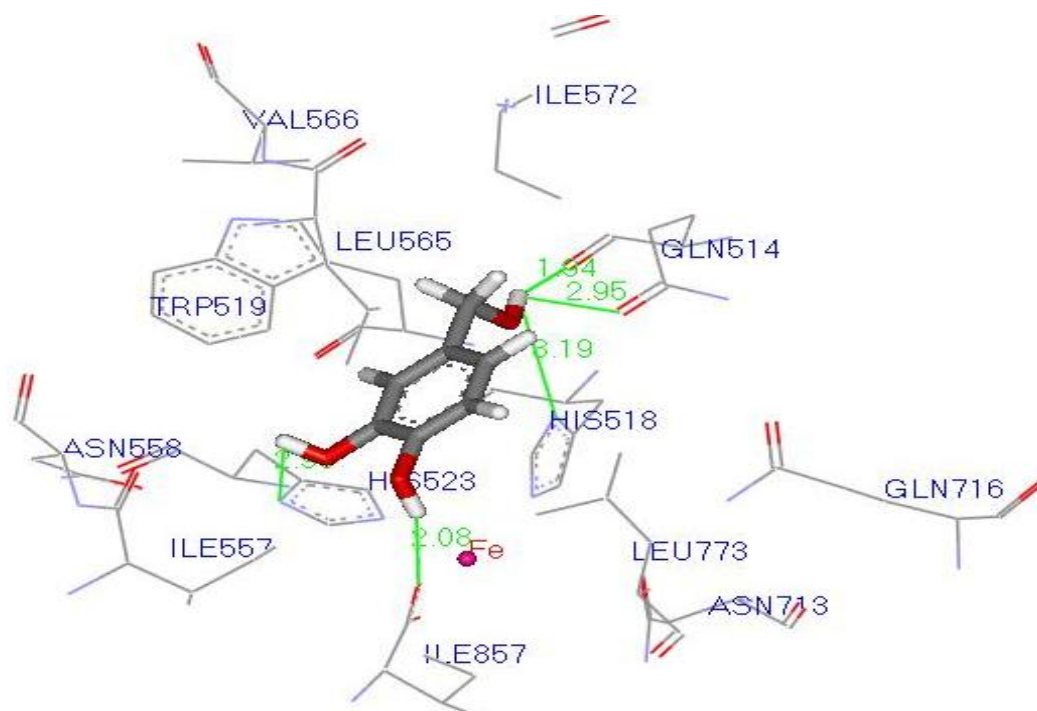
Tableau 24: Valeurs des énergies de liaison des complexes formés entre 3-LOX et les composés 4-11

Composé	4	5	6	7	8	9	10	11
Energie d'interaction (Kj/mol)								
FlexX	-21.13	-15.40	-15.00	-14.10	-12.70	-17.00	-12.05	-11.93
Autodock	-29.13	-25.30	-21.06	-20.70	-17.07	-23.40	-13.61	-16.00
X-score	-31.31	-24.72	-23.15	-24.04	-22.00	-27.10	-20.50	-21.86

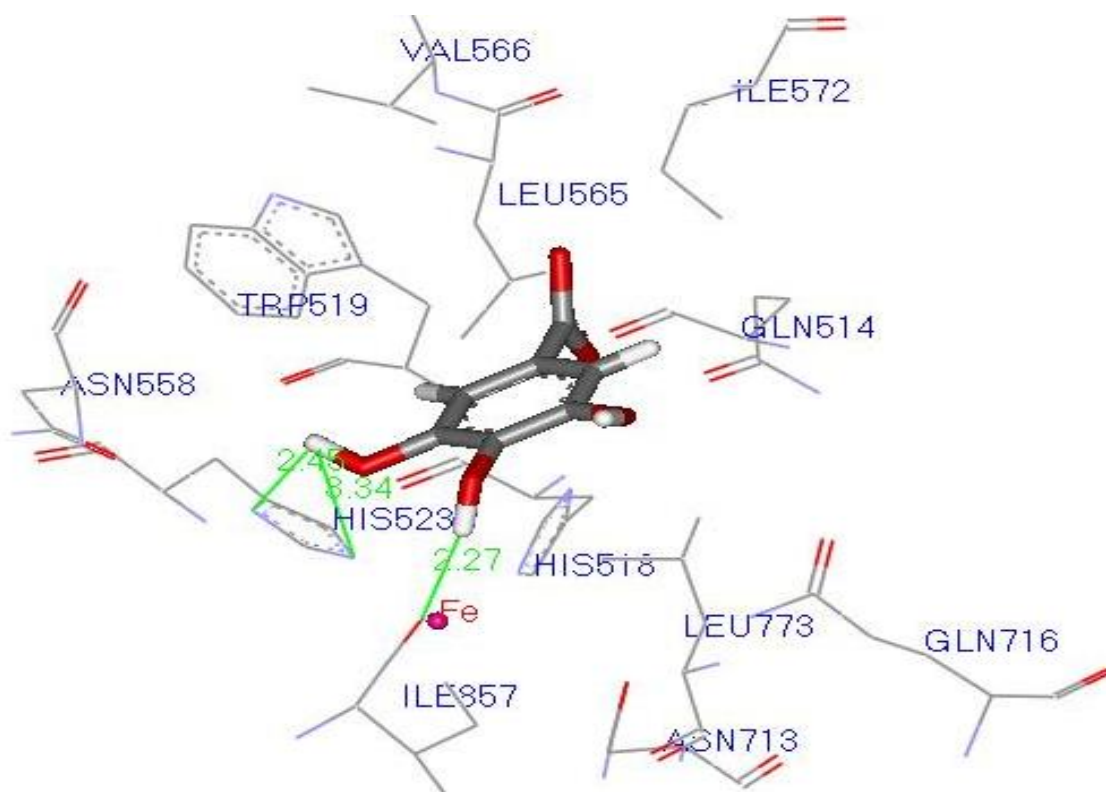
Le remplacement de la fonction carboxylique du DHB par le groupement -CH₂OH dans le composé 4 donne la meilleure énergie d'interaction. La nouvelle fonction développe deux liaisons hydrogènes avec les résidus Gln514 (CH₂O-H...O=C-CA ; d = 1.94 Å) et His518 (CH₂O-H...ND1 ; d = 3.19 Å) respectivement.

De plus, le composé 4 est stabilisé par des interactions aromatiques avec les résidus His518, Trp519, His523 et des interactions de Van Der Waals avec les résidus Leu565 et Leu773 (distance < 4 Å). La distance entre le composé 4 et le fer est de 4.90 Å.

Dans le cas du composé 9, l'augmentation de son énergie de liaison peut être attribuée à la formation d'une nouvelle liaison hydrogène entre le C3-OH et l'azote NE2 du résidu His523 (d = 3.34 Å). Des interactions hydrophobiques sont aussi observées avec les résidus His518, Trp519, His523 Leu565, Leu773 et Ile572. La distance entre le C3-OH et le fer est de 4.72 Å (Fig. 31).



(a)



(b)

Figure 31. Modes de liaison des ligands 4 (a) et 9 (b) avec le site actif de l'enzyme LOX-3. Les tirets verts représentent les liaisons hydrogènes.

L'activité inhibitrice des composés 4-11 vis à vis de la 3-lipoxygénase a été examinée par des études de docking dans le site actif de l'enzyme. Parmi les huit composés utilisés dans cette étude, le composé 4 forme le complexe protéine-ligand le plus stable ; il présente donc le meilleur effet inhibiteur. Le remplacement de la fonction carboxylique de l'inhibiteur de départ DHB par le groupement hydroxyméthyl diminue nettement son énergie de liaison jusqu'à -21.13 kJ/mole, si l'on se réfère aux résultats donnés par FlexX. Les résultats de docking montrent que les composés 4-11 peuvent contribuer au développement d'inhibiteurs plus actifs vis-à-vis de la lipoxygénase.

4-ETUDE DES INTERACTIONS AVEC LA CYCLOOXYGENASE-2 PAR Autodock

4.1- interaction des ligands co-cristallisés

L'inhibiteur SC-558 établit quatre ponts hydrogènes avec Arg513, His90 et Ser353 par l'intermédiaire de son groupement aminosulfonyl (Fig. 32). Ce dernier est engagé par l'un de ces atomes d'oxygène dans une liaison avec l'amine latérale de Arg513 (S=O...H-N; d = 2.15 Å). La fonction amine de ce groupement forme trois ponts hydrogènes dont deux avec le résidu Ser355 (N-H1...O=C-C α -Ser355; d1 = 2.40 Å et N-H2...O=C-C α -Ser355; d2 = 2.43 Å) et le troisième avec l'un des azotes du cycle de His90 (N-H1...N-His90; d = 2.28 Å). Les mêmes observations sont données par Plout-Price et coll. [185].

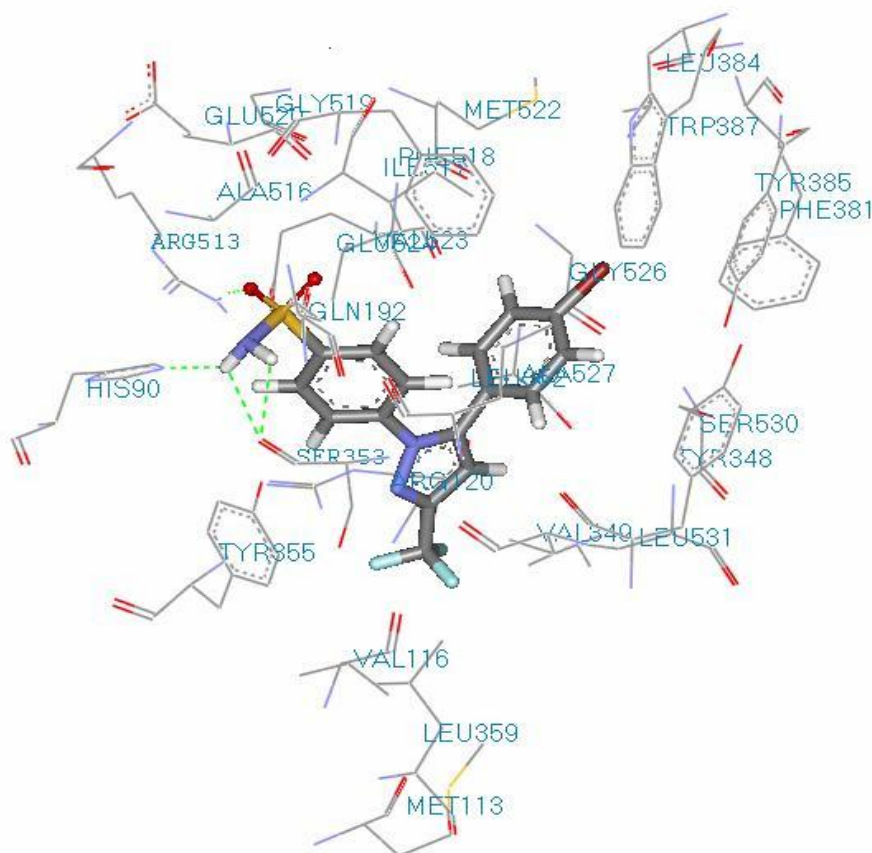


Figure 32. Mode d'interaction du ligand SC-558 avec le site actif de COX-2

La fonction carboxylique du flurbiprofen et de l'indométhacine est orientée dans une position favorable à une interaction avec l'hydroxyle du résidu Tyr355 et le groupement guanidium de Arg120 (Fig. 33,34). Les distances des deux ponts hydrogènes formés par ces deux inhibiteurs sont respectivement de 1.89 Å et 1.62 Å avec le résidu Tyr355 (C-O...H-O-Tyr355) et de 2.44 Å et 1.88 Å avec Arg120 (C-O...H-N-Arg120). Dans le cas de l'indométhacine, une liaison supplémentaire est observée entre l'autre atome d'oxygène et Tyr355 (C=O...H-O-Tyr355; d = 2.29 Å). Des résultats similaires sont donnés par Autodock [186] et Dock4.0 [187] avec d'autres agents Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens (AINS)

