

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LARECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE

FACULTE DES SCIENCES EXACTES

DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :.....

Série :.....

MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTER
EN CHIMIE THEORIQUE

**MODELISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS SELECTIFS DE
L'OXYDE NITRIQUE SYNTHASE (NOS)**

Présenté par : Farah BOUCHAIR

Soutenu le ... /... /... devant le jury

Mme BENCHARIF L.	Professeur (Constantine)	Présidente
MM. BENCHARIF M.	Professeur (Constantine)	Rapporteur
LAHOUEL M.	Professeur (Jijel)	Examineur
BENLECHEB T.	Maitre de conférences (Khenchela)	Examineur
NECIB Y.	Maitre de conférences (Constantine)	Examineur

Remerciements

Tout travail réussi dans la vie nécessite en premier lieu la bénédiction de Dieu, et ensuite l'aide et le support de plusieurs personnes.

*Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie des matériaux, Faculté des Sciences Exactes, Université Mentouri de Constantine, sous la direction de monsieur le professeur **M. BENCHARIF**, à qui je tiens à exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire et particulièrement pour ses conseils précieux, ses efforts, ses compétences scientifiques et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ^{mme} **R. BENCHERAJET**, maître de conférences au département de chimie, pour m'avoir accompagnée et soutenue pendant mon parcours jusqu'à la réalisation de ce travail. C'est grâce à elle que ce mémoire a vu le jour. Milllllllllllllle mercis Madame pour tous vos encouragements, votre patience et votre dévouement et également pour m'avoir inculqué l'esprit critique, l'esprit d'analyse et de synthèse.*

*Je remercie le professeur **L. BENCHARIF** pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.*

*Je remercie Monsieur **T. BENLACHEB**, maître de conférences à l'université Khenchla, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et surtout pour les merveilleux enseignements qu'il nous a dispensés pendant notre cursus universitaire.*

*Je tiens à remercier Monsieur **M. LAHOUEL**, professeur à l'Université de Jijel, Monsieur **Y. NECIB** maître de conférences à l'Université de Constantine qui ont bien voulu examiner mon travail et participer au jury de soutenance.*

*J'exprime mes sincères remerciements à **A. KRID, Y. DJEBLI, R. BENSEGNI** et **I. HAMLAOUI** doctorants au laboratoire de Chimie des matériaux qui ont codirigé ce travail, qui ont toujours été disponibles pour moi et qui m'ont prodigué de précieux conseils tout au long de ce travail.*

Je remercie l'ensemble de l'équipe de notre laboratoire pour la bonne ambiance qu'elle sait apporter et pour son aide scientifique sans oublier ma copine Asma qui m'a accompagnée pendant ces trois années.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce que la réalisation de ce travail se déroule dans les meilleures conditions.

I can't forget my husband Nadjib for his help and his encouragement during these last years, so thanks.

A mes parents

A ma grande mère Tourkia

A Mes frères et sœurs

A ma belle famille

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Chapitre I : Aspects chimiques de NO et biochimiques de NOS	
I-1- GENERALITE.....	3
I-1-1- Stress oxydant.....	3
I-1-2- Espèces réactives de l'oxygène.....	3
I-1-3- Radicaux libres.....	4
I-2- LE MONOXYDE D'AZOTE.....	4
I-2-1- Structure et propriétés physico-chimique de NO.....	5
I-2-1-1- Propriétés de NO.....	5
I-2-1-2- Réaction avec O ₂	5
I-2-1-3- Réaction avec les métaux de transition.....	6
I-2-1-4- Réaction avec le radical superoxyde.....	6
I-2-2- Biosynthèse de NO.....	7
I-3- STRUCTURE GENERAL DE NOS.....	8
I-3-1- Le domaine réductase.....	8
I-3-2- Le domaine oxygénase.....	9
I-3-3- L'interdomaine.....	10
I-3-4- Les dimères de NOS.....	10
I-3-5- Structure de site actif.....	11
I-3-5-1- Position de l'hème.....	11
I-3-5-2- Position de H ₄ B.....	12
I-3-5-3- Position de la L-arginine.....	12
I-4- DIFFERENTES ISOFORMES DES NOS.....	15
I-4-1- iNOS.....	16
I-4-2- eNOS.....	17
I-4-3- nNOS.....	18
I-5- INHIBITEURS DE NOS.....	19
I-5-1- Isostères.....	20
I-5-2- Analogues de la l-arginine.....	23
CHAPITRE II : Modélisation moléculaire et Docking	
II-1- MECANIQUE MOLECULAIRE.....	25
II-2- LES INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES.....	26
II-3- MODELISATION MOLECULAIRE.....	28

II-4- DOCKING MOLECULAIRE	29
II-4-1- Searching	30
II-4-1-1- Méthode de Monte Carlo	31
II-4-1-2- Algorithme évolutionnaire.....	32
II-4-2- Scoring	33
I-4-2-1- Fonctions de score empiriques	33
I-4-2-2- Fonctions de score Knowledge-based	34
I-4-2-3- Fonctions de score se basant sur le champ de force	34
I-4-2-4- Fonctions de score consensus	34
 CHAPITRE III : Résultats et discussion	
III-1- INTRODUCTION	36
III-2 CHOIX DE LA PDB	36
III-3- SITE ACTIF DE LA 1LZZ.....	38
III-4- CORRELATION $\Delta G_{\text{bind}}/IC_{50}$.....	40
III-5- ELABORATION DE NOUVELLES STRUCTURES	43
III-6- CALCUL DES VALEURS DES IC_{50} THEORIQUES	44
III-7- INTERACTIONS LIGANDS-1LZZ.....	46
III-7-1- Complexes (A, B, C)-1LZZ	46
III-7-1-1- Complexe A-1LZZ.....	46
III-7-1-2- Complexe B-1LZZ.....	47
III-7-1-3- Complexe C-1LZZ.....	49
III-7-2- Complexe (D, E, F)- 1LZZ	50
III-7-2-1- Complexe D-1LZZ.....	50
III-7-2-2- Complexe E-1LZZ.....	51
III-7-2-3- Complexe F-1LZZ.....	52
III-7-3- Interaction de la molécule G avec 1LZZ	54
III-7-4- Interaction de la molécule H avec 1LZZ.....	55
III-7-5- Interaction de la molécule I avec 1LZZ.....	57
III-7-6- Interaction de la molécule J et K avec 1LZZ	58
III-7-6-1- Complexe J-1LZZ	59
III-7-6-2- Complexe K-1LZZ.....	60
III-8- Conclusion.....	61
 CONCLUSION GÉNÉRALE.....	63
 BIBLIOGRAPHIE.....	64
 RESUMÉ	

Introduction générale

Les interactions protéine-ligand jouent un rôle important dans les systèmes vivants où elles participent à la régulation de certains mécanismes biologiques [1, 2], à la transmission des signaux [3] ou à la catalyse de différentes réactions biochimiques [4, 5, 6].

Comprendre la manière dont les macromolécules interagissent avec d'autres entités chimiques contribue à mettre en évidence l'ensemble des éléments engagés dans un tel processus et identifier ceux qui y assurent des fonctions particulières telle que l'inhibition. Avec le développement de la chimie-informatique structurale, la simulation, via la modélisation moléculaire, permet d'observer comment se place le ligand dans la protéine, de déterminer les diverses interactions qui apparaissent lors de l'arrimage et de prévoir les configurations où prévaut la meilleure affinité entre les deux parties.

La conception de nouveaux composés chimiques ayant des propriétés bioactives requière des études expérimentales quantitatives de leur efficacité. L'élaboration d'un protocole reproductible pour estimer cette efficacité *in vitro* et *in vivo* est parfois très difficile à réaliser sur le plan biologique. A titre d'exemple, la mise sur le marché d'un médicament nécessite entre 12 et 15 ans de travail et coûte près d'un milliard de dollars [7, 8]. Tenter les expérimentations au laboratoire demanderait trop d'investissements au niveau économique, temps et travail. La simulation *in silico* (docking moléculaire) entre l'enzyme et le ligand, de part son coût peu onéreux et sa rapidité à se mettre en œuvre, reste une bonne alternative qui permet à la recherche dans le domaine du médicament d'avancer plus vite.

In silico, le docking moléculaire, vise à prédire la formation du complexe le plus stable résultant de la protéine et du ligand pris séparément. L'avantage essentiel de cette approche est de mettre en évidence les propriétés électroniques, structurales et énergétiques de l'architecture moléculaire ainsi constituée.

C'est dans ce cadre, que se situe ce travail qui va nous permettre d'élaborer de nouvelles structures analogues de la L-arginine à partir du concept de bioisostérisme. Le degré d'inhibition de ces molécules vis-à-vis de l'oxyde nitrique synthase neuronal (nNOS) sera évalué théoriquement par le biais du docking. Cette enzyme est responsable de la formation de l'oxyde nitrique (NO).

Un déséquilibre de la production de NO participe à l'apparition et au développement de pathologies neurologiques et cardiaques et engendre également certains troubles du métabolisme ou des processus inflammatoires [9]. Une surproduction de NO implique des maladies neuro-dégénératives et l'ischémie cérébrale lors d'un dysfonctionnement de la nNOS.

Le présent mémoire comporte trois parties :

Le premier chapitre est présenté sous forme d'une revue bibliographique consacrée aux espèces oxygénées réactives (ROS), parmi elles le monoxyde d'azote, suivie d'une description des trois isoformes de l'oxyde nitrique synthase (NOS) et des analogues de L-arginine. Il sera également question du concept de bioisostérisme.