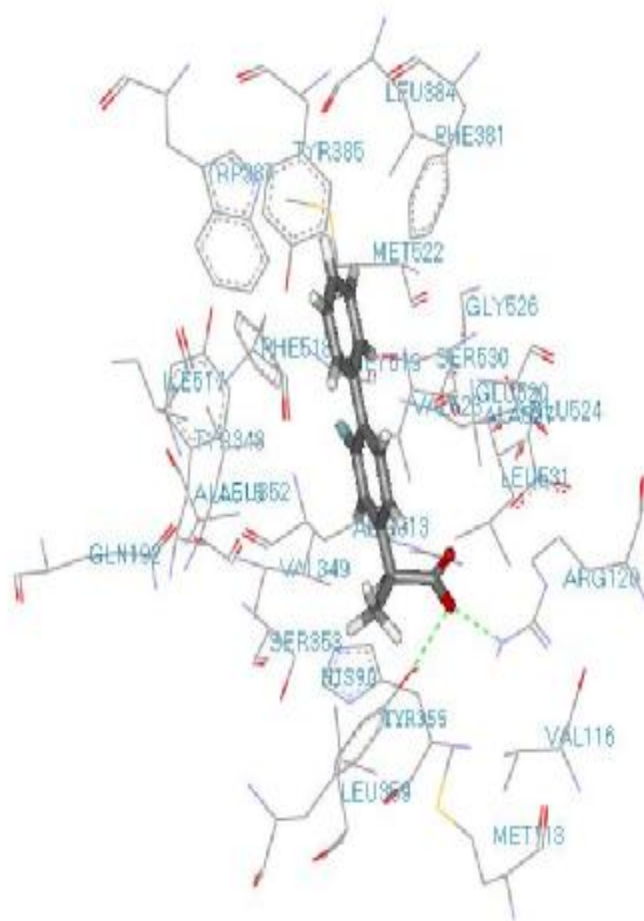


Figure 33. Mode d'interaction du Flurbiprofen avec le site actif de COX-2

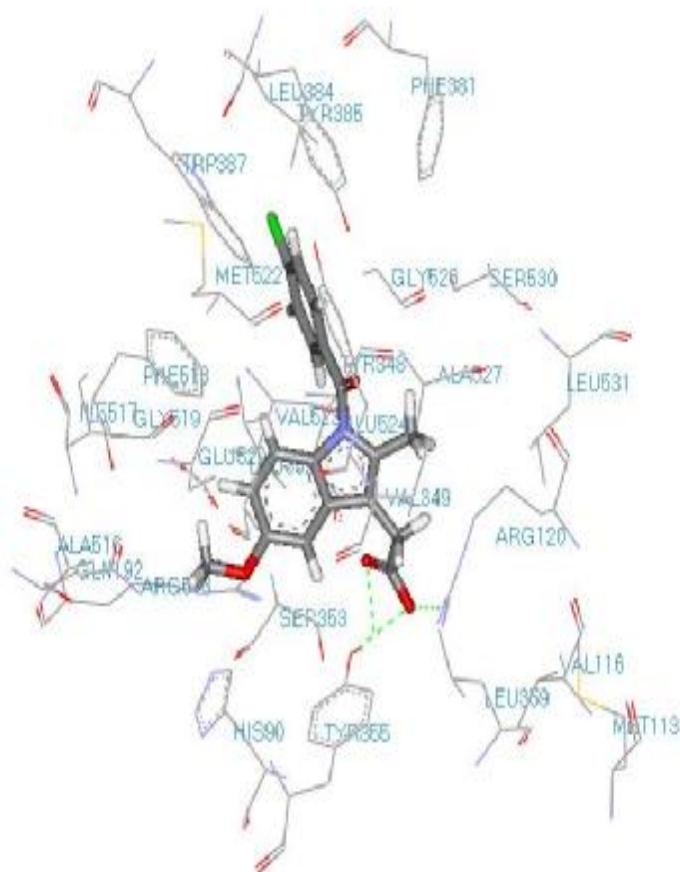
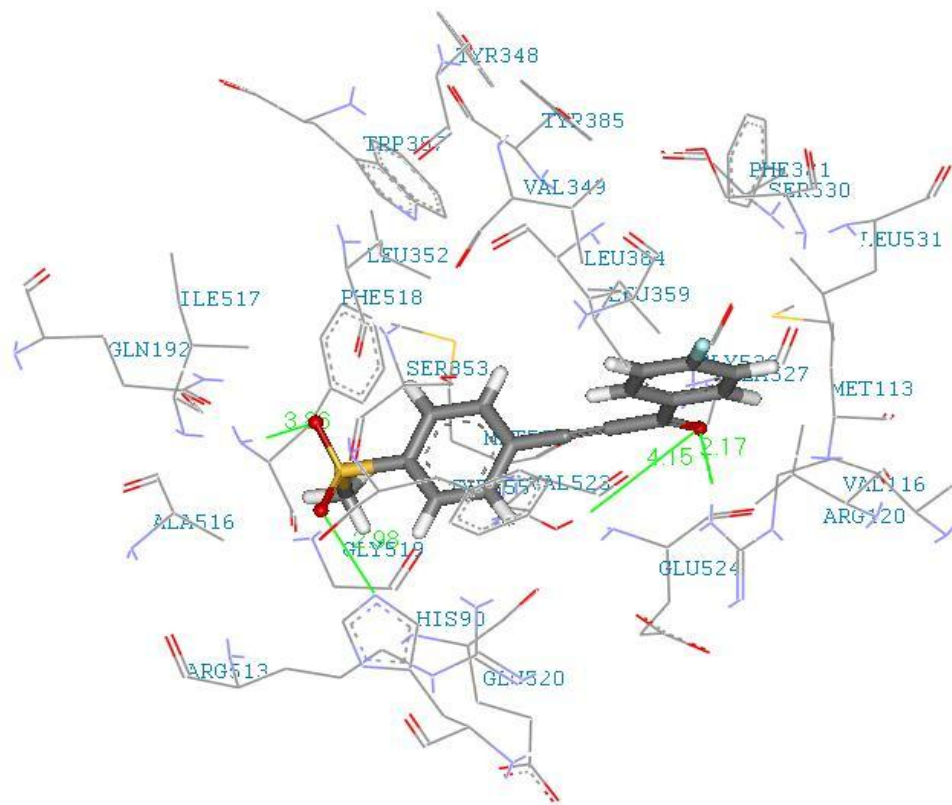


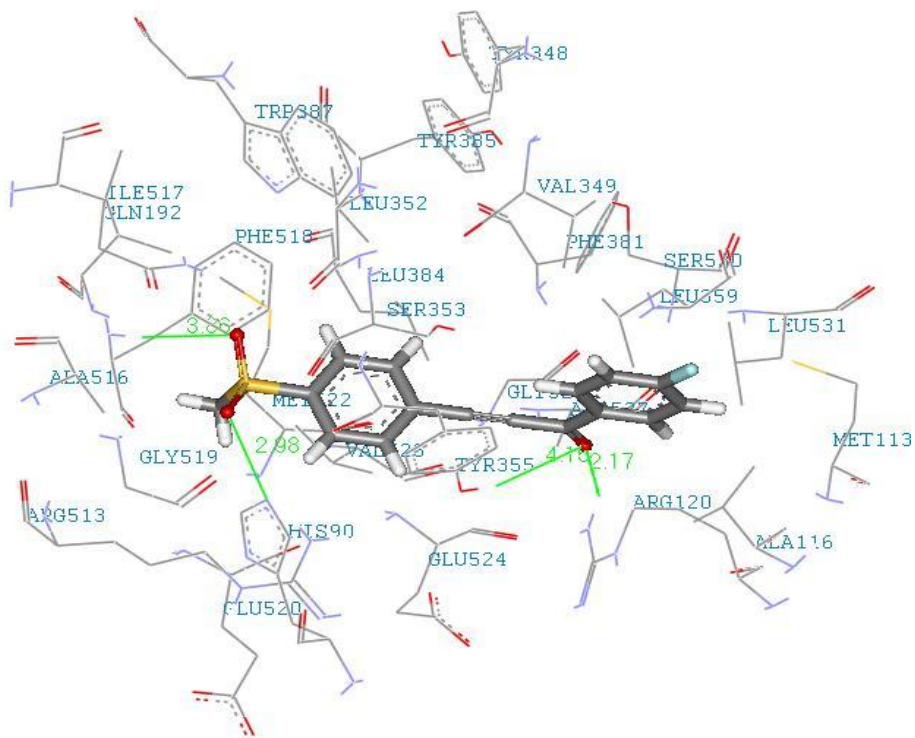
Figure 34. Mode d'interaction de l'Indométhacine avec le site actif de COX-2

4.2- interaction des ligands de synthèse

Les résultats du tableau 21 montrent que le composé j avec un IC_{50} de 0.1 μ M et une énergie d'interaction de -28.54 KJ/mol constitue l'inhibiteur le plus sélectif et le plus puissant de l'enzyme COX-2. Le mode d'interaction de ce composé avec le site de liaison de l'enzyme a été étudié par docking moléculaire avec Autodock (Fig.35). La substitution C-3 p-MeSO₂ phenyl est situé au voisinage des résidus Phe518, Arg513, Gln192, His90, Ser353 et Val523. L'un des atomes d'oxygène du groupement MeSO₂ établit un pont hydrogène avec le NH latéral de Phe518 (distance = 3.86 Å) tandis que l'autre atome d'oxygène forme un pont hydrogène avec l'un des azotes du cycle de His90 (d = 2.98 Å).



(a)



(b)

Figure 35. Docking du composé j dans le site de liaison de COX-2.

Le groupement méthyl établit des contacts de Van Der Walls avec le noyau aromatique dePhe518 ($d < 4 \text{ \AA}$). L'oxygène de la fonction cétone portée par le groupement prop-2-yne-1-one est lié par un pont hydrogène au résidu Tyr355 ($\text{C=O}\dots\text{H-O-Tyr355}$; $d = 4.15 \text{ \AA}$) et se trouve à une distance favorable pour une interaction avec le groupement NH_2 de la chaîne latérale de Arg120 ($d = 2.17 \text{ \AA}$). Le substituant C-1 p-fluorophenyl est orienté vers la région comprenant les résidus Ser530, Leu531, Leu359, Val349, and Ile345 et Tyr355. Des contacts de Van Der Walls sont formés entre l'atome de fluor et les groupements méthyles de Leu359 ($d < 3.5 \text{ \AA}$).

4.3- proposition de la lutéoline comme nouveau ligand

L'absence de données biologiques relatives aux interactions des substances naturelles avec la COX-2 nous a conduit à faire une simulation de leur interaction en vue de dégager celles susceptibles de présenter une activité biologique vis-à-vis de cette enzyme. La modélisation de leur énergie d'interaction avec l'enzyme COX-2 a été réalisé avec Autodock, FlexX et X-score (Tab. 25)

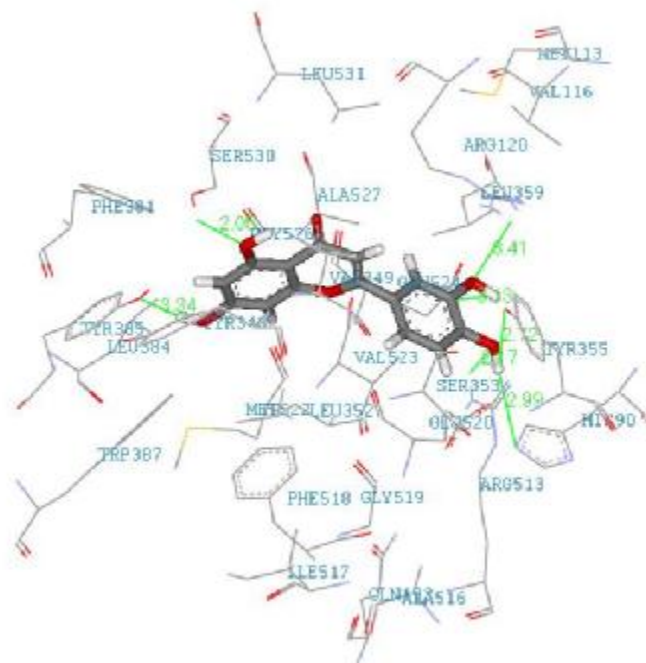
Tableau 25: Valeurs des énergies de liaison des complexes formés entre COX-2 et les composés naturels

Energie d'interaction (Kj/mol)	Autodock	FlexX	X-score
Composé			
Lutéoline	-31.58	-28.38	-42.90
Baicaléine	-21.87	-18.58	-32.51
Fiséatine	-22.00	-17.10	-30.47
ANDG	-7.90	-11.00	-20.36
Jaspaquinol	-27.86	-24.66	-38.23

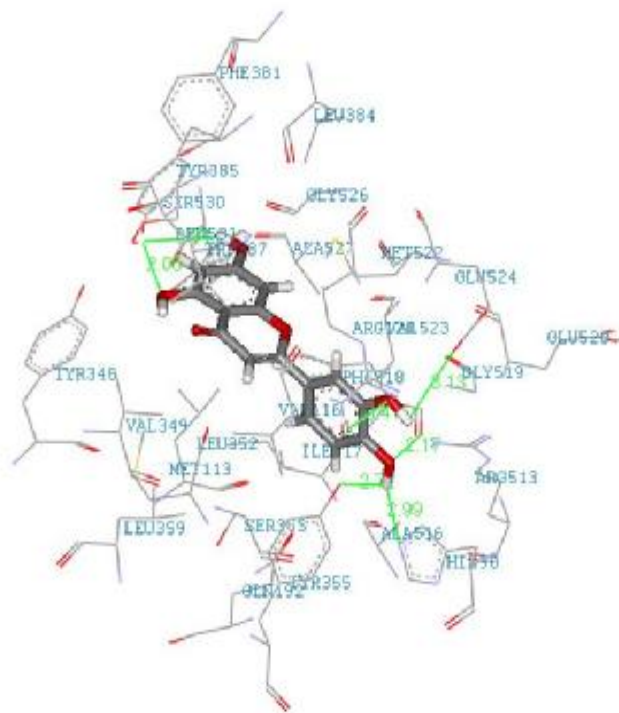
Les trois programmes attribuent le meilleur score d'énergie à la lutéoline. L'analyse visuelle de son interaction montre sept ponts hydrogènes répartis entre les noyaux A et B (Fig.36). L'hydroxyle en position 5 sur le noyau A établit un pont hydrogène avec l'hydroxyle de Ser530 ($5\text{-H-O}\dots\text{H-O-Ser530}$; $d = 2.05 \text{ \AA}$). Un autre pont hydrogène d'une distance de 3.34 \AA est formé entre l'hydroxyle en 7 et le résidu Tyr385 ($7\text{-O-H}\dots\text{O-H-Tyr385}$). Le noyau B est engagé dans plusieurs ponts hydrogènes via ses deux hydroxyles phénoliques en 3', 4'. L'hydroxyle en 3' forme un pont hydrogène avec l'un des atomes d'oxygènes du carboxylate latéral de Glu524 ($3\text{-O-H}\dots\text{O-C-Glu524}$; $d = 3.13 \text{ \AA}$) et un autre pont hydrogène avec le groupement NH_2 latéral de Arg120 ($3'\text{-H-O}\dots\text{H-N-Arg120}$; $d = 3.41 \text{ \AA}$). Par contre l'hydroxyle en 4' établit trois ponts hydrogènes dont l'un avec l'azote du cycle de His90 ($\text{O-H}\dots\text{NE}_2\text{-His90}$), un autre avec l'hydroxyle de Tyr355 ($4'\text{-O-H}\dots\text{O-H}$

Tyr355) et un troisième avec la fonction amine latérale de Arg513 (4'-H-O....HN-Arg513). Les distances d'interaction sont respectivement de 2.99 Å, 2.72 Å et 2.17 Å.

Enfin, des interactions hydrophobiques stabilisent les noyaux A, B et C de la lutéoline avec les résidus Gly526, Leu352, Trp387, Phe381, Val523, Val349 et Ala527.



(a)



(b)

Figure 36. Interactions moléculaires entre la lutéoline et la COX-2 (a et b)

5- LE FILTRAGE ADME/Tox

L'activité biologique de la lutéoline et des composé 4 et 9 étant hypothétique, il est important de compléter leur étude par l'application de la méthode de filtre ADME/Tox [188]. Cette méthode est basée essentiellement sur la règle de 5 de Lipinski (189). (Tab.26). Elle permet de nous renseigner sur les propriétés pharmacocinétiques liées à leur absorption, digestion, métabolisme et excrétion.

Tableau 26 : propriétés moléculaires de la lutéoline et des composés 4,9

Descripteur <u>Ligand</u>	PM	DH	AH	LF	LogP
Composé 4	125.1	3	3	0	0.820000
Composé 9	170.1	4	5	1	0.620000
lut	286.2	4	6	1	2.800000

PM = Poids Moléculaire

DH = Donneur d'Hydrogène (OH et NH)

AH = Accepteur d'Hydrogène (O et N)

LF = Liaison Flexible

LogP = coefficient de partition Eau/Ethanol

Les résultats du tableau montrent que les trois molécules étudiées s'inscrivent parfaitement dans la marges des critères imposées par la règle de Lipinski. Selon l'auteur, la plupart des drogues médicales sont de petite taille et sont lipophiles (LogP positif). Le coefficient de partage lipides/eau constitue une propriété physico-chimique déterminante de l'action biologique. En effet, une molécule doit, pour parvenir dans l'organisme jusqu'à son lieu d'action, se dissoudre dans des phases aqueuses, traverser des membranes lipidiques, des phases protéiques et osidiques.

La solubilité dans l'eau et dans les lipides ainsi que le coefficient de partage jouent dans ce transport, un rôle fondamental. Une molécule dotée d'une action plus rapide doit avoir un coefficient de partage qui favorise le plus son transport.

Avec de faibles poids moléculaire et des valeurs positives du LogP, les trois composés constituent des représentants intéressants du point de vue activité biologique. Ils peuvent contribuer au développement de composés avec une meilleure affinité vis à vis des enzymes étudiées : la 15-lipoxygénase et la cyclooxygénase-2.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le présent travail avait pour but d'évaluer les programmes permettant de modéliser et de mieux appréhender les interactions entre enzymes et inhibiteurs.

Dans ce contexte, nous avons tenté une simulation des interactions de plusieurs molécules naturelles et de synthèse avec deux cibles enzymatiques fortement impliquées dans divers troubles, inflammatoires, cardiovasculaires et cancéreux : la 15-lipoxygénase et la cyclooxygénase-2.

Pour cela nous avons fait appel à deux méthodes complémentaires : l'arrimage moléculaire ou docking et les fonctions de score. Ces dernières étant directement implémentées dans les programmes de docking disponibles que nous avons choisi d'étudier: FlexX et Autodock. Ces programmes sont parmi les plus utilisés en modélisation moléculaire. Ils ont été développés pour aider à la mise au point de molécules à activité thérapeutique. Il s'agit de calculs entre des molécules comportant un faible nombre d'atomes et des récepteurs principalement protéiques. Critères correspondant parfaitement aux molécules choisies dans notre étude.

Dans un premier temps, les logiciels FlexX et Autodock ont testés d'une part au moyen du coefficient de corrélation entre les valeurs des IC_{50} des molécules étudiées et de leur énergie de liaison avec les deux enzymes et d'autre part en comparant la déviation par le RMSD entre la structure simulée et celle obtenue par cristallographie. Avec des valeurs du coefficient de corrélation inférieures à 1 et du RMSD inférieures à 2 Å, les performances des approches incrémentale (FlexX) et par algorithme génétique (Autodock) sont nettement avérées et s'adaptent parfaitement aux différentes structures moléculaires retenues dans cette étude.

Dans un deuxième temps, la modélisation moléculaire par ces deux méthodes nous a permis de déterminer, parmi les molécules naturelles et de synthèse, celles donnant le meilleur effet inhibiteur. Les scores d'énergie obtenus par docking moléculaire, en confrontation avec les valeurs des IC_{50} donnés par la littérature lors de tests in vitro, montrent qu'il s'agit respectivement de la lutéoline et du composé I dans le cas de la 15-lipoxygénase et du composé j dans le cas de la cyclooxygénase-2. Les valeurs de leur énergie d'interaction sont respectivement de -27.50 Kj/mol, -28.70 Kj/mol et de -28.54 Kj/mol. L'absence d' IC_{50} se rapportant à l'activité biologique des molécules naturelles avec la COX-2 n'a pas permis d'obtenir de résultats à cette étape de l'étude. La simulation de leur énergie d'interaction a été réalisée ultérieurement.

Dans un troisième temps, l'approche par FlexX et Autodock a été utilisée dans le but de proposer de nouvelles structures pouvant présenter une activité biologique vis-à-vis de la cyclooxygénase d'une part et de la lipoxygénase d'autre part. La dualité des composés de synthèse de la classe des 1,3 diphényl propyne-2-one d'une part et l'absence de données sur les IC_{50} des composés naturels d'autre part, nous ont conduit à faire un docking moléculaire entre ces derniers et la COX-2. La lutéoline ayant obtenue la meilleure énergie de liaison avec trois programmes différents : FlexX, Autodock et X-score, semble être le meilleur représentant de la classe naturelle.

Dans le cas de la lipoxigénase (3-LOX), la structure d'une molécule nouvelle (composé 4) avec une meilleure activité inhibitrice est obtenue suite à une modification de l'acide 3,4 dihydroxybenzoïque, ligand de départ de l'enzyme 3-LOX. Le changement de la fonction carboxylique par un groupement alcool améliore nettement l'énergie d'interaction avec les trois programmes FlexX, Autodock et X-score. Si l'on se réfère uniquement à FlexX, cette énergie passe de -10.564 Kj/mole à -21.127 Kj/mole. Par ailleurs, FlexX et X-score attribuent un score d'énergie en faveur du composé 9 qu'on retrouve en deuxième position. Avec FlexX, l'énergie diminue jusqu'à -17.00 Kj/mole.

Les potentialités biologiques de ces trois molécules sont enfin vérifiées par leurs propriétés pharmacocinétiques. En se référant à leurs faibles poids moléculaires et leurs coefficients de partage octanol/eau positifs, les trois structures se présentent comme des inhibiteurs potentiels des enzymes considérées.

Il conviendrait dans le prolongement de ces résultats, de tester l'activité biologique des structures nouvellement proposées, en faisant appel à d'autres programmes de docking et d'autres fonctions de score; notre étude ici n'étant qu'initiale. Une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* devra permettre de vérifier ensuite les résultats théoriques obtenus *in silico*

De tels tests auront pour but de proposer de nouveaux inhibiteurs de la 15-lipoxigénase et la cyclooxygénase-2, à la chimie de synthèse qui pourra poursuivre ce travail dans une voie plus appliquée et industrielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Heim, K.E. ; Tagliaferro, A.R. ; Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxydants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13(10), 572-584.
- [2] Wodak S.J., Janin J. 1978. Computer analysis of protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 124, 323-342.
- [3] Salemme F.R. 1976. An hypothetical structure for an intermolecular electron transfer complex of cytochromes c and b5. *J. Mol. Biol.* 102, 563-568.
- [4] Delattre J., Beaudoux J.L., Bonnefort-Rousselot D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques. *Tec & Doc Lavoisier*. Paris-New York .
- [5] Stryer L. 1992. Biochemistry. Flammarion: Paris.
- [6] Sybyl. 1988. Tripos associate, assign St Louis, Mo, USA, 189-213.
- 85- Vieth M., Hirst J.D., Kolinski A., Brooks C.L. 1998. Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* 19, 1612-1622.
- [7] Szent-Gyorgyi , A, 1965. Oxydation, Energy Transfer, and Vitamine. In *Nobel Lectures , Physiology or Medicine 1922-1941*, Elsevier Publishing Compagny: Amsterdam..
- [8] Rusznyak, I.; Szent-Gyorgyi, A. 1936. Vitamin P: flavanols as Vitamins. *Nature.*, 1936(138), 27.
- [9] Hahlbrock , K, 1981. Flavonoid. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise: Secondary Plant Products Vol 7* , E.E. Academic Press: New York.
- [10] Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, 126 (2), 485-493.
- [11] Winkel-Shirley, B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects stress. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5 (3), 218-223.
- [12] Peterson, J.; Dwyer, J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res.*, 18 (12), 1995-2018.
- [13] Di Carlo ,G. ; Mascolo , N.; Izzo, A.A., Cappaso, F. 1999. Flavonoids : old and new aspects of a class of Natural therapeutic drugs . *Life Sci.* , 65(4), 337-353.
- [14] Manach, C. ; Scalbert, A.; Morand, C; Remy C.; Jimenez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability . *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(5), 727-747.
- [15] Markham, K.R. 1982. Techniques of flavonoids identification . New York : Academic Press: London,.

- [16] Harborne, J.B.; Williams, C.A.; 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504 .
- [17] Markham, K.R.; Bloor, S.J.; 1998. Analysis and identification of Flavonoids in Practice . In *Flavonoids , in health and disease* , Rice-Evance , C.A, Packer, L, Eds . Marcel Dekker: New York; pp 1- 34.
- [18] Scalbert , A ; Williamson , G; 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols . *J. Nutr .*,130(8S Suppl), 2073S-2085S.
- [19] Aherne , S.A.; O'Brien , N.M.. 2002. Dietary flavonols : chemistry , food content , and métabolisme. *Nutrition .*,18(1),75-81 .
- [20] Formica , J.V, Regelson , W, 1995. Review of the biology of quercetin and related , bioflavonoids , *Food Chem . Toxicol .*, 33(12), 1061-1080 .
- [21] Hertog, M.G.L . Hollman, P.C.H; Katan ,M.B; Kromhout , D. 1993. Estimation of daily intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the netherlands . *Nutr. Cancer .*,20,21-29.
- [22] Hertog , M.G.L, Kromhout, D.; Aravis, C.; Blackburn, H., Buzina , R.B, Fidanza , F.; Giampaoli, S.; Jansen , A.; Menotti ,A.; Nedeljkovic , S, ; Pekkarinen, M.; Simic ,B.S, Toshima,H, Feskens , J.M, Hollman , P.C.H.; Katan ; M.B. 1995. Flavonoids , intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch. Int. Med.*, 155, 381-386 .
- [23] Criqui M.H.; Ringel, B.L, 1994. Does diet or alcohol explain the French paradox? *Lancet.*, 344, 1719-1723.
- [24] Richard, J.L. 1987. Coronary risk factors. The french paradox . *Arch. Maladies Coeur Vaisseaux.*, 80, 17-21.
- [25] Renaud, S. ; de Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.*, 339(8808), 1523-1526.
- [26] Delattre, J.; Beaudoux , J-L. ; Bonnefort-Rousselot,. D. 2005. Radicaux libres et stress oxydant. Aspect biologiques et pathologiques. Tec & Doc Lavoisier : Londres-Paris – New York ,
- [27] Nijveldt, R.J.. Van Nood, E.; Van Hoorn, D.E.C.; Boelens, P.G.; Van Norren, K.; Van Leeuwen, P.A.M. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J.Clin.Nutr.*, 74(4), 418-425.
- [28] Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J.Nat. Prod.*, 63(7), 1035-1042.
- [29] Metodiewa, D.; Jaiswal, A.K.; Cenas, N.; Dickanaitė.E.; Segura-Aguilar, J. 1999. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radical Biol. Med.*, 26(1-2), 107-116.