Dans le deuxième chapitre sera posé le formalisme du docking moléculaire *in silico* par la description des algorithmes de « searching » et des fonctions de « scoring ».

Dans le dernier chapitre de ce travail seront exposés les résultats obtenus lors de l'étude *in silico* de l'inhibition de la nNOS par les molécules élaborées par nos soins. Les structures conçues dans le cadre de concept « bioisostérisme » sont employées comme ligands et le docking est réalisé par le logiciel libre Arguslab 4.01. L'énergie libre (ΔG_{bind}) et les liaisons hydrogènes sont utilisées pour analyser les interactions entre nos dérivés et le site actif de nNOS. L'évaluation de leur activité se fait par l'expression du IC_{50} déduit de la régression linéaire induite par des grandeurs expérimentales.

Chapitre I:

Aspects chimiques de NO et biochimiques de la NOS

I-1 GENERALITES :**I-1-1 Stress oxydant :**

Dans l'ensemble de nos tissus sains les défenses anti-oxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance antioxydants/po-oxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution) ou d'une diminution des capacités anti-oxydantes, un déséquilibre entre production de radicaux libres et système de défense est à l'origine d'un état rédox altéré de la cellule appelé stress oxydatif [1]. Le stress oxydant sera aussi un des facteurs potentialisant la genèse de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires.

En cas de stress oxydatif une partie des radicaux échappent au système de contrôle et vont attaquer des cibles cellulaires.

I-1-2 Espèces réactives de l'oxygène :

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de cet atome et également d'autres composés non-radicalaires. Elles sont très réactives même si leur temps de demi-vie est très court [2]. Elles interagissent avec les molécules environnantes de leur site de formation. Parmi ceux-ci, peuvent être cités les radicaux peroxydes (ROO[•]), alcoxydes (RO[•]), superoxydes (O₂^{•-}) et hydroxydes (HO[•]).

A faible concentration, les ERO sont nécessaires dans de nombreux processus biochimiques tels que la signalisation intracellulaire [3], la différenciation cellulaire ou l'arrêt de croissance. Ils jouent également un rôle dans la défense immunitaire de l'organisme [4]. Cependant, s'ils sont présents en excès, ils vont attaquer certains constituants cellulaires, provoquant ainsi la peroxydation lipidique, l'altération de l'ADN ou encore la modification des protéines et des sucres [5]. Bien que toutes les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ne soient pas des radicaux libres, elles restent toxiques pour l'organisme. C'est le cas par exemple du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'acide hypochloreux (HOCl) qui, en se liant à d'autres composés peuvent devenir nocifs [6].

I-1-3 Radicaux libres :

Les radicaux libres (RL) sont des espèces chimiques indépendantes, atomes, molécules (ou leurs fragments), possédant un ou plusieurs électrons célibataires [7]. Cette propriété les rend réactifs et ils auront tendance à vouloir réagir avec d'autres molécules [1]. Les entités formées deviennent à leurs tours radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne. En toxicologie, les radicaux libres sont ceux qui existent dans un état libre et capables d'interagir avec différents cellules de tissus [8, 9, 10]. Ils peuvent être neutres, chargés positivement ou négativement. Leur réactivité est liée à la vitesse de réaction, à leur structure géométrique et à leurs propriétés orbitales [11].

Les radicaux libres (RL) sont produits naturellement par l'organisme mais de nombreux agents externes (tabac, pollution, produits chimiques...) favorisent leur accroissement. Tous ne sont pas toxiques, certains sont nécessaires au bon équilibre physiologique des organismes vivants, alors que d'autres peuvent agir comme signaux de transduction et de transcription génique [12, 13].

I-2 LE MONOXYDE D'AZOTE :

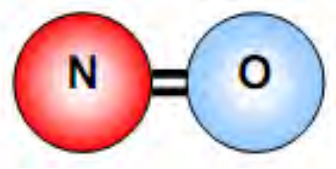
Le monoxyde d'azote exerce des rôles physiologiques particulièrement importants chez les mammifères en tant que messenger cellulaire et agent cytotoxique. Les pathologies liées à des dérèglements de la production de NO étant nombreuses, la recherche de nouveaux précurseurs de NO et d'inhibiteurs spécifiques de NOS constituent des enjeux pharmacologiques majeurs [14].

L'oxyde nitrique NO° est un composé radicalaire gazeux, de faible poids moléculaire, très diffusible à travers les parois cellulaires. En milieu aqueux, il a une demi-vie limitée à quelques secondes, de fait, il est rapidement converti en nitrite et nitrate, lesquels sont des produits stables de son métabolisme [15].

Le NO a été identifié vers 1980 par des chercheurs américains comme une molécule bioactive importante produite par les cellules des mammifères [16]. Cette découverte et les différents rôles que joue le NO en tant que médiateur chimique impliqué dans des processus biochimiques majeurs a valu en 1998, le prix Nobel de Médecine à Furchgott, Ignarro et Murad.

I-2-1 Structure et propriétés physico-chimiques de NO :

Dans les conditions normales de température et de pression, le monoxyde d'azote (NO) est un gaz incolore à l'état pur. NO est un radical constitué de deux atomes, l'un d'azote et l'autre d'oxygène, liés entre eux par une double liaison.



Notre organisme est exposé à deux sources de monoxyde d'azote, l'une exogène prévenant de la pollution atmosphérique et des fumées de cigarettes et l'autre endogène via la biosynthèse par voie enzymatique, ce sont les nitrique oxyde synthases qui produisent ce radical par catalyse de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline. Le NO a également une origine biologique, chez les microorganismes et les plantes ; le NO provient de la réduction du nitrite (NO_2^-) et du nitrate (NO_3^-) par les nitrites réductases et les nitrates réductases.

I-2-1-1 Propriétés de NO :

Sa solubilité dans l'eau est comparable à celle du monoxyde de carbone (CO) et de l'oxygène moléculaire (O_2). La charge nulle du NO le rend soluble dans les solvants apolaires, ce qui facilite sa diffusion au travers des membranes cellulaires. Le NO porte un électron célibataire lui permettant de réagir avec de nombreux composés radicalaires comme l'ion superoxyde et de générer des peroxydinitrites. Il possède également une très grande réactivité chimique avec d'autres radicaux libres et métaux de transition [17, 18].

I-2-1-2 Réactions avec l'oxygène moléculaire :

En solution aqueuse et en présence d'oxygène moléculaire, le radical NO peut générer plusieurs espèces chimiques (NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4). Toutefois, le NO est essentiellement dégradé en nitrites (NO_2^-) avec une proportion de nitrates (NO_3^-) d'environ 2%. Dans ces conditions, la demi-vie du NO est inversement proportionnelle à sa concentration [19].

I-2-2 Biosynthèse de NO :

Le NO constitue le premier exemple de gaz reconnu comme messager biologique. Il est généré par une famille d'enzyme, les NO synthase (NOS, EC 1.14.13.39). Ces dernières vont jouer le rôle de catalyseur dans l'oxydation de la L-Arginine en L-citrulline [20]. Cette réaction sera suivie d'un dégagement de NO.

La biosynthèse du NO nécessite de nombreux cofacteurs qui sont : la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), l'oxygène (O_2), la tétrahydrobioptérine (BH_4), le noyau hème (protoporphyrine IX de Fer), la flavine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD) [21]. La L-arginine (L-arg) est tout d'abord hydroxylée en N-hydroxy L-arginine (NOHA) en présence d' O_2 et de NADPH [22]. Cet intermédiaire est ensuite oxydé en L-citrulline (L-cit) par la réduction du NADPH induisant la libération de NO.

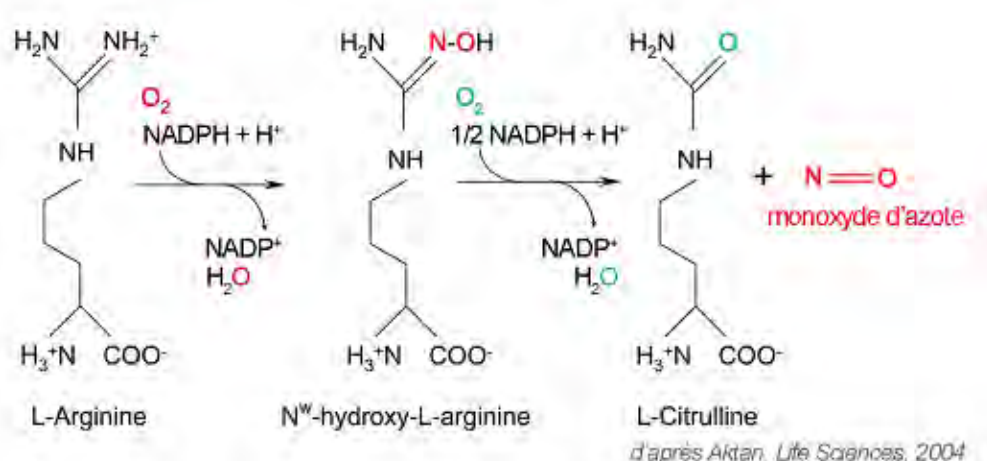


Figure I.2 : La réaction de synthèse du NO à partir de la L-Arginine [23].

Le NO peut être produit par les cellules endothéliales, les cardiomyocytes, le foie, le cerveau, les cellules musculaires, les macrophages, les plaquettes et le système nerveux périphérique [24] à partir de l'arginine et de l'oxygène, sous le contrôle enzymatique de la famille des synthases du monoxyde d'azote (NOS) [25]. Il existe trois isoformes principaux de NOS, qui proviennent de 3 types de gènes différents : la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS), et la NOS inductible (iNOS) [26]. La formation de NO diffère au gré de l'isoforme activé et provoque des effets différents selon le tissu impliqué.

I-3 STRUCTURE GENERALE DE NOS :

Les NOS de mammifères ont toutes la même structure. Elles sont actives sous forme de dimères, chaque monomère étant constitué d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase (Figure I.3).

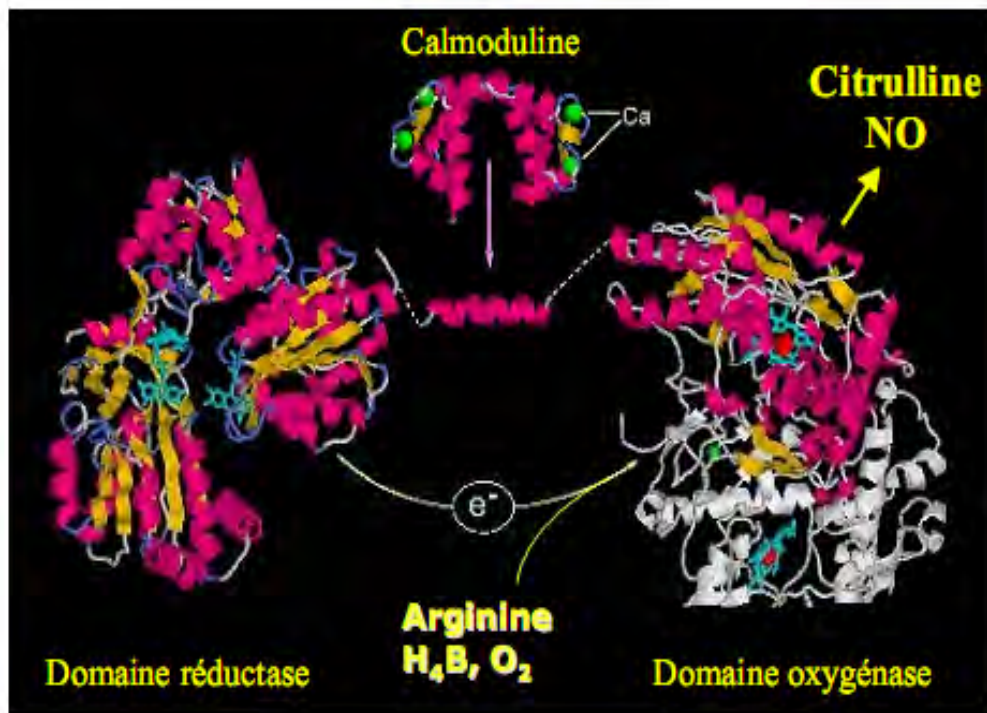


Figure I.3 : Représentation schématique d'un monomère de NO-synthase (adapté de la page internet de S. Daff, <http://ch-www.st-andrews.ac.uk/eastchem/profiles/ed/daff.html>).

I-3-1 Le domaine réductase (NOS_{réd}) :

Ce domaine représente la partie C-terminale de la NOS. Il possède différents sites de fixation (FMN, FAD, NADPH) et assure le transfert des électrons via le NADPH, vers le domaine oxygénase où se situe le site catalytique [27, 28, 29, 30].

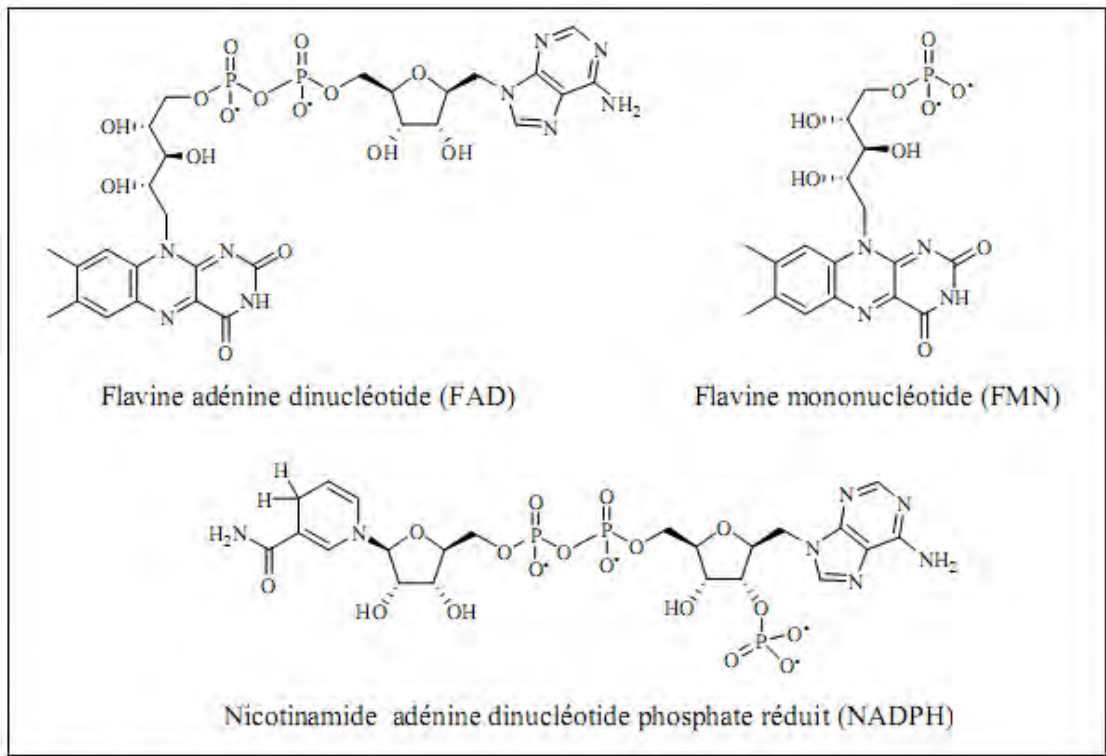


Figure I.4 : Cofacteurs du domaine réductase des NOS.

I-3-2 Le domaine oxygénase (NOS_{ox}) :

Le domaine oxygénase correspond à la partie N-terminale de la NOS. Il contient le site catalytique qui, lui est constitué de l'hème (une protoporphyrine de type IX avec un atome de fer au centre), du substrat L-arginine et du cofacteur (6R)-5,6,7,8-tétrahydrobioptérine (H₄B). L'hème est ancré dans la protéine par une cystéine qui sert de ligand proximal au fer [31, 32].

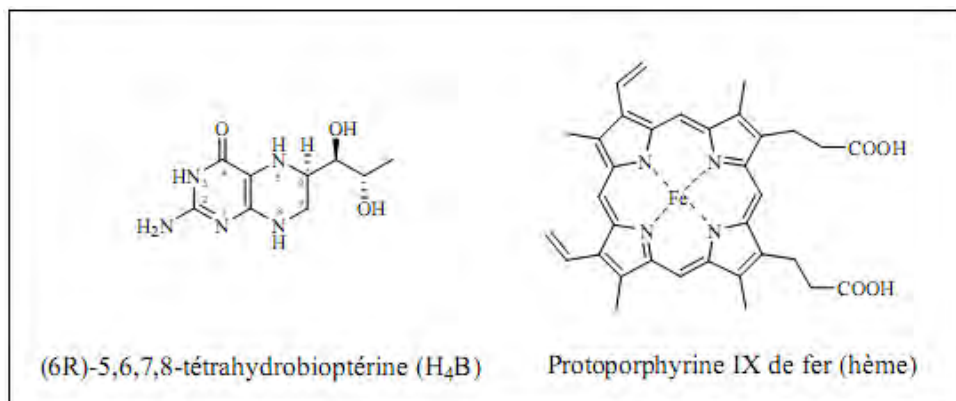


Figure I.5 : Cofacteurs du domaine oxygénase des NOS.

I-3-3 L'interdomaine :

NOS_{réd} et NOS_{oxy} sont reliées par un domaine d'une trentaine d'acides aminés permettant la fixation de la calmoduline (CaM) [33, 34] (**Figure I.3**). Cette petite protéine est un senseur (capteur, détecteur) de Ca²⁺ lorsque la concentration de ce dernier est suffisante. La fixation de la calmoduline à l'interdomaine permet le transfert des électrons de NOS_{réd} à NOS_{oxy} [35, 36].

I-3-4 Les dimères de NOS :

Pour la biosynthèse de NO, les NOS sont actives sous forme de dimères [37, 38]. La surface de dimérisation se situe au niveau de chacun des deux domaines oxygénases, avec en particulier une structure en lasso hélicoïdal qui interagit avec les cofacteurs H₄B et les extrémités N-terminales en forme de crochet de chaque monomère [39, 40]. La présence de l'hème dans chaque monomère est nécessaire à la dimérisation [41, 42], alors que celle du cofacteur H₄B et du substrat L-Arg la facilite et bloque l'enzyme dans sa conformation dimérique [43, 44].