- [30] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Vervoort, J.; Rietens, I.M.C.M. 2000. Peroxidase-Catalyzed Formation of Quercetin Quinone Methide-Glutathione Adducts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 378(2), 224-233.
- [31] Yamashita, N.; Tanemura, H.; Kawanishi, S. 1999. Mechanisms of oxidative DNA damage induced by quercetin in the presence of Cu (II). *Mutat. Res.* 425(1), 107-115.
- [32] van der Woude, H.; ALINK? G.M.; Van Rossum, B.E.J.; Walle.K.; Van Steeg, H.; Walle, T.; Rietjens, I.M.C.M. 2005. Formation of Transient Covalent Protein and DNA Adducts by Quercetin in Cells with and without Oxidative Enzyme Activity. *Chem. Res. Toxicol.*, 18(12), 1907-1916.
- [33] Oikawa, S.; Hirose, I.; Hirakawa, K.; Kawanishi, S. 2001. Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. *Carcinogenesis.*, 22(8), 1239-1245.
- [34] Galati, G.; Moridani, M.Y.; Chan, T.S.; O'Brien, P.J. 2001. Peroxidative metabolism of apigenin and naringenin versus luteolin and quercetin: glutathione oxidation and conjugation. *Free Radical Biol. Med.*, 30(4), 370-382.
- [35] Erben-Russ, M.; Bors, W.; Saran, M. 1987. Reactions of linoleic acid peroxy radicals with phenolic antioxidants: a pulse radiolysis study. *Int. J. Radiat. Biol.*, 52, 393-412.
- [36] Bors, W.; Michel, C., Saran, M. 1994. Flavonoids antioxidant : rate constants for reactions with oxygenradicals. *Methods Enzymol.* 234, 420-429.
- [37] Bors, W.; Heller, W. ; Michel, C., Saran, M. 1990. Flavonoids as antioxidant: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343-355.
- [38] Rajendran, M. ; Manisankar, P. ; Gandhidasan, R. ; Murugesan, R. 2004. Free Radicals Scavenging Efficiency of a Few Naturally Occuring Flavonoids : a Comparative Study. *J. Agric Food Chem.*, 52(24), 7389-7394.
- [39] Nagai, S.; Ohara, K.; Mukai, K. 2005. Kinetic Study of the Quenching Reaction of Singlet Oxygen by Flavonoids in Ethanol Solution. *J. Phys. Chem. B.*, 109(9), 4234-4240.
- [40] Krichnamachari, V.; Levine , Pare, P.W. . 2002. Flavonoid Oxidation by the Radical Generator AIBN: A Unified Mechanism for Quercetin Radical Scavenging . *J. Agric . Food Chem*, 50(15), 4357-4367.
- [41] McPhail, D.B.; Hartley , R.C.; Gardner , P.T.; G.G. 2003. Kinetic and Stoichiometric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. *J.Agric. Food Chem.*, 51(6), 1684-1690.
- [42] Jovanovic, S.V.; Steenken, S.; Tomic, Marjanovic, B.; Simic, M.G. 1994. Flavonoids as antioxidants. *J.Am.Chem.Soc.*, 113, 4846-4851.

- [43] Saran, M.; Vetter, G.; Erben-Russ, M.; Winter, R.; Kruse, A.; Michel C.; Bors, W. 1987. Pulse radiolysis equipment: a setup for simultaneous multiwavelength Kinetic spectroscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 58, 363-368.
- [44] Chen, Y.T.; Zheng, R.L.; Jia, Z.J.; Ju, Y. 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biol. Med.*, 9(1), 19-21.
- [45] Roback, J.; Gryglewski, R.J. 1988. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.*, 17(5), 837-841.
- [46] Sichel, G.; Corsaro, C.; Scalia, M.; Di Billio A.J. ; Bonomo, R.P. 1991. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O₂(.). *Free Radical Biol. Med.*, 11(1), 1-8.
- [47] Bors, W.; Saran, M. 1987. Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Res. Commun.*, 2(4-6), 289-294.
- [48] Miller, N.J.; Rice-Evans, C. 1997. Factor influencing the antioxidant activity determined by the ABTS⁺ radical cation assay . *Free Radical Biol. Med.*, 195-199.
- [49] Miller, N.J.; Rice-Evans, C.A. 1996. Spectrophotometric determinations of antioxidant activity. *Redox Rep.*, 2, 161-171.
- [50] Miller, N.J.; Sampson, J.; Candeias, L.P.; Bramley.; P.M; Rice-Evans, C.A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Lett.*, 384(3), 240-242.
- [51] Miller, N.J.; Castelluccio, C.; Tijburg, L.; Rice-Evans, C. 1996. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelator? *FEBS Lett.*, 392(1), 40-44.
- [52] Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, 84(4), 407-412.
- [53] Atsumi, T.; Iwakura, I.; Kachiwagi, Y.; Fujisawa, S.; Uecha, T. 1999. Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. *Antioxid. Redox Signal.*, 1(4), 537-546.
- [54] Rankin, S.M.; Hoult, J.R.S.; Leake, D.S. 1998. Effects of flavonoids on de oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Br. J. Pharmacol.* 95, 727P.
- [55] DE Whaley, C.V.; Rankin, S.M.; Hoult, J.R.; Jessup, W.. Leake, D.S. 1990. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, 39(11), 1734-1750.
- [56] Stryer, L. 1992. *Biochemistry*. Flammarion: Paris,

- [57] Leake, D.S. 1998. Isoflavonoids as inhibitors of lipid peroxidation and quenchers of singlet oxygen . *In Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C.A.; Packer, L.; Eds. Marcel Dekker: New York,; pp 295-302.
- [58] Terao, J.; Piskula, M.K. 1998. Flavonoids as inhibitors of lipid peroxidation in membranes. *In Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C.A.; PackerL., Marcel Dekker: New York,; pp 277-294.
- [59] Leake, D.S. 1998. Effects of flavonoids on the oxidation of low-density lipoproteins. *In Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C.A.; Packer, L., Eds. Marcel Dekker: New York,; pp 253-276.
- [60] Jessup, W.; Rankin, S.M.; De Whalley, C.V.; Houtt, J.R.; Scott, J.; Leake, D.S. 1990. Alpha-tocopherol consumption during low-density-lipoprotein oxidation. *Biochem. J.*, 265(2), 399-405.
- [61] Wickramasinghe, S.N.; Hassan, R.; Khalpey, Z. 1996. Differences in the serum levels of acetaldehyde and cytotoxic acetaldehyde-albumin complexes after the consumption of red and white wine: in vitro effects of flavonoids, vitamin E, and other dietary antioxidants on cytotoxic complexes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 20(5), 799-803.
- [62] Negre-Salvayre, A.; Mabile, L.; Delchambre, J.; Salvayre, R. 1995. alpha-Tocopherol, ascorbic acid, and rutin inhibit synergistically the copper-promoted LDL oxidation and the citotoxicity of oxidized LDL to cultured endothelial cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 47(1-3), 81-91.
- [63] Chi, Y.S.; Jong, H.G.; Chang, H.W.; Kang, S.S.; Kim, H.P. 2001. Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochem. Pharmacol.*, 62(9), 1185-1191.
- [64] Pinto, M.d.C.; Macias, P. 2005. Oxidation of dietary polyphenolics by hydroperoxidase activity of lipoxygenase. *J.Agric. Food Chem.*, 53(23), 9225-9230.
- [65] Da Silva, E.L.; Tsushida, T.; Terao, J. 1998. Inhibition of mammalian 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation in low-density lipoprotein by quercetin and quercetin monoglucosides. *Arch. Biochem. Biophys.*, 349(2), 313-320.
- [66] Perusse, P.; Leech, D.A 2003. voltammetric assay of antioxidants and inhibitors of soybean lipoxygenase. *Electroanalysis* , 15(5-6), 573-578.
- [67] Borbulevych, O.Y.; Jankun, J.; Selman, S.H.; Skrzypczak-Jankun, E. 2004. Lipoxygenase interactions with natural flavonoids, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 Å resolution. *Proteins.*, 54(1), 13-19.
- [68] Skrzypczak-Jankun, E.; Zhou, K.; J. 2003. Inhibitors of lipoxygenase by (-)-epigallocatechin gallate: X-ray analysis at 2.1 Å reveals degradation of EGCG and shows soybean LOX-3 complex with EGC instead. *Int. J. Med.*, 12, 415-422.

- [69] Ferrali, M.; Signorini, C.; Caciotti, B.; Sugherini, L.; Giachetti, D. 1997. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoids quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.*, 416(2), 123-129.
- [70] Bravo, A.; Anaconda, J.R. 2001. Metal complexes of the flavonoid quercetin: antibacterial properties. *Transition Met. Chem.*, 26(1-2), 20-23.
- [71] Zhou, J.; Wang, L.; Wang, J.; Tang, N. 2001. Antioxidative and antitumor activities of solid quercetin metal(II) complexes. *Transition Met. Chem.*, 26(1-2), 57-63.
- [72] Zhou, J.; Wang, L-F; Wang, J-Y.; Tang, N. 2001. Synthesis, characterisation, antioxidative and antitumor activities of solid quercetin rare earth(III) complexes. *J. Inorg. Biochem.*, 83(1), 41-48.
- [73] Van Acker, S.A.B.E.; Van Balen, G.P.; Van Den Berg, D-J.; Bast, A.; Van Der Vijgh, W.J.F. 1998. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol.*, 56(8), 935-943.
- [74] Moridani, M.Y.; Pourahmad, J.; Bui, H.; Siraki, A.; O'Brien, P.J. 2003. Dietary flavonoid iron complexes as cytoprotective superoxide radical scavengers. *Free Radical Biol. Med.*, 34(2), 243-253.
- [75] Engelmann, M.D.; Hutcheson, R.; Cheng, I.F. 2005. Stability of ferric complexes with 3-Hydroxyflavon (Flavonol), 5,7-Dihydroxyflavone (Chrysin), and 3',4'-Dihydroxyflavone. *J. Agric. Food Chem.*, 53(8), 2953-2960.
- [76] de Souza, R.F.; De Giovani, W.F. 2004. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.*, 9(2), 97-104.
- [77] Afanas'eva, I.B.; Ostrakhovitch, E.A.; Mikhal'chik, E.V.; Ibragimova, G.A.; Korkina, L.G. 2001. Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoids rutin by complexation with transition metals. *Biochem. Pharmacol.*, 61(6), 677-684.
- [78] Bodini, M.E.; Copica, G.; Tapia, R.; Leighton, F.; Herrera, L. 1999. Iron complexes of quercetin in aprotic medium. Redox chemistry and interaction with superoxide anion radical. *Polyhedron*, 18(17), 2233-2239.
- [79] Galati, G.; Chan, T.; Wu, B.; O'Brien, P.J. 1999. Glutathione-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species by the Peroxidase-Catalyzed Redox Cycling of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 12(6), 521-525.
- [80] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. 2001. Structure-Activity Study on the Quinone/Quinone Methide Chemistry of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 14(4), 398-408.
- [81] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; Van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. 2002. The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with

Flavonoid Quinone/Quinone Methides Is pH-Dependent. *Chem. Res. Toxicol.*, 15(3), 343-351.

[82] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; van der Woude, H.; van Zanden, J.; van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. 2002. Identification of o-quinone/quinone methide metabolites of quercetin in a cellular in vitro system. *FEBS Lett.*, 520(1-3), 30-34.

[83] Awad, H.M.; Boersma, M.G.; Boeren, S.; Van Bladeren, P.J.; Vervoort, J.; Rietjens, I.M.C.M. 2003. Quenching of Quercetin Quinone/Quinone Methides by Different Thiolate Scavengers: Stability and Reversibility of Conjugate Formation. *Chem. Res. Toxicol.*, 16(7), 822-831.

[84] Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.*, 96(2-3), 67-202.

[85] Middleton, E.; Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. . 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52(4), 673-751.

[86] McCord, J.M.; Fridovich, I. 1968. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 243,(21), 5753-5760.

[87] da Silva, S.L.; da Silva A.; Honorio, K.m.. Marangoni, S.; Toyama, M.H. ; da Silva, A.B.F. 2004. The influence of electronic, steric and hydrophobic properties of flavonoid compounds in the inhibition of the xanthine oxidase. *J. Mol. Structure(Theochem)*., 684(1-3), 1-7.

[88] Lin, C.-M.; Chen, C.-S.; Chen, C.-T.; Liang, Y.-C. ; Lin, J-K. 2002. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294(1), 167-172.

[89] Harris, S.R.; Thorgeirsson, U.P. 1997. Flavon acetic acid stimulates nitric oxide and peroxynitrite production in subcutaneous mouse tumors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235(3), 509-514.

[90] Chiesi, M.; Schwaller, R. 1995. Inhibition of constitutive endothelial NO-synthase activity by tannin and quercetin. *Biochem. Pharmacol.*, 49, 495-501.

[91] Man-Ying Chan, M.; Mattiacci, J.A.; Hwang, H.S.; Shah, A.; Fong, D. 2000. Synergy between ethanol and the grape polyphenols quercetin and resveratrol in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 60(10), 1539-1548.

[92] Chen, Y-C.; Shen, S-C.; Lee, W-R.; Hou, W-C.; Yang, L.-L.; T.J.F. 2001. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell. Biochem.*, 82, (4), 537-548.