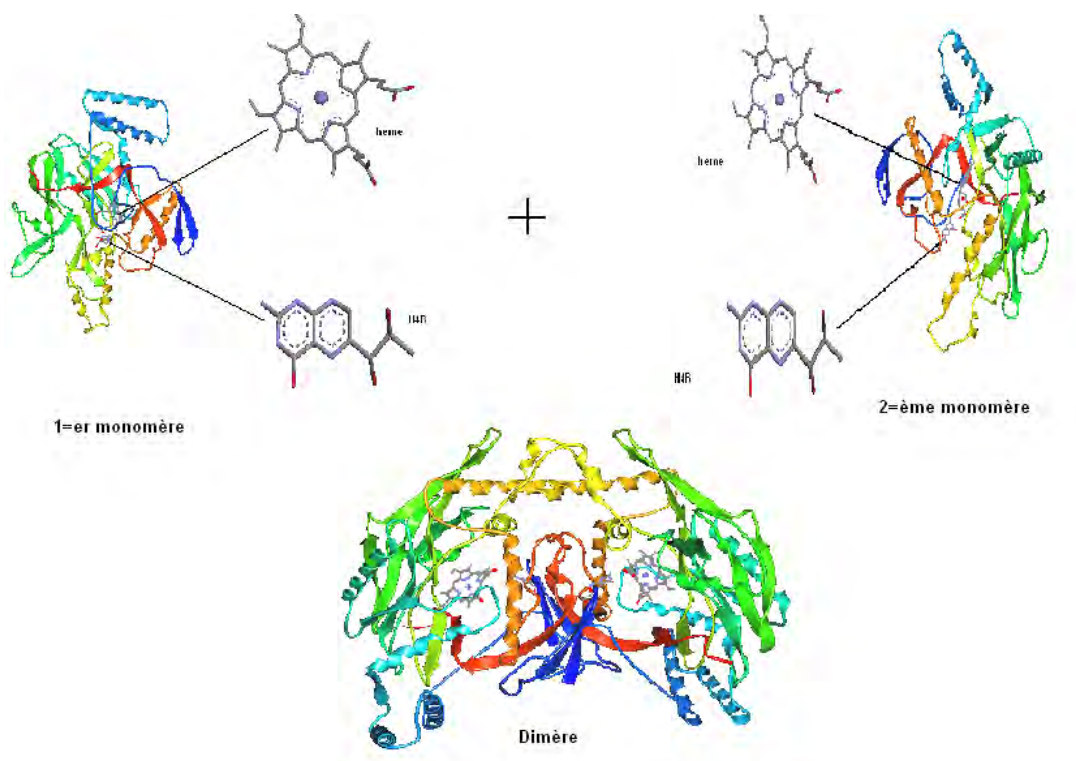


Figure I.6 : Représentation de la structure en dimère des monomères oxygénase.

Le transfert des électrons du domaine réductase au domaine oxygénase se fait préférentiellement de manière croisée (**Figure I.7**), c'est-à-dire que NOS_{réd} du monomère (1) transfère ses électrons à NOS_{oxy} du monomère (2), et que NOS_{réd} (2) donne ses électrons à NOS_{oxy} (1) [45].

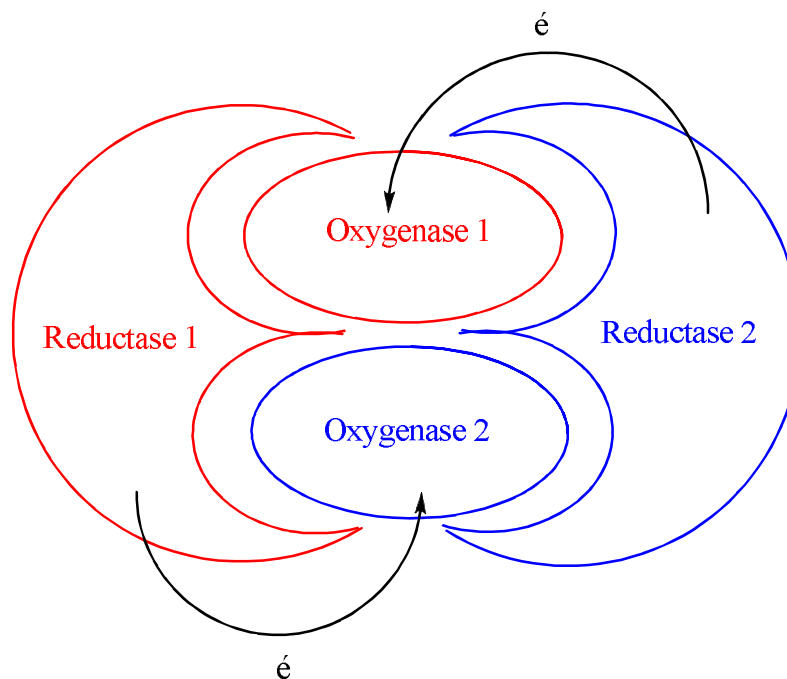


Figure I.7 : Illustration du transfert d'électrons croisé au sein d'un dimère de NOS.

I-3-5 Structure du site actif :

La dimérisation des domaines oxygénases des NOS permet de créer une cavité de $10 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA}$ environ pour le site actif au bout d'un canal d'accès qui débouche à la surface de la protéine au niveau de l'interface de dimérisation [28, 29]. La faible longueur du canal d'accès (seulement 30 \AA environ) permet une bonne accessibilité du site actif pour le substrat mais aussi pour de nombreuses autres molécules ou ligands.

I-3-5-1 Position de l'hème :

L'hème est fixé à la protéine principalement par le ligand cystéine, lui-même engagé dans une liaison hydrogène avec un tryptophane en interaction avec l'hème (**Figure I.8**). L'orientation de l'hème est telle que ses deux groupes propionates sont tournés du côté distal vers l'extérieur de la protéine et encadrent le canal d'accès au site actif.

I-3-5-2 Position du cofacteur H₄B :

Le site de fixation du cofacteur H₄B se situe à l'interface entre les deux monomères de NOS_{ox} : la structure aromatique de H₄B est prise en sandwich entre deux résidus aromatiques, le tryptophane (Trp467 dans la numérotation iNOS de souris) et phénylalanine (Phe470). La quasi-totalité des hétéro-atomes de H₄B sont engagés dans des liaisons hydrogènes avec les chaînes latérales ou le squelette des résidus environnants. L'interaction la plus importante est sans doute le réseau de liaisons hydrogènes qui relie le H₄B à un propionate de l'hème, et par cet intermédiaire au substrat L-Arg (**Figure I.8**).

I-3-5-3 Position de l'arginine :

Bien que la cavité du site actif soit largement ouverte sur le canal d'accès, la poche où se fixe le substrat est en fait assez petite et un important réseau de liaisons hydrogènes confine étroitement l'arginine dans une position précise. L'extrémité guanidinium de l'arginine est maintenue dans une position parallèle au plan de l'hème (légèrement décalée par rapport au fer), par trois liaisons hydrogènes, deux avec la chaîne latérale du glutamate Glu371 (numérotation iNOS de souris) et une avec le groupe carbonyle du résidu tryptophane Trp366. Le guanidinium de l'arginine établit aussi une liaison hydrogène avec une molécule d'eau très conservée parmi les différentes structures de NOS_{ox} disponibles (**Figure I.8(A)**).

Les structures de NOS obtenues en présence de NOHA [46, 47] ont montré que NOHA et L-Arg sont positionnées pratiquement de la même manière dans le site actif. La différence la plus notable est la liaison hydrogène supplémentaire que le groupe OH de l'hydroxy-guanidinium établit avec le résidu Gly365.

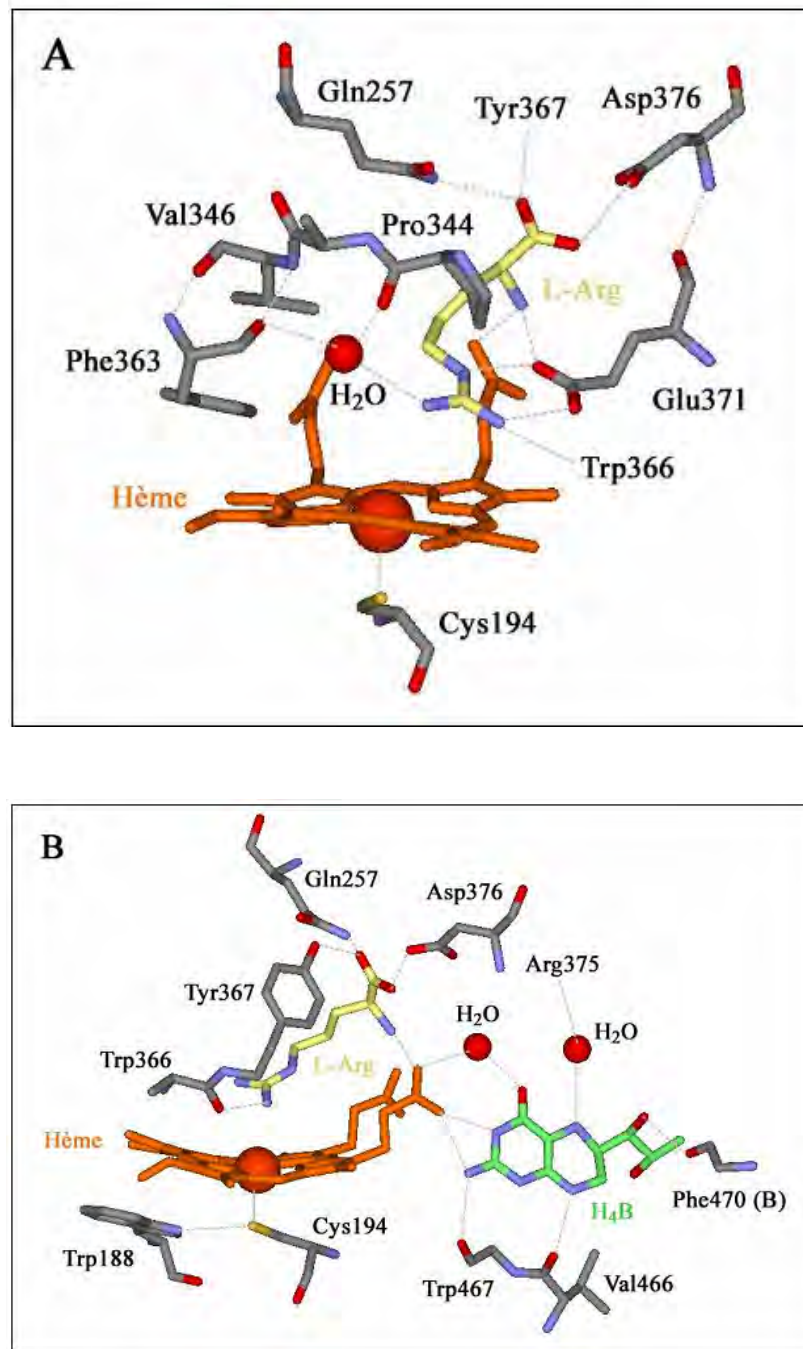


Figure 8 : Représentations « de face » (A) et « de profil » (B) du site actif des NOS (PDB : 1NOD, numérotation : iNOS de souris) avec les principales liaisons hydrogène entre les résidus du site actif (gris), l'hème (orange), le substrat L-arginine (jaune) et le cofacteur H₄B (vert). Tous les résidus représentés appartiennent au même monomère sauf le résidu Phe470 (B) qui appartient au deuxième monomère. Les deux molécules d'eau (rouge) représentées dans la vue B se situent dans le canal d'accès au site actif [14].

La stricte conservation des résidus impliqués dans le positionnement du substrat dans le site actif montre que l'emplacement précis de l'arginine au cœur de la poche du site actif des NOS joue un rôle prépondérant dans sa métabolisation en NOHA puis en NO. Des études par mutagenèse dirigée ont en particulier démontré que le résidu Glu592 (numérotation nNOS de rat) est absolument nécessaire à la reconnaissance et à la transformation de L-Arg par les NOS [48, 49]. Les résidus Val567 (orange), Tyr588 (rouge) et Arg596 se sont également révélés très importants pour l'activité catalytique des NOS [49, 50].

L'extrémité guanidinium de l'arginine est maintenue dans une position parallèle au plan de l'hème par deux liaisons hydrogène avec le Glu592 et une avec le Trp587 (numérotation de nNOS de rat), pendant que l'extrémité α -amino-acide est retenue par des liaisons hydrogène avec le Glu592, l'Asp597, le Gln478, le Tyr588 et avec un des propionates de l'hème (**Figure I.9**).

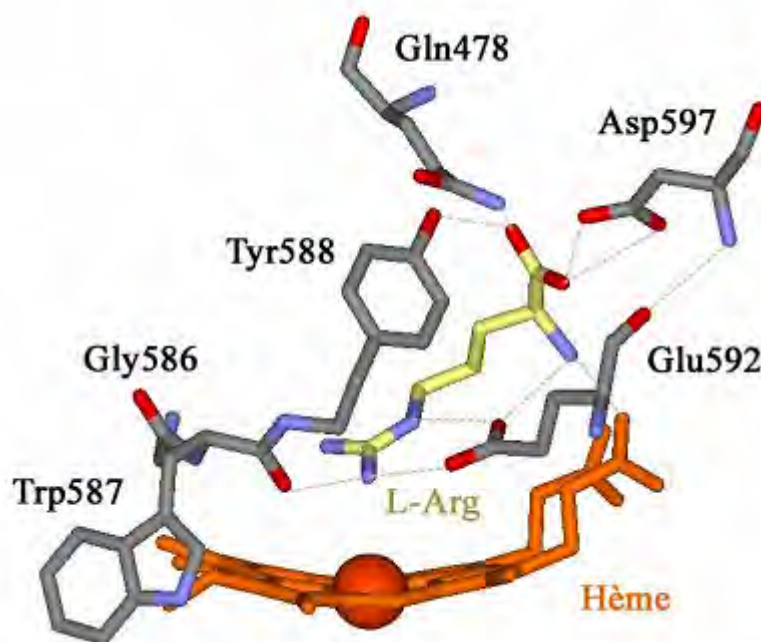


Figure I.9: Positionnement de l'arginine dans le site actif des NOS (nNOS de rat), représentation des principales liaisons hydrogène entre les résidus du site actif (gris), l'hème (orange) et le substrat L-Arg (jaune) [14].

I-4 DIFFERENTES ISOFORMES DES NOS :

Les trois isoformes des NOS (nNOS, eNOS, iNOS) sont exprimés, régulés et distribués de façon différente dans plusieurs organes et types cellulaires (**Tableau I.1**) où ils régulent plusieurs fonctions physiologiques et pathologiques via leur production de NO.

La forme neuronale des NOS (nNOS) est surtout exprimée dans les neurones où le NO dérivé agit comme neurotransmetteur dans les jonctions synaptiques [51]. La forme endothéliale des NOS (eNOS) est, comme son nom l'indique, presque exclusivement exprimée dans les cellules endothéliales où sa production de NO est impliquée dans la vasodilatation des vaisseaux sanguins. nNOS et eNOS sont exprimées de façon constitutive contrairement à la forme inducible des NOS (iNOS) qui n'est généralement pas exprimée en conditions basales dans la plupart des tissus. iNOS est surtout induite dans les cellules immunitaires où son NO a un rôle cytotoxique important et nécessaire pour la destruction des pathogènes [52].

Les trois isoformes catalysent une réaction d'oxydation menant à la production d'oxyde d'azote et de L-citrulline. Elles possèdent entre elles environ 60% d'homologie en acides aminés et leurs structures primaires sont semblables [53]. Elles sont caractérisées par des zones de haute similitude (domaine réductase en carboxy-terminal et un domaine oxygénase en amino-terminal), des structures protéiques analogues, des mécanismes enzymatiques comparables et des sites de fixation aux mêmes cofacteurs (flavines, NADPH, protoporphyrine IX de fer, BH₄ et la calmoduline) et substrat (L-arginine) [54, 55, 56]. Cependant, elles diffèrent les unes des autres par leur dépendance au Ca²⁺, leur expression et leur activité [56]. Les rôles physiologiques et pathophysiologiques de chaque isoforme sont également distincts.

Caractéristiques	Nnos	Enos	Inos
Synonyme	NOS-1	NOS-3	NOS-2
Chromosome	12	7	17
Poids moléculaire (kDa)	1434	1202	1153
Interactions	Zn ²⁺ , BH ₄ , CaM/Ca ²⁺ , FAD, FMN, hème, Cavéoline-1/3, Hsp90, Domaines PDZ	Zn ²⁺ , BH ₄ , CaM/Ca ²⁺ , FAD, FMN, hème, Cavéoline-1/3, Hsp90	Zn ²⁺ , BH ₄ , CaM/Ca ²⁺ , FAD, FMN, hème, Kalirin
Modifications covalentes	Phosphorylation	Phosphorylation, Myristoylation, Palmitoylation	Phosphorylation
Dépendance au Ca ²⁺	Oui	Oui	Non
Production de NO	+	+	+++
Principal lieu d'expression	Neurones	Cellules endothéliales	Macrophages

Tableau I.1 : Caractéristiques des isoformes de la NOS [57].

I-4-1 iNOS :

Cette protéine est surtout exprimée dans des cellules impliquées dans les processus inflammatoires et ceux de défense contre les infections. Pour preuves, elle a été purifiée et clonée à partir de macrophages de souris activés par des extraits bactériens [55]. La structure de iNOS est similaire aux deux autres isoformes mais présente certaines différences au niveau de sa régulation. Même si sa liaison avec la CaM est nécessaire pour son activité, sa production en

NO est indépendante du niveau intracellulaire de Ca^{2+} . Comme son nom l'indique, iNOS est une enzyme inductible qui n'est généralement pas exprimée en conditions basales dans tous les systèmes biologiques.

Habituellement absente des tissus sains, iNOS est plutôt induite pendant l'inflammation où elle produit une grande quantité de NO qui peut avoir à la fois des effets physiologiques et pathologiques [55]. Effectivement, elle a été identifiée dans les vaisseaux de patients souffrant d'athérosclérose et la formation de peroxy-nitrite semble être à l'origine de la peroxydation des lipides et des dommages vasculaires [58].

La protéine iNOS est exprimée seulement dans les macrophages, les leucocytes et les fibroblastes suite à une induction par des cytokines ou d'autres agents inflammatoires dans le seul but d'éliminer un agent délétère [53, 56, 59].

Chez l'humain, le gène codant pour la protéine iNOS est situé sur le chromosome 17 [60].