- [93] Sadik, C.D.; Sies, H.; Schewe, T. 2003. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem. Pharmacol.*, 65(5), 773-781.
- [94] Miura, T.; Muraoka, S.; Fujimoto, Y. 2003. Inactivation of creatine kinase induced by quercetin with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide pro-oxidative and anti-oxidative actions of quercetin. *Food Chem. Toxicol.*, 41(6), 759-765.
- [95] Fussetti, F.; Schroter, K.H; Steiner, R.A.; van Noort, P.I.; Pijning, T.; Rozeboom, H.J.; Kalk, K.H.; Egmond, M.R.; Dijkstra, B.W. 2002. Crystal structure of the copper-containing quercetin 2,3- dioxygenase from *Aspergillus japonicus*. *Structure.*, 10(2), 259-268.
- [96] El Amrani, F.B; Perello, L.; Real, J.A.; Gonzalez-Alvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Garcia-Granda, S.; Montejo-Bernardo, J. 2006. Oxidative DNA cleavage induced by an iron (III) flavonoid complex: Synthesis, crystal structure and characterization of chlorobis (flavonolato)(methanol) iron(III) complex: *J. Inorg. Biochem.*, 100, 1208-1218.
- [97] Jovanovic, S.V.; Steeken, S.; Simic, M.G.; Hara, Y.; 1998. Antioxydant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radical. *In Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans, C.A.; Packer, L.; Eds. Marcel Dekker: New York; pp 137-162.
- [98] Jovanovic, S.V.; Steeken, S.; Hara, Y.; Simic, M.G. 1996. Reduction potentials of flavonoid phenoxyl radicals. Which ring is responsible for antioxidant activity. *J. Chem. Soc. Perkin Tans. II.* 2497.
- [99] Agrawal, P.K.; Schneider, H.J. 1983. Deprotonation induced ¹³C NMR shifts in phenols and flavonoids. *Tetrahedron Lett.*, 24, 177-180.
- [100] Brett, A.M.O.; Ghica, M.-e. 2003. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis.*, 15(22), 1745-1750.
- [101] Mukherjee, S.; Mukherjee, A.; Saha, A. 2005. QSAR modelling on binding affinity of diverse estrogenic flavonoids: electronic, topological and spatial functions in quantitative approximation. *J. Mol. Structure (Theochem).*, 715(1-3), 85-90.
- [102] Alves, C.N. ; Pinheiro, J.C.; Camargo, A.J.; de Souza, A.J.; Carvalho, R.B.; de Silva, A.B.F. 1999. A quantum chemical and statistical study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *J. Mol. Structure (Theochem).*, 491, 123-131.
- [103] Alves, C.N.; Pinheiro, J.C.; Camargo, A.J.; Ferreira, M.M.C.; Romero, R.A.F.; da Silva, A.B.F. 2001. A multiple linear regression and partial least squares study of flavonoid compounds with anti-HIV activity. *J. Mol. Structure (Theochem).*, 541, 81-88.
- [104] Weber, K.C.; Honorio, K.M.; da Silva, S.L.; Mercadante, R.; da Silva, A.B.F.S 2005. Selection of quantum chemical descriptors by chemometric methods in the

study of antioxidant activity of flavonoid compounds. *Int J. Quantum Chem.*, 103(5), 731-737.

[105] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13(10), 572-584.

[106] van Acker, S.A.B.E.; de Groot, M.J.; van den Berg, D.-J.; Tromp, M.N.J.L.; Donne-Op den Kelder, G.; van der Vijgh, W.J.F.; Bast, A. 1996. A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 9(8), 1305-1312.

[107] O'Malley, P.J. 2001. Electronic structure studies of quinines and semiquinones: accurate calculation of spin densities and electron paramagnetic resonance parameters. *Antioxid. Redox Signal.*, 3(5), 825-838.

[108] Trouillas, P.; Fagnere, C.; Lazzaroni, R. ; Calliste, C. ; Marfak, A. ; Duroux, J-L. 2004. A theoretical study of the conformational behavior and electronic structure of taxifolin correlated with the free radical-scavenging activity. *Food. Chem.*, 88(4), 571-582.

[109] Erckoc, S.; Eeckoc, F.; N. 2003. Theoretical investigation of quercetin an its radical isomers. *J. Mol. Structure (Theochem)*., 631, 141-146.

[110] Leopoldini, M.; Marino, T.; Russo, N.; Toscano, M. 2004. Density functional computation of the energetic and spectroscopic parameters of quercetin and its radicals in the gas phase and in solvent. *Theor. Chem. Acc.*, 111(2-6), 210-216.

[111] Meyer, M.; 2000. Ab initio study of flavonoids. *Int. J. Quantum Chem.*, 76(6), 724-732.

[112] Vasilescu, D.; Girma, R. 2002. Quantum molecular modeling of quercetin-simulation of the interaction with the free radical t-BuOO. *Int. J. Qunatum Chem.*, 90(2), 888-902.

[113] Lau, K.S.; Mantas, A. ; Chass, G.A. ; Ferretti, F.H. ; Estrada, Zamabide, G. ; Csizmadia, I.G. 2002. Ab initio and DFT conformational analysis of selected flavones : 5,7-dihydroxyflavone (chrysin) and 7,8-dihydroxyflavone. *Can. J. Chem.*, 80(7), 845-855.

[114] Zhang, H.-Y.; Sun, Y-M. ; Wang, X.-L. 2003. Substituent effects on O-H bond dissociation enthalpies and ionization potentials of catechols: a DFT study and its implications in the racional design of phenolic antioxidants and elucidation of structure – activity relationships for flavonoid antioxidants. *Chem. Eur. J.*, 9(2), 502-508.

[115] Fiorucci, S.; Golebiowski, J.; Cabrol-Bass, D.; Antonczack, S. 2004. Oxygenolysis of flavonoid compounds: DFT description of de mechanism for quecetin. *ChemPhysChem.*, 5(11), 1726-1733.

- [116] Simpson J., Forrester R., Tisdale M.J., Billington D.C., Rahtbone D.L. 2003. Effect of Catechol Derivatives on cell growth and Lipoxygenase Activity. *Biorg. Med. Chem. Letters*. 13, 2435-2439.
- [117] Weinstein D.S., Liu W., Gu Z., Langevine C., Ngu K., Fadnis L., Combs D.W., Sitkoff D., Ahmed S., Zhuang S., Chen X., Wang F., Loughney D.A., Atwal K.S., Zahler R., Macor J.E., Madsen C.S., Murugesan N. 2005. Tryptamine and homotryptamine-based sulfonamides as potent and selective inhibitors of 15-lipoxygenase. *Biorg. Med. Chem. Letters*. 15, 1435-1440.
- [118] Puig C., Crespo M. I., Godessart N., Feixas J., Ibarzo J., Jimenez J.-M., Soca L., Cardelus I., Heredia A., Miralpeix M., Puig J., Beleta J., Huerta J. M., Lopez M., Segarra V., Ryder H. and Palacios J. M. 2000. Synthesis and Biological Evaluation of 3,4-Diaryloxazolones: A New Class of Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 43, 214-223.
- [119] Shin S. S., Noh M.-S., Byun Y. J., Choi J.K., Kim J. Y., Lim K.M., Ha J.-Y., Kim J. K., Lee C. H. and Chung S., 2001. 2,2-Dimethyl-4,5-diaryl-3(2H)furanone derivatives as selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 165-168.
- [120] Pal M., Veeramaneni V.R, Padakanti S., Nagabelli M., Vanguri A., Mamnoor P., Casturi S. R., Misra P., Mullangi R. and Yeleswarapu K. R. 2003. Synthesis and cyclooxygenase (COX-1/COX-2) inhibiting property of 3,4-diarylfuranones, *Indian J. Chem*, 42B, 593-601.
- [121] Li C. S., Brideau C., Chan C.C., Savoie C., Claveau D., Charleson S., Gordon R, Greig G., Gauthier J. Y., Lau C. K, Riendeau D., Thérien M., Wong E. and Prasit P. 2003. Pyridazinones as Selective Cyclooxygenase-2 inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3, 597-600.
- [122] Portevin B., Tordjman C., Pastoureau P., Bonnet J. and Nanteuil G. D. 2000. 1,3-Diaryl-4,5,6,7-tetrahydro-2H-isoindole Derivatives: A New Series of Potent and Selective COX-2 Inhibitors in Which a sulfonyl Group Is Not a Structural Requisite, *J Med. Chem.*, 43, 4582-4593.
- [123] Talley J. J., Brown D. L., Carter J. S., Graneto M. J., Koboldt C. M, Masferrer J. L., Perkins W. E, Rogers R. S., Shaffer A. F., Zhang Y. Y., Zweifel B. S. and Seibert K. 2000. 4-[5-Methyl-3-phenylisoxazol-4-yl]-benzenesulfonamide, Valdecoxib: A Potent and Selective Inhibitor of COX-2, *J. Med. Chem.*, 43, 775-777.
- [124] Lin B.B, Morita T., Lin Y.S. and Chen H.L. 2004. A facile synthesis of 1-ethoxy-4-cyano-5-ethoxycarbonyl-3H-azuleno[1,2-c]pyran-3-one, a selective 15-lipoxygenase inhibitor. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 63-65.
- [125] Audouin C., Mestdagh N., Lassoie M.A., Houssin R. and Hénichart J.P. 2001. N-Aminoindoline derivatives as inhibitors of 5-lipoxygenase. *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 11, 845-848.

- [126] Lewis T.A., Bayless L., DiPesa A.J., Eckman J.B., Gillard M., Libertine L., Scannell R.T., Wypij D.M. and Young M.A. 2005. 5-Lipoxygenase inhibition by *N*-hydroxycarbamates in dual-function compounds. *Biorg. Med. Chem. Lett.*,15, 1083-1085.
- [127] Mano T, Stevens R.W., Okumara Y., Kawai M., Okumara T. and Sakakibar M. 2005. 5-Lipoxygenase inhibitors: convenient synthesis of 4-[3-(4-heterocyclylphenylthio)phenyl]-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-pyran-4-carboxamide analogues. *Biorg. Med. Chem. Lett.*,15, 2611-2615
- [128] Praven Rao P.N., Chen Q.H, Knaus E.E. 2005. Synthesis and biological evaluation of 1,3-diphenylprop-2-yn-1-ones as dual inhibitors of cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biorg. Med. Chem. Letters.* 15, 4842-4845.
- [129] Edwards AM, Arrowsmith CH., Christendat D., Dharamsi A., Friensen JD., Greenblatt JF., Vedadi M. 2000. Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. *Nat. Struct. Biol.* 7, 970-972.
- [130] Abola E., Kuhn P., Earnst T., Stevens RC. 2000. Automation of X-ray crystallography. *Nat. Struct. Biol.* 7, 973-977.
- [131] Siegal G., Van Duynhoven J., Baldus M. 1999. Biomolecular NMR: recent advances in liquids, solids and screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 530-543.
- [132] Kühlbrandt W., Williams KA. 1999. Analysis of macromolecular structure and dynamics by electron cryo-microscopy. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3, 537-543.
- [133] Berman HM., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat TN., Weissig H., Shindyalov IN., Bourne PE. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.
- [134] Solomon E.I., Zhou J., Neese F., Pavel E.G. 1997. New insights from spectroscopy into the structure/function relationships of lipoxygenases. *Chem. Biol.* 4(11), 795-808.
- [135] Glickman M.H., Klinman J.P. 1995. Nature of the Rate-Limiting Step in the soybean lipoxygenase-1 Reaction. *Biochem.* 34(43), 14077-14092.
- [136] Segraves E.N., Holman T.R. 2003. Kinetic Investigations of the Rate-Limiting Step in Human 12- and 15-lipoxygenase. *Biochem.* 42(18), 5236-5243
- [137] Olson M.H.M., Siegbahn P.E.M., Warshel A. 2004. Simulations of the large kinetic isotope effect and the temperature dependence of the hydrogen atom transfer in lipoxygenase. *J. Am. Chem. Soc.* 126(9), 2820-2828.
- [138] Coffa G., Brash A.R. 2004. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(44), 15579-15584.

- [139] Gillmor SA, Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner M.F. 1997. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat. Struct. Biol.* 4, 1003-1009.
- [140] Minor W., Steczko J., Stec B., Otwinowski Z., Bolin J.T., Walter R., Axelrod B. 1996. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1,4 Å resolution. *Biochem.* 35(33), 10687-10701.
- [141] Skrzypczak-Jankun E., Amzel L.M., Kroa B.A., Funk M.O. Jr. 1997. Structure of soybean lipoxygenase L3 and comparison with its L1 isoenzyme. *Proteins.* 29(1), 15-31.
- [142] Rowlinson S.W., Kiefer J.R., Prusakiewicz J.J., Pawlitz J.L., Kozak K.R., Kalgutkar A.S., Stallings W.C., Kurumbail R.G., Marnett L.J. 2003. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J. Biol. Chem.* 278,45763-45769.
- [143] Fischer E. 1894. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber.* 27:2985-93
- [144] Koshland DE Jr. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 44:98-104
- [145] Foote J., Milstein C. 1994. Conformational isomerism and the diversity of antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:10370-74
- [146] Kauzmann W. 1959. Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 14:1-63
- [147] Head MS., Given JA., Gilson MK. 1997. "Mining minima": direct computation of conformational free energy. *J. Phys. Chem. A* 101:1609-18
- [148] Vieth M., Hirst JD., Kolinski A., Brooks CL. 1998. Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* 19 : 1612-22
- [149] Gabb J., Jackson RM., Sternberg MJE. 1997. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* 272: 106-120.
- [150] Jones G., Willett P., Glen RC., Leach AR., Taylor R. 1997. development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* 267: 727-748.
- [151] Kramer B., Rarey M., Lengauer T. 1999. Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins* 37: 228-241.
- [152] Verkhivker GM., Bouzida D., Gehlhaar DK., Rejto PA., Arthur S., et al. 2000. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 14: 731-751.

- [153] Stahl M., Rarey M. 2001. Detailed analysis of scoring functions for virtual screening. *J. Med. Chem.* 44: 1035-1042.
- [154] Charifson PS., Corkery JJ., Murcko MA., Walters WP. 1999. Consensus scoring: a method for obtaining improved hits rates from docking databases of three dimensional structures into proteins. *J. Med. Chem.* 42: 5100-5109
- [155] Chambers CC., Hawkins GD., Cramer DJ., Truhlar DG. 1996. Model for aqueous solvation based on class IV atomic charges and first solvation shell effects. *J. Phys. Chem.* 100: 16385-16396.
- [156] Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. 1996. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm. *J. Mol. Biol.* 261 : 470-489.
- [157] Kuntz ID. 1992. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science.* 257 : 1078-1082.
- [158] Zou X., Sun Y., Kuntz ID. 1999. Inclusion of Solvation in Ligand Binding Free Energy Calculations Using the Generalized-Born Model. *J. Am. Chem. Soc.* 121 :8033-8043.
- [159] Morris GM., Goodsell DS., Halliday RS., Huey R., Hart WE. et al. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical free energy function. *J. Comput. Chem.* 19 : 1639-62
- [160] Jones G., Willett P., Glen RC. 1995. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol.* 245 : 43-53.
- [161] Goodsell DS., Olson AJ. 1990. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins.* 8(3) : 195-202.
- [162] Hart TN., Read RJ. 1992. A multiple-start Monte Carlo docking method. *Proteins.* 13 : 206-222.
- [163] Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. 2004. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins.* 57(2) 225-242.
- [164] Rarey M., Kramer B., Lengauer T. 1997. Multiple automatic base selection: protein-ligand docking based on incremental construction without manual intervention. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 11 : 369-384.
- [165] Rarey M., Wefing S., Lengauer T. 1996. Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 10 : 41-54.
- [166] Hart TN., Read RJ. 1992. A multiple-start Monte Carlo docking method. *Proteins.* 13 : 206-222.