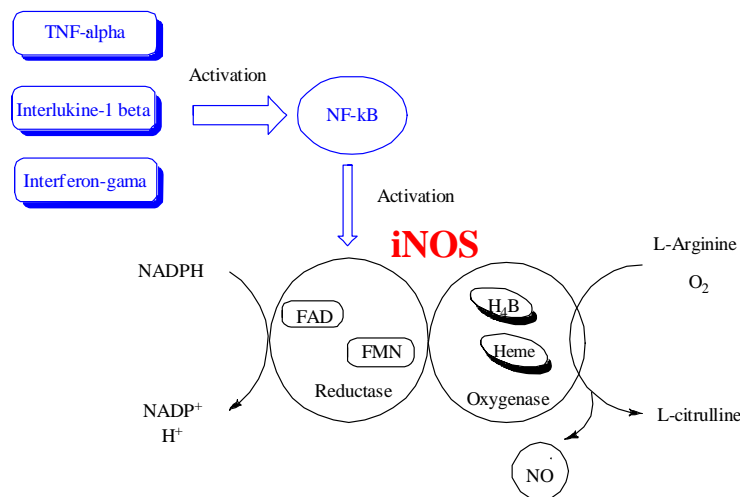


Figure I.10 : Nitric Oxide Synthase inductible (iNOS).

I-4-2 eNOS :

L'enzyme eNOS est exprimée de façon constitutive au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes dont elle représente la source principale d'oxyde nitrique [56]. La dépendance de la eNOS au Ca^{2+} est responsable de la production faible et transitoire de NO qui ne dépasse généralement pas l'ordre du nanomolaire [61].

Isolée à partir de l'endothélium vasculaire, à l'origine, la protéine eNOS peut être aussi présente dans les cardiomyocytes, les plaquettes, les cellules mésangiales rénales, les cellules

osseuses et les neurones de l'hippocampe, [53, 55, 59]. L'un de ses rôles est de réguler la pression sanguine en favorisant la vasodilatation des artères et artérioles de la microcirculation en réponse à certaines hormones. En effet, il a été observé que l'inhibition génétique et pharmacologique de eNOS provoque l'hypertension chez la souris et chez le rat [62, 63] alors que les souris surexprimant eNOS sont hypotensives [64]. L'action de eNOS est également diminuée dans d'autres pathologies vasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension et la dysfonction respiratoire où la diminution de la production de NO contribuerait à leur étiologie [65].

Chez l'humain, le gène codant pour la transcription et la synthèse de la protéine eNOS est situé sur le chromosome 7 et il code pour 1203 acides aminés [55, 60].

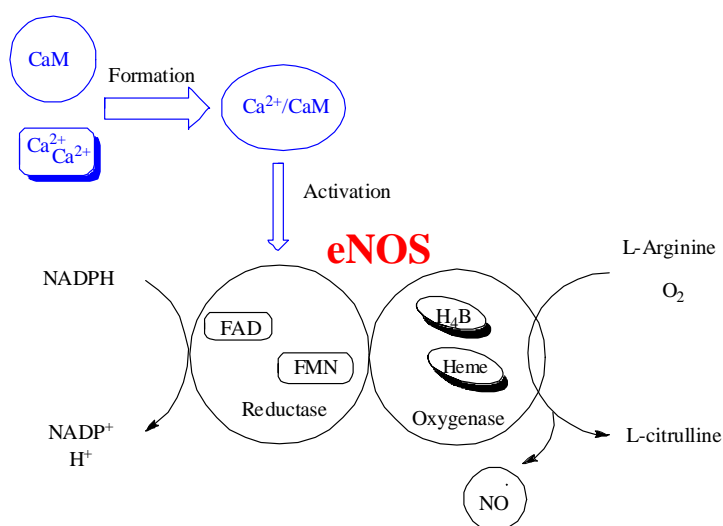


Figure I.11 : Nitric Oxide Synthase endothéliale (eNOS).

I-4-3 nNOS:

nNOS, cette enzyme constitutive est la première des trois isoformes à avoir été purifiée et clonée. Elle est surtout exprimée dans les systèmes nerveux central et périphérique mais reste la principale NOS retrouvée dans les neurones où le NO agit comme neurotransmetteur dans les jonctions synaptiques. nNOS est également distribuée dans d'autres tissus, tel le muscle squelettique où elle produit de l'oxyde nitrique qui joue un rôle dans la contraction et la transmission neuromusculaire [55, 66]. Dans le cœur, la production de NO par nNOS régule la bradycardie autonome en favorisant la relâche d'acétylcholine par les neurones du nerf vague [67]. Comme eNOS, nNOS est activée de façon dépendante du calcium se fixant à la

calmoduline et produit de faible quantité de NO (nM) suite à une élévation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} .

Chez l'humain, le gène codant pour l'enzyme nNOS est situé sur le chromosome 12 [55, 60].

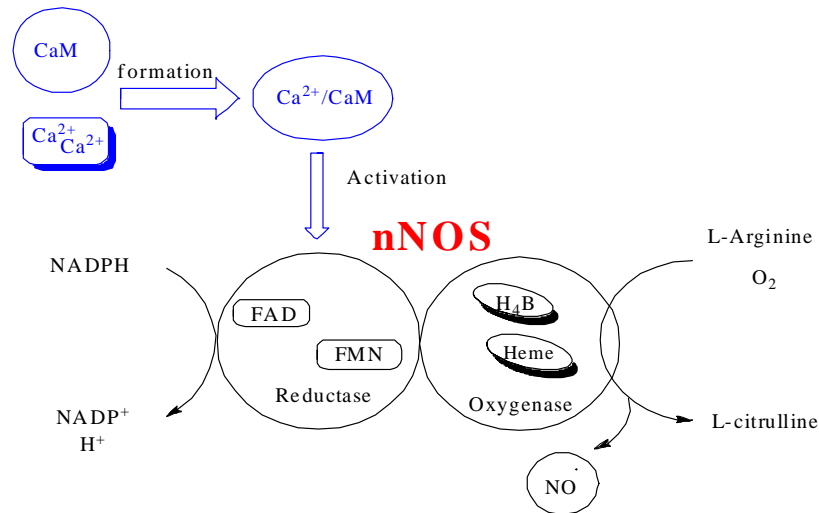


Figure I.12 : Nitric Oxide Synthase neuronale (nNOS).

I-5 INHIBITEURS DE LA NOS :

La découverte de pathologies liées à un dérèglement de l'activité de NOS constitue le point de départ de nombreuses études dont le but est de trouver des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme [23, 68].

Plusieurs centaines d'inhibiteurs de NOS sont décrits dans la littérature et présentent différentes sélectivités pour chacune des isoformes. La définition de la sélectivité peut être basée sur différents critères, mais l' IC_{50} reste encore le meilleur moyen pour comparer la sélectivité d'un inhibiteur envers ses différentes cibles. De cette façon, il a été proposé qu'un inhibiteur qui a une sélectivité de moins de dix fois pour une enzyme 1 comparée à une enzyme 2 est considéré comme «non-sélectif» pour ses deux enzymes; une sélectivité entre dix et cinquante fois définit un inhibiteur comme étant «partiellement sélectif» pour l'enzyme 1 et finalement un inhibiteur est «sélectif» s'il possède une sélectivité de plus de cinquante fois pour l'enzyme 1 comparée à l'enzyme 2 [69].

Trois grandes classes d'inhibiteurs ont été explorées. Les premiers sont des analogues de la L-arginine, comme les guanidines substituées, les amidines, les amino-guanidines, les

isothiourées, (L-N⁰-methylarginine, N⁰-diméthylarginine, L-N⁰-nitroarginine, L-N⁰-aminoarginine). Ils se positionnent dans le site de fixation du substrat et entrent en compétition avec lui [70, 71, 72, 73, 74]. Ces dérivés sont efficaces mais peu sélectifs. Ils sont surtout utilisés dans les études *in vitro* car *in vivo*, ils peuvent se révéler délétères [75, 76, 77]. Les deuxièmes, qui sont des analogues de H₄B (le 4-amino-H₄B, le H₂B, les dérivés du 7-nitroindazole) inhibent compétitivement le site de fixation de H₄B [28, 78]. Enfin, les derniers proviennent d'un transfert d'électrons et inhibent la flavine (diphénylèneiodonium), la calmoduline (trifluoroperazine) ou bloquent la formation des dimères de NOS (imidazolopyrimidines) [79, 80].

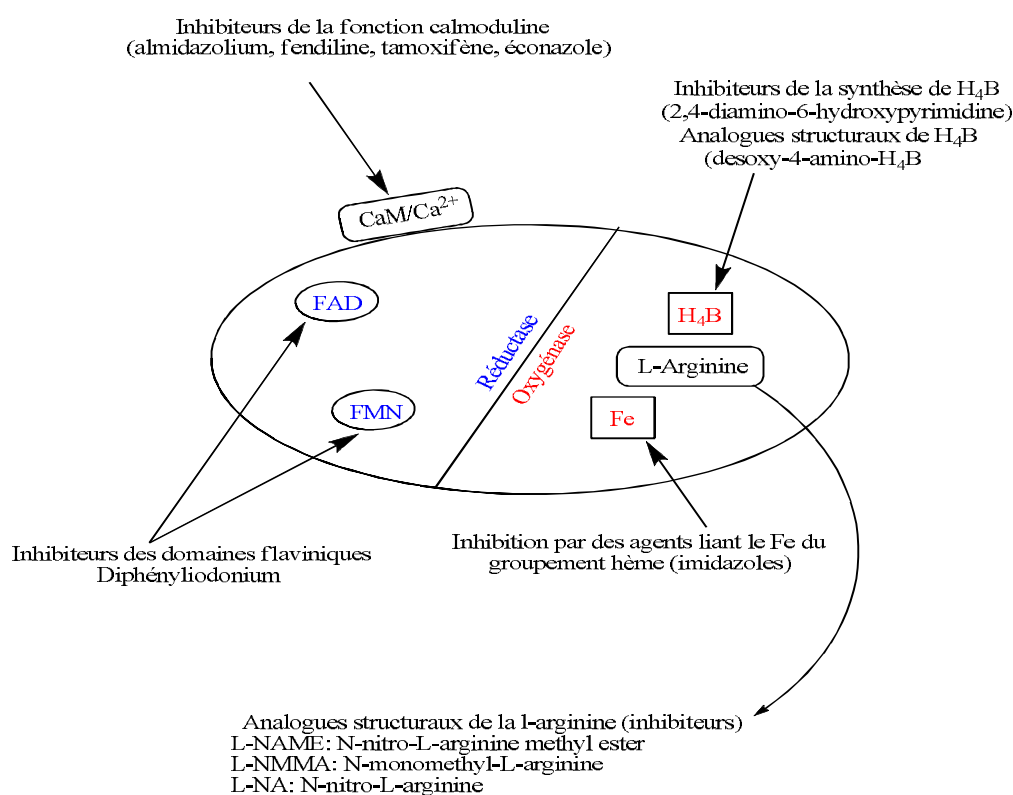


Figure I.13 : Différents types d'inhibition de l'oxyde nitrique synthase

I-5-1 Isostères :