- [167] Morris GM., Goodsell DS., Halliday RS., Huey R., Hart WE. et al. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical free energy function. *J. Comput. Chem.* 19 : 1639–62
- [168] Welch W., Ruppert J., Jain AN. 1996. Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. *Chem. Biol.* 3 : 449-462.
- [169] Schneider G., Böhm H-J. 2002. Virtual screening and fast automated *docking* methods. *Drug Discov. Today.* 7 : 64-70.
- [170] Tame JRH. 1999. *Scoring* functions: a view from the bench. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 13 : 99-108.
- [171] Abagyan R., Totrov M. 2001. High-throughput *docking* for lead generation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 : 375-382.
- [172] Gohlke H., Klebe G. 2001. Statistical potentials and *scoring* functions applied to protein-ligand binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 : 231-235.
- [173] Bissantz C., Folkers G., Rognan D. 2000. Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different *docking/scoring* combinations. *J. Med. Chem.* 43 : 4759-4767.
- [174] Stahl M., Rarey M. 2001. Detailed analysis of *scoring* functions for virtual screening. *J. Med. Chem.* 44 : 1035-1042.
- [175] Brooijmans N., Kuntz ID. 2003. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 32 : 335-373.
- [176] Böhm H-J. 1998. Prediction of binding constants of protein ligands : a fast method for the prioritization of hits obtained from de novo design or 3D database search programs. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 12 : 309-323.
- [177] Solis FJ., Wets RJ-B. 1981. Minimization by random search techniques. *Mathematical Operations Research.* 6 : 19-30.
- [178] Böhm H-J. 1994. The development of a simple empirical scoring function to estimate the binding constant for a protein-ligand complex of known three-dimensional structure. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 8 : 243-256.
- [179] Rarey M., Kramer B., and Lengauer T. 1997. Multiple automatic base selection: Protein–ligand docking based on incremental construction without manual intervention, *J. of Comp. Aided Mol. Design.*, 11, 369–384.
- [180] Wesson L., Eisenberg D. 1992. Atomic solvation parameters applied to molecular dynamics of proteins in solution. *Prot. Sci.* 1 : 227-235
- [181] Goodsell DS., Morris GM., Olson AJ. 1996. Automated Docking of Flexible Ligands : Applications of AutoDock. *J. Mol. Recognition.* 9 : 1-5.

- [182] Wang R.; Lai L.; Wang S. 2002. Further Development and Validation of Empirical Scoring Functions for Structure-Based Binding Affinity Prediction. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 16, 11-26.
- [183] Muegge I., Martin YC. 1999. A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach. *J. Med. Chem.* 42 : 791-804.
- [184] Weiner SJ., Kollman PA., Nguyen DT., Case DA. 1986. An All Atom Force Field for Simulations of Proteins and Nucleic Acids. *J. Comp. Chem.* 7 : 230-252.
- [185] Plouffe-Price M.L. and Jorgensen W.L., 2000. Origin of the Selectivity of Celecoxib Analogs with COX-1 and COX-2 from Docking and Monte Carlo Simulations. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 9455-9466.
- [186] Pouplana R. Lozano J.J. and Ruiz J. 2002. Molecular Modelling of the Differential Interaction Between Several Non-Steroidal Anti-inflammatory Drugs and Human Prostaglandin Endoperoxide H-synthase-2 (h-PGHS-2). *J. Mol. Graph. Modelling.*, 20, 329-343.
- [187] Akaho E., Fujikawa C., Runion H.I., Hill C.R. and Nakano H. 1999. A Study on Binding Modes of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs to COX1 and COX2 as Obtained by Dock4.0, *J. Chem. Software.*, 5, 147-162.
- [188] Miteva M. A., Violas S., Montes M., Gomez D., Tuffery P. and Villoutreix B. O. 2006. FAF-Drugs: free ADME/tox filtering of compound collections. *Nucl. Acid Res.*, 34, Web Server issue
- [189] Lipinski C.A., Lombardo F., Domini B.W., Feney P.J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23, 3-25

Fichier PDB 1LOX

```

HEADER      OXIDOREDUCTASE                      06-OCT-97    1LOX
TITLE       RABBIT RETICULOCYTE 15-LIPOXYGENASE
COMPND      MOL_ID: 1;
COMPND      2 MOLECULE: 15-LIPOXYGENASE;
COMPND      3 CHAIN: NULL;
COMPND      4 SYNONYM: 15LOX;
COMPND      5 EC: 1.13.11.33;
COMPND      6 BIOLOGICAL_UNIT: MONOMER;
COMPND      7 OTHER_DETAILS: 15LOX IS BOUND TO A COMPETITIVE INHIBITOR
COMPND      8 WHICH HAS THE RESIDUE NUMBER 841
SOURCE      MOL_ID: 1;
SOURCE      2 ORGANISM_SCIENTIFIC: ORYCTOLAGUS CUNICULUS;
SOURCE      3 ORGANISM_COMMON: RABBIT;
SOURCE      4 CELL: RETICULOCYTE;
SOURCE      5 CELLULAR_LOCATION: CYTOPLASM
KEYWDS      OXIDOREDUCTASE, 15LO_DEPOT2
EXPDTA      X-RAY DIFFRACTION
AUTHOR      S.A.GILLMOR,A.VILLASENOR,R.J.FLETTERICK,E.SIGAL,M.F.BROWNER
REVDAT      1  04-NOV-98 1LOX    0
JRNL        AUTH    S.A.GILLMOR,A.VILLASENOR,R.FLETTERICK,E.SIGAL,
JRNL        AUTH    2 M.F.BROWNER
JRNL        TITL    THE STRUCTURE OF MAMMALIAN 15-LIPOXYGENASE REVEALS
JRNL        TITL    2 SIMILARITY TO THE LIPASES AND THE DETERMINANTS OF
JRNL        TITL    3 SUBSTRATE SPECIFICITY
JRNL        REF     NAT.STRUCT.BIOL.                V.    4   1003 1997
JRNL        REFN    ASTM NSBIEW US ISSN 1072-8368                2024
REMARK      2 RESOLUTION. 2.4  ANGSTROMS.
REMARK      3

SEQRES      1   662  GLY VAL TYR ARG VAL CYS VAL SER THR GLY ALA SER ILE
SEQRES      2   662  TYR ALA GLY SER LYS ASN LYS VAL GLU LEU TRP LEU VAL
SEQRES      3   662  GLY GLN HIS GLY GLU VAL GLU LEU GLY SER CYS LEU ARG
SEQRES      4   662  PRO THR ARG ASN LYS GLU GLU GLU PHE LYS VAL ASN VAL
SEQRES      5   662  SER LYS TYR LEU GLY SER LEU LEU PHE VAL ARG LEU ARG
SEQRES      6   662  LYS LYS HIS PHE LEU LYS GLU ASP ALA TRP PHE CYS ASN
SEQRES      7   662  TRP ILE SER VAL GLN ALA LEU GLY ALA ALA GLU ASP LYS
SEQRES      8   662  TYR TRP PHE PRO CYS TYR ARG TRP VAL VAL GLY ASP GLY
SEQRES      9   662  VAL GLN SER LEU PRO VAL GLY THR GLY CYS THR THR VAL
SEQRES     10   662  GLY ASP PRO GLN GLY LEU PHE GLN LYS HIS ARG GLU GLN
SEQRES     11   662  GLU LEU GLU GLU ARG ARG LYS LEU TYR GLN TRP GLY SER
SEQRES     12   662  TRP LYS GLU GLY LEU ILE LEU ASN VAL ALA GLY SER LYS
SEQRES     13   662  LEU THR ASP LEU PRO VAL ASP GLU ARG PHE LEU GLU ASP
SEQRES     14   662  LYS LYS ILE ASP PHE GLU ALA SER LEU ALA TRP GLY LEU
SEQRES     15   662  ALA GLU LEU ALA LEU LYS ASN SER LEU ASN ILE LEU ALA
SEQRES     16   662  PRO TRP LYS THR LEU ASP ASP PHE ASN ARG ILE PHE TRP
SEQRES     17   662  CYS GLY ARG SER LYS LEU ALA ARG ARG VAL ARG ASP SER
SEQRES     18   662  TRP GLN GLU ASP SER LEU PHE GLY TYR GLN PHE LEU ASN
SEQRES     19   662  GLY ALA ASN PRO MET LEU LEU ARG ARG SER VAL GLN LEU
SEQRES     20   662  PRO ALA ARG LEU VAL PHE PRO PRO GLY MET GLU GLU LEU
SEQRES     21   662  GLN ALA GLN LEU GLU LYS GLU LEU LYS ALA GLY THR LEU
SEQRES     22   662  PHE GLU ALA ASP PHE ALA LEU LEU ASP ASN ILE LYS ALA
SEQRES     23   662  ASN VAL ILE LEU TYR CYS GLN GLN TYR LEU ALA ALA PRO
SEQRES     24   662  LEU VAL MET LEU LYS LEU GLN PRO ASP GLY LYS LEU MET
SEQRES     25   662  PRO MET VAL ILE GLN LEU HIS LEU PRO LYS ILE GLY SER
SEQRES     26   662  SER PRO PRO PRO LEU PHE LEU PRO THR ASP PRO PRO MET
SEQRES     27   662  VAL TRP LEU LEU ALA LYS CYS TRP VAL ARG SER SER ASP
SEQRES     28   662  PHE GLN VAL HIS GLU LEU ASN SER HIS LEU LEU ARG GLY
SEQRES     29   662  HIS LEU MET ALA GLU VAL PHE THR VAL ALA THR MET ARG
SEQRES     30   662  CYS LEU PRO SER ILE HIS PRO VAL PHE LYS LEU ILE VAL

```

SEQRES	31	662	PRO	HIS	LEU	ARG	TYR	THR	LEU	GLU	ILE	ASN	VAL	ARG	ALA
SEQRES	32	662	ARG	ASN	GLY	LEU	VAL	SER	ASP	PHE	GLY	ILE	PHE	ASP	GLN
SEQRES	33	662	ILE	MET	SER	THR	GLY	GLY	GLY	GLY	HIS	VAL	GLN	LEU	LEU
SEQRES	34	662	GLN	GLN	ALA	GLY	ALA	PHE	LEU	THR	TYR	ARG	SER	PHE	CYS
SEQRES	35	662	PRO	PRO	ASP	ASP	LEU	ALA	ASP	ARG	GLY	LEU	LEU	GLY	VAL
SEQRES	36	662	GLU	SER	SER	PHE	TYR	ALA	GLN	ASP	ALA	LEU	ARG	LEU	TRP
SEQRES	37	662	GLU	ILE	ILE	SER	ARG	TYR	VAL	GLN	GLY	ILE	MET	GLY	LEU
SEQRES	38	662	TYR	TYR	LYS	THR	ASP	GLU	ALA	VAL	ARG	ASP	ASP	LEU	GLU
SEQRES	39	662	LEU	GLN	SER	TRP	CYS	ARG	GLU	ILE	THR	GLU	ILE	GLY	LEU
SEQRES	40	662	GLN	GLY	ALA	GLN	LYS	GLN	GLY	PHE	PRO	THR	SER	LEU	GLN
SEQRES	41	662	SER	VAL	ALA	GLN	ALA	CYS	HIS	PHE	VAL	THR	MET	CYS	ILE
SEQRES	42	662	PHE	THR	CYS	THR	GLY	GLN	HIS	SER	SER	ILE	HIS	LEU	GLY
SEQRES	43	662	GLN	LEU	ASP	TRP	PHE	THR	TRP	VAL	PRO	ASN	ALA	PRO	CYS
SEQRES	44	662	THR	MET	ARG	LEU	PRO	PRO	PRO	THR	THR	LYS	ASP	ALA	THR
SEQRES	45	662	LEU	GLU	THR	VAL	MET	ALA	THR	LEU	PRO	ASN	LEU	LYS	GLN
SEQRES	46	662	SER	SER	LEU	GLN	MET	SER	ILE	VAL	TRP	GLN	LEU	GLY	ARG
SEQRES	47	662	ASP	GLN	PRO	ILE	MET	VAL	PRO	LEU	GLY	GLN	HIS	GLN	GLU
SEQRES	48	662	GLU	TYR	PHE	SER	GLY	PRO	GLU	PRO	ARG	ALA	VAL	LEU	GLU
SEQRES	49	662	LYS	PHE	ARG	GLU	GLU	LEU	ALA	ILE	MET	ASP	LYS	GLU	ILE
SEQRES	50	662	GLU	VAL	ARG	ASN	GLU	LYS	LEU	ASP	ILE	PRO	TYR	GLU	TYR
SEQRES	51	662	LEU	ARG	PRO	SER	ILE	VAL	GLU	ASN	SER	VAL	ALA	ILE	
HET	FE2	840												1	
HET	RS7	841												19	
HETNAM			FE2 FE(II) ION												
HETNAM			RS7 3-(2-OCTYLPHENYL)PROPANOIC ACID												
FORMUL	2	FE2												FE1	2+
FORMUL	3	RS7												C17	H26 O2
FORMUL	4	HOH												*94	(H2 O1)