Le terme 'isostère' fut proposé en 1919 par Langmuir pour désigner des molécules similaires ou encore les ions ayant le même nombre d'atomes ou d'électrons de valences. Plus tard Friedman introduisit le terme 'bioisostérisme' pour caractériser des structures ayant des propriétés chimiques et/ou physiques similaires ou antagonistes [81]. Le mot bioisostère

qualifie les substituants ou les molécules qui ont des propriétés chimiques et physiques équivalentes et produisent des activités biologiques similaires [82].

La recherche de bioisostères vise à améliorer l'activité pharmacologique des espèces chimiques ou à en réduire les effets toxiques.

Plusieurs paramètres sont à prendre en considération lors du remplacement d'un groupe fonctionnel par un autre : le volume occupé par la fonction chimique, sa forme (angle de liaison, hybridation de l'atome), la distribution électronique (polarisation, effets inductifs, charge, dipôles), la lipophilicité et l'hydrophilicité, la réactivité chimique ainsi que le caractère donneur/accepteur de ponts hydrogènes.

Les isostères se classent en deux catégories :

- ❖ Les classiques qui se répartissent selon divers types: atomes et groupes univalents, bivalents, trivalents, les atomes tétravalents et les anneaux équivalents (-CH=CH-, =N-, -O-, -S-, -CH₂-, -NH-) (**Tableau I.2**) [83, 84].

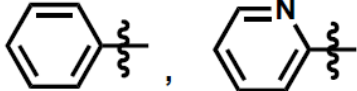
Isostères classiques	
Type d'atome/groupe	Exemple
Univalent	F et H NH ₂ et OH RSH et OH F, OH, NH ₂ et CH ₃ Cl, Br, I, SH et OH
Bivalent	O, S, Se, C=C, C=N, C=O, C=S, CH ₂ , NHR ₁ R ₂ ; CO ₂ R, COSR, COCH ₂ R, CONHR
Trivalent	-N=, -P=, -CH=
Tétravalent	carbone sp ³ , Si, N ⁺
Cycle équivalent	

Tableau I.2 : Isostères classiques

❖ Les non-classiques qui sont des molécules avec un nombre d'atomes différents mais des propriétés semblables, comme par exemple l'acidité (pKa) similaire de deux fonctions chimiques différentes (**Figure I.14**). Eux-mêmes se divisent en deux groupes :

- 1) Isostères cycliques et non cycliques
- 2) Groupement bioisostérisme est échangeable dont propriétés d'éléments utilitaires discrets sont imitées (**Figure I.15**).

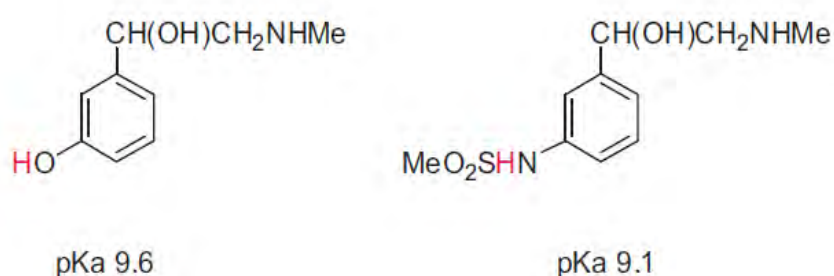


Figure I.14 : pKa de deux fonctions chimiques

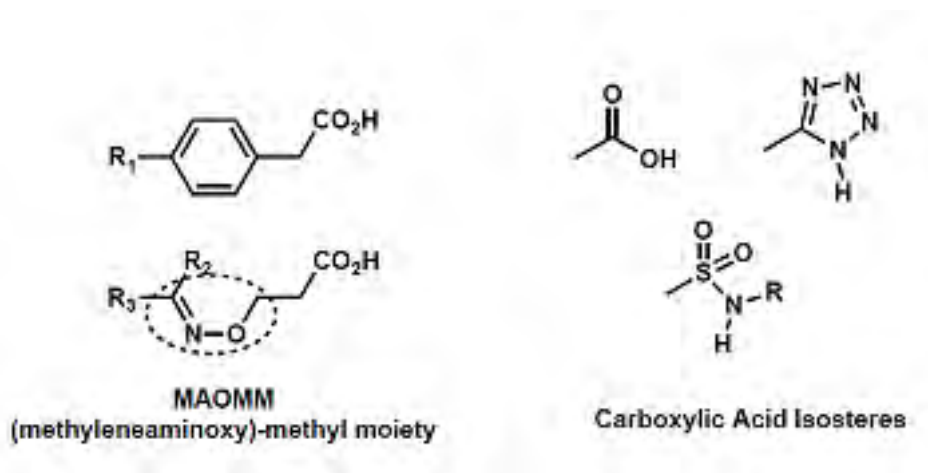


Figure I.15 : Bioisoteres de l'acide carboxylique.

Le bioisostérisme est une approche qui fait référence à la capacité de groupements fonctionnels, présentant des similarités en termes de taille, de forme et de distribution électronique, à pouvoir être échangés sans altération majeure de l'activité biologique d'une entité chimique.

I-5-2 Analogue de la L-arginine :

Un analogue d'une espèce chimique ne diffère de cette dernière que par la substitution d'un atome ou d'un groupe d'atomes par un autre. Il présente des propriétés physicochimiques et biologiques voisines de celle de la molécule de départ. Il peut résulter de l'application du concept de bioisostérisme.

La recherche de composés analogues est réalisée dans le but d'améliorer les interactions des ces derniers avec les cibles afin d'augmenter l'activité, la sélectivité et l'amélioration de la pharmacocinétique. Ils doivent être faciles à synthétiser. Les techniques utilisées dans l'élaboration de ce genre de composés sont le changement d'un substituant par autre, l'extension de la molécule, l'allongement/raccourcissement de chaînes, l'agrandissement/contraction de cycles, modification de la nature des cycles, l'accolement de cycles, la modification des isostères et la simplification de structure moléculaire.

L'arginine (Arg) est l'un des vingt principaux acides aminés naturels constitutifs des protéines. Elle se trouve sous sa forme chirale L-arginine. Son rayon de Van der Waals est égal à 148 Å.

L'arginine fut isolée pour la première des plants de lupin en 1886 par le chimiste suisse Ernst Schultze [85]. Elle est également dérivée de la guanidine, produite à partir du guano [86].

La chaîne latérale de l'arginine est constituée de trois carbones aliphatiques (hors le carbone α) à l'extrémité desquels se trouve un groupement guanidinium. Ce dernier avec un pKa de 12.48 [87] lui confère un caractère très basique [88]. Le cation guanidinium qui contient la fonction amidine joue un rôle important dans les interactions électrostatiques, accepteurs-donneurs de liaison H [89].

L'arginine est conditionnellement indispensable dans la synthèse du monoxyde d'azote, de la créatine (nutriment non indispensable mais substance essentielle au développement et au fonctionnement des muscles), de l'urée (comme un produit de dégradation de l'arginine) et de l'agmatine.

Il existe différents types analogues de la L-arginine parmi lesquels les guanidines substituées, les amidines, les amino-guanidines, les isothiourées, (L-N⁰-methylarginine, N⁰-diméthylarginine, L-N⁰-nitroarginine, L-N⁰-aminoarginine).