Fichier PDB 1N8Q

```

HEADER      OXIDOREDUCTASE                      21-NOV-02   1N8Q
TITLE      LIPOXYGENASE IN COMPLEX WITH PROTOCATECHUIC ACID
COMPND     MOL_ID: 1;
COMPND     2 MOLECULE: LIPOXYGENASE-3;
COMPND     3 CHAIN: A;
COMPND     4 EC: 1.13.11.12
SOURCE     MOL_ID: 1;
SOURCE     2 ORGANISM_SCIENTIFIC: GLYCINE MAX;
SOURCE     3 ORGANISM_COMMON: SOYBEAN;
SOURCE     4 STRAIN: RESNICK CULTIVAR
KEYWDS     OXIDOREDUCTASE, LIPOXYGENASE, IRON, PROTOCATECHUIC ACID, 3,4-
KEYWDS     2 DIHYDROXYBENZOIC ACID, LOX COMPLEX, QUERCETIN
EXPDTA     X-RAY DIFFRACTION
AUTHOR     O.Y.BORBULEVYCH, J.JANKUN, S.H.SELMAN, E.SKRZYPCZAK-JANKUN
REVDAT    2 10-FEB-04 1N8Q 1      JRNL
REVDAT    1 03-JUN-03 1N8Q 0
JRNL       AUTH  O.Y.BORBULEVYCH, J.JANKUN, S.H.SELMAN,
JRNL       AUTH 2 E.SKRZYPCZAK-JANKUN
JRNL       TITL  LIPOXYGENASE INTERACTIONS WITH NATURAL FLAVONOID,
JRNL       TITL 2 QUERCETIN, REVEAL A COMPLEX WITH PROTOCATECHUIC
JRNL       TITL 3 ACID IN ITS X-RAY STRUCTURE AT 2.1 A RESOLUTION.
JRNL       REF   PROTEINS:                      V. 54    13 2004
JRNL       REF  2 STRUCT., FUNCT., GENET.
JRNL       REFN  ASTM PSFGY  US ISSN 0887-3585
SEQRES    1 A  857 MET LEU GLY GLY LEU LEU HIS ARG GLY HIS LYS ILE LYS
SEQRES    2 A  857 GLY THR VAL VAL LEU MET ARG LYS ASN VAL LEU ASP VAL
SEQRES    3 A  857 ASN SER VAL THR SER VAL GLY GLY ILE ILE GLY GLN GLY
SEQRES    4 A  857 LEU ASP LEU VAL GLY SER THR LEU ASP THR LEU THR ALA
SEQRES    5 A  857 PHE LEU GLY ARG SER VAL SER LEU GLN LEU ILE SER ALA
SEQRES    6 A  857 THR LYS ALA ASP ALA ASN GLY LYS GLY LYS LEU GLY LYS
SEQRES    7 A  857 ALA THR PHE LEU LEU GLU GLY ILE ILE THR SER LEU PRO THR
SEQRES    8 A  857 LEU GLY ALA GLY GLN SER ALA PHE LYS ILE ASN PHE GLU
SEQRES    9 A  857 TRP ASP ASP GLY SER GLY ILE PRO GLY ALA PHE TYR ILE
SEQRES   10 A  857 LYS ASN PHE MET GLN THR GLU PHE PHE LEU VAL SER LEU
SEQRES   11 A  857 THR LEU GLU ASP ILE PRO ASN HIS GLY SER ILE HIS PHE
SEQRES   12 A  857 VAL CYS ASN SER TRP ILE TYR ASN ALA LYS LEU PHE LYS
SEQRES   13 A  857 SER ASP ARG ILE PHE PHE ALA ASN GLN THR TYR LEU PRO
SEQRES   14 A  857 SER GLU THR PRO ALA PRO LEU VAL LYS TYR ARG GLU GLU
SEQRES   15 A  857 GLU LEU HIS ASN LEU ARG GLY ASP GLY THR GLY GLU ARG
SEQRES   16 A  857 LYS GLU TRP GLU ARG ILE TYR ASP TYR ASP VAL TYR ASN
SEQRES   17 A  857 ASP LEU GLY ASP PRO ASP LYS GLY GLU ASN HIS ALA ARG
SEQRES   18 A  857 PRO VAL LEU GLY GLY ASN ASP THR PHE PRO TYR PRO ARG
SEQRES   19 A  857 ARG GLY ARG THR GLY ARG LYS PRO THR ARG LYS ASP PRO
SEQRES   20 A  857 ASN SER GLU SER ARG SER ASN ASP VAL TYR LEU PRO ARG
SEQRES   21 A  857 ASP GLU ALA PHE GLY HIS LEU LYS SER SER ASP PHE LEU
SEQRES   22 A  857 THR TYR GLY LEU LYS SER VAL SER GLN ASN VAL LEU PRO
SEQRES   23 A  857 LEU LEU GLN SER ALA PHE ASP LEU ASN PHE THR PRO ARG
SEQRES   24 A  857 GLU PHE ASP SER PHE ASP GLU VAL HIS GLY LEU TYR SER
SEQRES   25 A  857 GLY GLY ILE LYS LEU PRO THR ASP ILE ILE SER LYS ILE
SEQRES   26 A  857 SER PRO LEU PRO VAL LEU LYS GLU ILE PHE ARG THR ASP
SEQRES   27 A  857 GLY GLU GLN ALA LEU LYS PHE PRO PRO PRO LYS VAL ILE
SEQRES   28 A  857 GLN VAL SER LYS SER ALA TRP MET THR ASP GLU GLU PHE
SEQRES   29 A  857 ALA ARG GLU MET LEU ALA GLY VAL ASN PRO ASN LEU ILE
SEQRES   30 A  857 ARG CYS LEU LYS ASP PHE PRO PRO ARG SER LYS LEU ASP
SEQRES   31 A  857 SER GLN VAL TYR GLY ASP HIS THR SER GLN ILE THR LYS
SEQRES   32 A  857 GLU HIS LEU GLU PRO ASN LEU GLU GLY LEU THR VAL ASP
SEQRES   33 A  857 GLU ALA ILE GLN ASN LYS ARG LEU PHE LEU LEU ASP HIS
SEQRES   34 A  857 HIS ASP PRO ILE MET PRO TYR LEU ARG ARG ILE ASN ALA
SEQRES   35 A  857 THR SER THR LYS ALA TYR ALA THR ARG THR ILE LEU PHE

```

SEQRES 36 A 857 LEU LYS ASN ASP GLY THR LEU ARG PRO LEU ALA ILE GLU
 SEQRES 37 A 857 LEU SER LEU PRO HIS PRO GLN GLY ASP GLN SER GLY ALA
 SEQRES 38 A 857 PHE SER GLN VAL PHE LEU PRO ALA ASP GLU GLY VAL GLU
 SEQRES 39 A 857 SER SER ILE TRP LEU LEU ALA LYS ALA TYR VAL VAL VAL
 SEQRES 40 A 857 ASN ASP SER CYS TYR HIS GLN LEU VAL SER HIS TRP LEU
 SEQRES 41 A 857 ASN THR HIS ALA VAL VAL GLU PRO PHE ILE ILE ALA THR
 SEQRES 42 A 857 ASN ARG HIS LEU SER VAL VAL HIS PRO ILE TYR LYS LEU
 SEQRES 43 A 857 LEU HIS PRO HIS TYR ARG ASP THR MET ASN ILE ASN GLY
 SEQRES 44 A 857 LEU ALA ARG LEU SER LEU VAL ASN ASP GLY GLY VAL ILE
 SEQRES 45 A 857 GLU GLN THR PHE LEU TRP GLY ARG TYR SER VAL GLU MET
 SEQRES 46 A 857 SER ALA VAL VAL TYR LYS ASP TRP VAL PHE THR ASP GLN
 SEQRES 47 A 857 ALA LEU PRO ALA ASP LEU ILE LYS ARG GLY MET ALA ILE
 SEQRES 48 A 857 GLU ASP PRO SER CYS PRO HIS GLY ILE ARG LEU VAL ILE
 SEQRES 49 A 857 GLU ASP TYR PRO TYR THR VAL ASP GLY LEU GLU ILE TRP
 SEQRES 50 A 857 ASP ALA ILE LYS THR TRP VAL HIS GLU TYR VAL PHE LEU
 SEQRES 51 A 857 TYR TYR LYS SER ASP ASP THR LEU ARG GLU ASP PRO GLU
 SEQRES 52 A 857 LEU GLN ALA CYS TRP LYS GLU LEU VAL GLU VAL GLY HIS
 SEQRES 53 A 857 GLY ASP LYS LYS ASN GLU PRO TRP TRP PRO LYS MET GLN
 SEQRES 54 A 857 THR ARG GLU GLU LEU VAL GLU ALA CYS ALA ILE ILE ILE
 SEQRES 55 A 857 TRP THR ALA SER ALA LEU HIS ALA ALA VAL ASN PHE GLY
 SEQRES 56 A 857 GLN TYR PRO TYR GLY GLY LEU ILE LEU ASN ARG PRO THR
 SEQRES 57 A 857 LEU SER ARG ARG PHE MET PRO GLU LYS GLY SER ALA GLU
 SEQRES 58 A 857 TYR GLU GLU LEU ARG LYS ASN PRO GLN LYS ALA TYR LEU
 SEQRES 59 A 857 LYS THR ILE THR PRO LYS PHE GLN THR LEU ILE ASP LEU
 SEQRES 60 A 857 SER VAL ILE GLU ILE LEU SER ARG HIS ALA SER ASP GLU
 SEQRES 61 A 857 VAL TYR LEU GLY GLU ARG ASP ASN PRO ASN TRP THR SER
 SEQRES 62 A 857 ASP THR ARG ALA LEU GLU ALA PHE LYS ARG PHE GLY ASN
 SEQRES 63 A 857 LYS LEU ALA GLN ILE GLU ASN LYS LEU SER GLU ARG ASN
 SEQRES 64 A 857 ASN ASP GLU LYS LEU ARG ASN ARG CYS GLY PRO VAL GLN
 SEQRES 65 A 857 MET PRO TYR THR LEU LEU LEU PRO SER SER LYS GLU GLY
 SEQRES 66 A 857 LEU THR PHE ARG GLY ILE PRO ASN SER ILE SER ILE
 HET FE2 A 858 1
 HET DHB 859 11
 HETNAM FE2 FE (II) ION
 HETNAM DHB 3,4-DIHYDROXYBENZOIC ACID
 FORMUL 2 FE2 FE1 2+
 FORMUL 3 DHB C7 H6 O4
 FORMUL 4 HOH *463(H2 O1)

Fichier PDB 1CX2

```

HEADER      OXIDOREDUCTASE                               17-DEC-96   1CX2
TITLE       CYCLOOXYGENASE-2 (PROSTAGLANDIN SYNTHASE-2) COMPLEXED WITH
TITLE       2 A SELECTIVE INHIBITOR, SC-558
REMARK      1 AUTH   R.G.KURUMBAIL,A.M.STEVENS,J.K.GIERSE,J.J.MCDONALD,
REMARK      1 AUTH 2 R.A.STEGEMAN,J.Y.PAK,D.GILDEHAUS,J.M.MIYASHIRO,
REMARK      1 AUTH 3 T.D.PENNING,K.SEIBERT,P.C.ISAKSON,W.C.STALLINGS
REMARK      1 TITL  ERRATUM. STRUCTURAL BASIS FOR SELECTIVE INHIBITION
REMARK      1 TITL 2 OF CYCLOOXYGENASE-2 BY ANTI-INFLAMMATORY AGENTS
REMARK      1 REF    NATURE                               V. 385   555 1997
REMARK      1 REFN  ASTM NATUAS   UK ISSN 0028-0836                               0006
REMARK      2 RESOLUTION. 3.0  ANGSTROMS.
DBREF      1CX2 A   33   583  SWS   Q05769   PGH2_MOUSE   18   569
DBREF      1CX2 B   33   583  SWS   Q05769   PGH2_MOUSE   18   569
DBREF      1CX2 C   33   583  SWS   Q05769   PGH2_MOUSE   18   569
DBREF      1CX2 D   33   583  SWS   Q05769   PGH2_MOUSE   18   569
SEQADV     1CX2 GLN A  310  SWS   Q05769   ASN    296  CONFLICT
SEQADV     1CX2 LYS A  333  SWS   Q05769   ARG    319  CONFLICT
SEQADV     1CX2 GLN B  310  SWS   Q05769   ASN    296  CONFLICT
SEQADV     1CX2 LYS B  333  SWS   Q05769   ARG    319  CONFLICT
SEQADV     1CX2 GLN C  310  SWS   Q05769   ASN    296  CONFLICT
SEQADV     1CX2 LYS C  333  SWS   Q05769   ARG    319  CONFLICT
SEQADV     1CX2 GLN D  310  SWS   Q05769   ASN    296  CONFLICT
SEQADV     1CX2 LYS D  333  SWS   Q05769   ARG    319  CONFLICT
SEQRES     1 A   587  ALA ASN PRO CYS CYS SER ASN PRO CYS GLN ASN ARG GLY
SEQRES     2 A   587  GLU CYS MET SER THR GLY PHE ASP GLN TYR LYS CYS ASP
SEQRES     3 A   587  CYS THR ARG THR GLY PHE TYR GLY GLU ASN CYS THR THR
SEQRES     4 A   587  PRO GLU PHE LEU THR ARG ILE LYS LEU LEU LEU LYS PRO
SEQRES     5 A   587  THR PRO ASN THR VAL HIS TYR ILE LEU THR HIS PHE LYS
SEQRES     6 A   587  GLY VAL TRP ASN ILE VAL ASN ASN ILE PRO PHE LEU ARG
SEQRES     7 A   587  SER LEU ILE MET LYS TYR VAL LEU THR SER ARG SER TYR
SEQRES     8 A   587  LEU ILE ASP SER PRO PRO THR TYR ASN VAL HIS TYR GLY
SEQRES     9 A   587  TYR LYS SER TRP GLU ALA PHE SER ASN LEU SER TYR TYR
SEQRES    10 A   587  THR ARG ALA LEU PRO PRO VAL ALA ASP ASP CYS PRO THR
SEQRES    11 A   587  PRO MET GLY VAL LYS GLY ASN LYS GLU LEU PRO ASP SER
SEQRES    12 A   587  LYS GLU VAL LEU GLU LYS VAL LEU LEU ARG ARG GLU PHE
SEQRES    13 A   587  ILE PRO ASP PRO GLN GLY SER ASN MET MET PHE ALA PHE
SEQRES    14 A   587  PHE ALA GLN HIS PHE THR HIS GLN PHE PHE LYS THR ASP
SEQRES    15 A   587  HIS LYS ARG GLY PRO GLY PHE THR ARG GLY LEU GLY HIS
SEQRES    16 A   587  GLY VAL ASP LEU ASN HIS ILE TYR GLY GLU THR LEU ASP
SEQRES    17 A   587  ARG GLN HIS LYS LEU ARG LEU PHE LYS ASP GLY LYS LEU
SEQRES    18 A   587  LYS TYR GLN VAL ILE GLY GLY GLU VAL TYR PRO PRO THR
SEQRES    19 A   587  VAL LYS ASP THR GLN VAL GLU MET ILE TYR PRO PRO HIS
SEQRES    20 A   587  ILE PRO GLU ASN LEU GLN PHE ALA VAL GLY GLN GLU VAL
SEQRES    21 A   587  PHE GLY LEU VAL PRO GLY LEU MET MET TYR ALA THR ILE
SEQRES    22 A   587  TRP LEU ARG GLU HIS GLN ARG VAL CYS ASP ILE LEU LYS
SEQRES    23 A   587  GLN GLU HIS PRO GLU TRP GLY ASP GLU GLN LEU PHE GLN
SEQRES    24 A   587  THR SER LYS LEU ILE LEU ILE GLY GLU THR ILE LYS ILE
SEQRES    25 A   587  VAL ILE GLU ASP TYR VAL GLN HIS LEU SER GLY TYR HIS
SEQRES    26 A   587  PHE LYS LEU LYS PHE ASP PRO GLU LEU LEU PHE ASN GLN
SEQRES    27 A   587  GLN PHE GLN TYR GLN ASN ARG ILE ALA SER GLU PHE ASN
SEQRES    28 A   587  THR LEU TYR HIS TRP HIS PRO LEU LEU PRO ASP THR PHE
SEQRES    29 A   587  ASN ILE GLU ASP GLN GLU TYR SER PHE LYS GLN PHE LEU
SEQRES    30 A   587  TYR ASN ASN SER ILE LEU LEU GLU HIS GLY LEU THR GLN
SEQRES    31 A   587  PHE VAL GLU SER PHE THR ARG GLN ILE ALA GLY ARG VAL
SEQRES    32 A   587  ALA GLY GLY ARG ASN VAL PRO ILE ALA VAL GLN ALA VAL
SEQRES    33 A   587  ALA LYS ALA SER ILE ASP GLN SER ARG GLU MET LYS TYR
SEQRES    34 A   587  GLN SER LEU ASN GLU TYR ARG LYS ARG PHE SER LEU LYS
SEQRES    35 A   587  PRO TYR THR SER PHE GLU GLU LEU THR GLY GLU LYS GLU
SEQRES    36 A   587  MET ALA ALA GLU LEU LYS ALA LEU TYR SER ASP ILE ASP

```

SEQRES 37 A 587 VAL MET GLU LEU TYR PRO ALA LEU LEU VAL GLU LYS PRO
 SEQRES 38 A 587 ARG PRO ASP ALA ILE PHE GLY GLU THR MET VAL GLU LEU
 SEQRES 39 A 587 GLY ALA PRO PHE SER LEU LYS GLY LEU MET GLY ASN PRO
 SEQRES 40 A 587 ILE CYS SER PRO GLN TYR TRP LYS PRO SER THR PHE GLY
 SEQRES 41 A 587 GLY GLU VAL GLY PHE LYS ILE ILE ASN THR ALA SER ILE
 SEQRES 42 A 587 GLN SER LEU ILE CYS ASN ASN VAL LYS GLY CYS PRO PHE
 SEQRES 43 A 587 THR SER PHE ASN VAL GLN ASP PRO GLN PRO THR LYS THR
 SEQRES 44 A 587 ALA THR ILE ASN ALA SER ALA SER HIS SER ARG LEU ASP
 SEQRES 45 A 587 ASP ILE ASN PRO THR VAL LEU ILE LYS ARG ARG SER THR
 SEQRES 46 A 587 GLU LEU
 HET HEM A 601 43 PROTOPORPHYRIN IX CONTAINS FE(III)
 HET S58 A 701 28
 HETNAM HEM PROTOPORPHYRIN IX CONTAINING FE
 HETNAM NAG N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE
 HETNAM S58 1-PHENYLSULFONAMIDE-3-TRIFLUOROMETHYL-5-
 HETNAM 2 S58 PARABROMOPHENYLPYRAZOLE
 HETSYN HEM HEME
 FORMUL 5 HEM 4(C34 H32 N4 O4 FE1 1+)
 FORMUL 7 S58 4(C16 H11 N3 O2 BR1 F3 S1)

عنوان

دراسة نظرية للمواد الثانوية للنباتات و المواد الاصطناعية من جانب النشاط البيولوجي :
نمدجة ب *docking* على *elipoxygenas* و *cyclooxygenase*

ملخص

نمدجة التفاعلات البيوجزيئية هي تقنية متطورة في التمثيل النظري باستعمال الحاسوب. عدة نماذج و برامج متوفرة حاليا تسمح بالقيام بدراسة نظرية تستطيع أن تأتي بمعلومات بيولوجية مهمة خاصة في حالة التفاعلات بروتين - رابط . في غالب الأحيان الرابط ذو حجم صغير. عدة برامج "docking" جربت على عدة جزيئات اصطناعية مشتقة من 1.3 ديفينيل بروبين-2 اون 1- وعلى مواد طبيعية متعددة الفينول من قسم الفلافونويدات . تقييم طاقة الربط لهذه المواد مع 15- لبيوكسيجيناز و سيكلوأكسيجيناز-2 ، أنزيمات تتسبب في ظهور عدة أمراض (التهابات ، انسداد الشرايين ، سرطان) ، سمحت بالكشف على المواد الأكثر نشاط تثبيطي بالموازات مع قيم اس 50 المحصل عليها مرجعيا . هذه المواد ، هي " اللوتولين " و المادة "ل" بالنسبة 15-لبيوكسيجيناز و المادة "ج" بالنسبة لالسيكلوأكسيجيناز-2 . قيم طاقة التأثير لهذه المواد على التوالي هي 27.50 - كج/مول ، 28.70- كج/مول و 28.54- كج/مول. عدم وجود المعطيات التجريبية عن النشاط البيولوجي للمواد الطبيعية مع السيكلوأكسيجيناز-2 أدت بنا إلى القيام بدراسة نظرية خاصة لطاقة التأثير لهذه المواد مع هذا الأنزيم باستعمال ثلاثة برامج FlexX ، Autodock ، X-score. يستخرج أن جزيء اللوتولين يقدم أضعف طا قة الارتباط و بالتالي أحسن نشاط تثبيطي . من جهة أخرى ، لقد استطعنا تحسين طاقة الارتباط لحمض 3، 4 ديهيدروبنزويك، مثبط الأنزيم لوكس -3، التي مرت باستعمال FlexX من 10.56- كج/مول الى 21.13- كج/مول و هذا بتغيير الوظيفة الحمضية بمجموعة كحولية. ادخال مجموعة OH على الكربون 5 لهذا الحمض تؤدي الى طاقة تقدر ب 17.00 - كج/مول. المواد الثلاثة تتميز بخصائص أخرى من بينها الوزن الجزيئي الضعيف و قيم موجبة ل P Log. هذا ما يؤكد تمكنها من النشاط البيولوجي. للتأكد من هذه النتائج، يجب القيام بدراسة تطبيقية للنشاط البيولوجي

الكلمات المفتاحية: طاقة الارتباط؛ "docking"؛ مركب أنزيم-مثبط؛ لبيوكسيجيناز؛ سيكلوأكسيجيناز؛
نموذجية جزيئية؛ تأثيرات مرتبط-بروتيني؛ فلافونويدات؛ 1،3 ديفينيل بروبين-2 اون-1

Thème : Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxigénase et la cyclooxygénase

Résumé :

La modélisation des interactions biomoléculaires est une technique performante dans les simulations informatiques. De nombreux modèles et logiciels disponibles maintenant permettent de faire une étude « *in silico* » capable d'apporter des informations biologiques intéressantes notamment dans le cas des interactions protéine-ligand. Le plus souvent le ligand est de petite taille. Plusieurs logiciels de docking ont été testés sur différentes molécules de synthèse dérivées des 1,3 diphenyl propyne-2-one et des polyphénols naturels de la classe des flavonoïdes. L'évaluation de leur énergie d'interaction avec la 15-lipoxigénase et la cyclooxygénase-2, enzymes fortement impliquées dans divers troubles métaboliques (inflammatoires, cardiovasculaires et cancéreux) a permis de dégager celles présentant le meilleur effet inhibiteur, en accord avec les valeurs des IC₅₀ obtenus à partir de la littérature. Il s'agit de la lutéoline et du composé I dans le cas de la 15-lipoxigénase et du composé J dans le cas de la cyclooxygénase-2. Les valeurs de leur énergie d'interaction sont respectivement de -27.50 Kj/mole, -28.70 Kj/mole et de -28.54 Kj/mole. L'absence de données expérimentales sur l'activité biologique des substances naturelles avec la cyclooxygénase-2 nous a conduit à faire une simulation de leur énergie d'interaction avec cette enzyme à l'aide de trois programmes : FlexX, Autodock et X-score. Il ressort que la lutéoline, avec la plus faible énergie d'interaction, présente le meilleur effet inhibiteur. Par ailleurs, nous avons pu améliorer l'énergie de liaison du DHB, inhibiteur de la LOX-3, qui est passée avec FlexX, de -10.564 Kj/mole à -21.127 Kj/mole par simple changement de sa fonction carboxylique COOH par le groupement alcoolique CH₂OH. L'introduction d'un hydroxyle supplémentaire en position 5 du DHB diminue l'énergie jusqu'à -17.00 Kj/mole. Les potentialités biologiques de ces trois molécules sont enfin vérifiées par leurs propriétés pharmacocinétiques, entre autres leurs faibles poids moléculaires et les valeurs positives de leur coefficient de partage Log P. La vérification de ces résultats par une étude expérimentale est toutefois nécessaire.

Mots clés: Energie de liaison, Docking moléculaire; Modélisation moléculaire; Complexe Enzyme-Inhibiteur; Lipoxigénase ; Cyclooxygénase ; Flavonoïdes ; 1,3 diphenyl prop-yne-2-one-1 ; Interactions ligand-proteine .

Title: "Theoretical Study of the biological activity of plants secondary metabolites and synthesis compounds : docking simulations on lipoxygenase and cyclooxygenase "

Summary

The modeling of the biomolecular interactions is a powerful technique in data-processing simulations. Many models and software allow the simulation of the protein-ligand interactions. Generally the ligand is of small size. Several software of docking was tested on various molecules of synthesis derived from the 1,3 diphenyl propyne-2-one and natural polyphenols of the class of the flavonoids. The evaluation of their energy of interaction with the 15-lipoxygenase and the cyclooxygenase-2, enzymes strongly implied in various metabolic disorders (inflammatory, atherosclerosis, cancerous) made it possible to release those presenting the best inhibiting effect in agreement with the values of the IC₅₀ obtained from the literature. It is the luteolin and compound I in the case of the 15-lipoxygenase and the compound j in the case of the cyclooxygenase-2. The values of their energy of interaction are respectively of -28.70 KJ/mol., -27.50 KJ/mol and of -28.54 KJ/mol. The absence of experimental data on the biological activity of the natural substances with the cyclooxygenase-2 led us to make a simulation of their energy of interaction with this enzyme using three programs: FlexX, Autodock and X-score. It arises that the luteolin, with a lowest binding energy, presents the best inhibiting effect. We could improve also the binding energy of the DHB, powerful inhibiting of LOX-3, by changing its carboxylic function by the group CH₂OH ($\Delta G = - 21.127$ KJ/mol). If the hydroxyl group is placed in position 5 of DHB, the binding energy of compound 9 enhances to -16.959 KJ/mol. The biological potentialities of three compounds were checked by their pharmacokinetic properties, the lowest molecular weight and positive values of Log P. However, it is necessary to check these results by an experimental study

Key words : Binding energy, Molecular docking; Molecular Modeling; Inhibitor-Enzyme complexe; Lipoxygenase ; Cyclooxygenase ; Flavonoids; 1,3 diphenyl propyne-2-one-1; ligand-protein Interactions