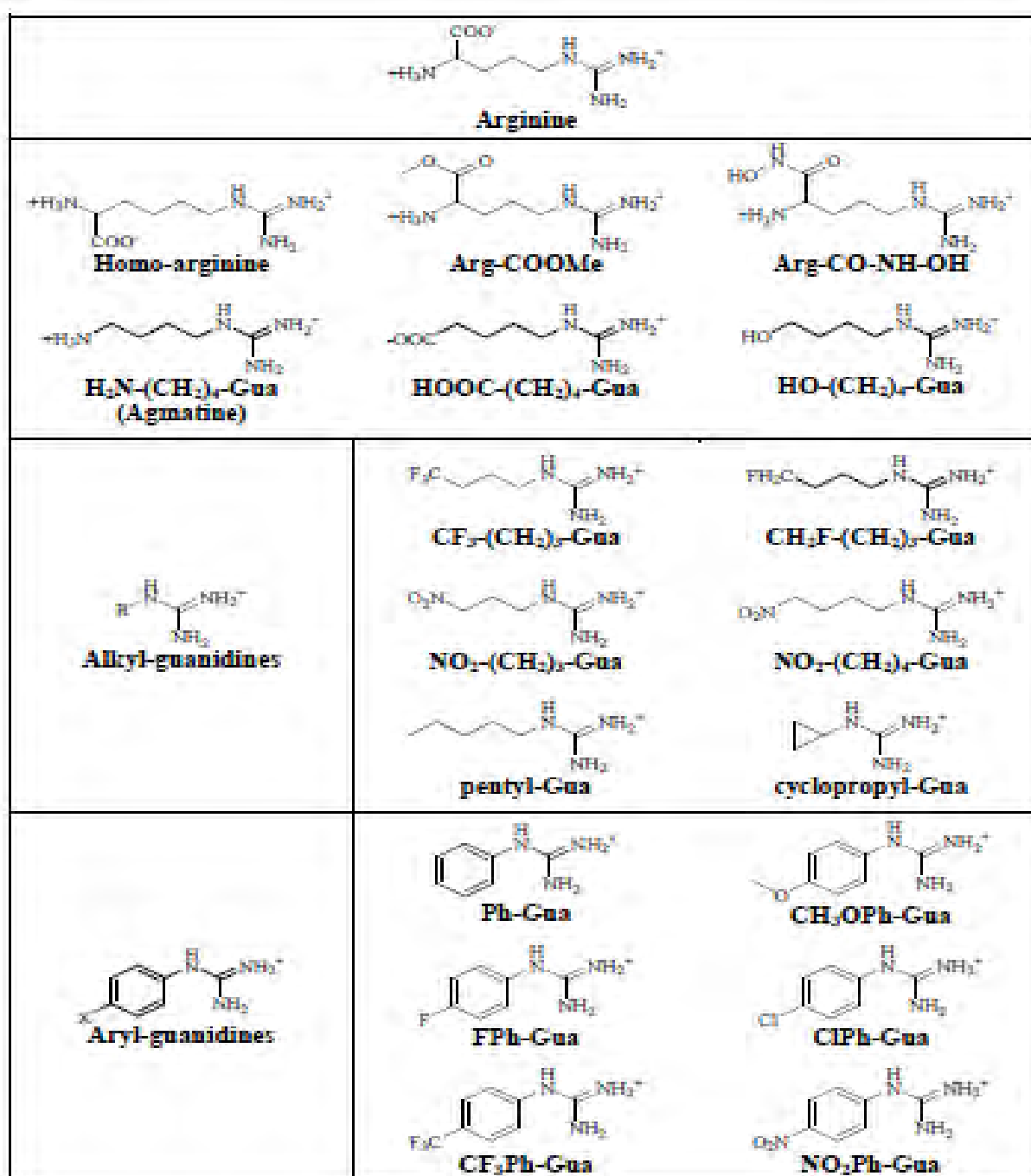


Figure 16 : Structure de la L-arginine et quelques analogues.

Chapitre II:

Modélisation moléculaire et docking

II-1 MECANIQUE MOLECULAIRE :

La chimie quantique est la détermination des différentes propriétés de la matière en utilisant comme base les principes de la mécanique quantique [1]. Elles sont basées sur les calculs de l'énergie des orbitales moléculaires (OM) dont la complexité augmente rapidement avec le nombre d'électrons.

La mécanique quantique n'étant pas appropriée pour simuler les gros systèmes comme les protéines ou les phénomènes qui surviennent à l'état liquide sur de longues échelles de temps, la mécanique moléculaire devient alors une approche importante et constitue un outil de choix pour l'étude des biomolécules, entre autre. Méthode empirique, elle s'appuie sur l'approximation de Born-Oppenheimer [2].

La mécanique moléculaire (MM) permet de minimiser l'énergie afin d'obtenir des conformations à basse énergie d'un système moléculaire et de réduire des forces initiales trop grandes qui aboutiraient à une trajectoire aberrante [3].

L'idée principale de cette méthode est d'établir par le choix des fonctions énergétiques et des paramètres qu'elles contiennent, un modèle mathématique qui représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle U_p en fonction de la géométrie moléculaire [4].

$$U_p = f(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)$$

où : \vec{r}_i représente le vecteur position de l'atome i.

La mécanique moléculaire utilise deux approximations principales :

Pour un grand nombre de cas, incluant la majorité des systèmes biomoléculaires, il est acceptable dans un premier temps d'ignorer la nature quantique des noyaux et supposer qu'ils se comportent comme des particules classiques mues par la loi de Newton $\vec{F} = m\vec{a}$ [2, 5]. Cela se traduit par l'utilisation de l'énergie cinétique classique et l'équation de Schrödinger (éq 1) pour les noyaux :

$$\left[-\frac{\hbar^2}{8\pi^2} \sum_n^M \frac{1}{m_n} \nabla_n^2 + U_{\text{élec}}(\vec{R}_n) \right] \Psi_n(\vec{R}_n) = U_{\text{noyaux}} \Psi_n(\vec{R}_n) \quad \text{éq 1}$$

devient :

$$\sum_n^M \frac{|\vec{P}_n|^2}{2m_n} + U_{\text{élec}}(\vec{R}_n) = U_{\text{noyaux}}(\vec{R}_n) \quad \text{éq 2}$$

où m_n est la masse du noyau n , P_n sa quantité de mouvement et $U_{\text{élec}}$ la surface de Born-Oppenheimer.

Les noyaux se déplacent dans un potentiel effectif électronique donné par la surface de Born-Oppenheimer $U_{\text{élec}}$. Comme il est beaucoup plus facile de résoudre un système d'équations différentielles ordinaires à conditions initiales qu'une équation aux valeurs propres, le problème est alors largement simplifié.

En second lieu, l'équation de Schrödinger électronique est remplacée par une fonction d'énergie potentielle qui conserve le comportement de $U_{\text{élec}}$, mais s'exprime par une fonction directe empirique et paramétrique [2].

II-2 LES INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES :

Les interactions qui régissent et stabilisent les structures tridimensionnelles des macromolécules sont généralement de diverses natures :

- Types électrostatiques lorsqu'elles concernent les interactions de type dipôle / dipôle permanent d'une part et les ponts salins d'autre part. Ces derniers, correspondent aux interactions entre régions chargées déterminées par les lois de l'électrostatique. A pH physiologique, les résidus chargés positivement sont les lysines, les arginines, certaines histidines et l'extrémité N terminale de la chaîne polypeptidique. Les résidus chargés négativement sont les aspartates, glutamates et l'extrémité C-terminale.
- Types Van Der Waals lorsqu'elles se rapportent aux nuages électroniques de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive pour des distances de 3-4 Å (ces forces comprennent une composante attractive à longue portée [force de dispersion de London] et une composante répulsive à très courte portée). De par leur grand nombre, ces interactions jouent un rôle important dans la stabilisation des complexes et favorisent leur compacité.

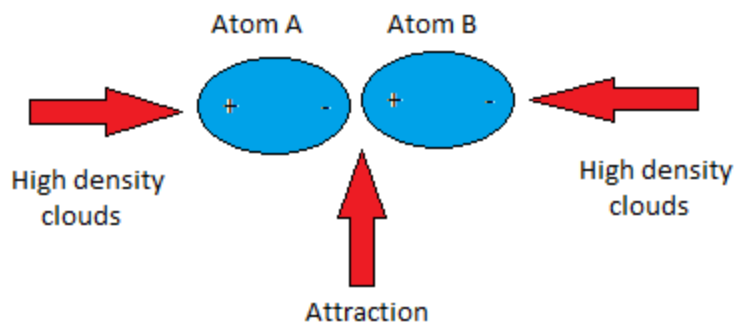


Figure II.1 : Les forces de Van Der Vaals.

- Types hydrogènes lorsqu'elles se forment de manière électrostatique entre un atome d'hydrogène(H), lié lui-même par covalence à un atome électronégatif (O, N, S) (donneur) et un atome électronégatif possédant une paire d'électrons non partagée (accepteur). Les liaisons hydrogènes sont plus fortes que les liaisons de Van der Waals ; leurs énergies sont estimées entre 3 et 9 kcal/mol. Les acides aminés polaires peuvent ainsi former des liaisons hydrogène entre eux ou avec des molécules d'eaux à très courte distance (0.8 à 2.8 Å). Les liaisons hydrogènes sont peu nombreuses et s'adaptent à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°).

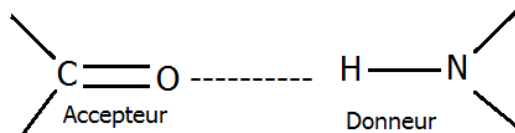
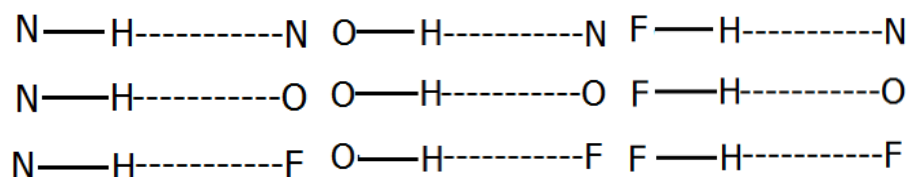


Figure II.2 : La liaison Hydrogène.

Les liaisons hydrogènes habituelles sont :



- De types hydrophobes et de solvatations lorsque les molécules non polaires tendent à se rapprocher les unes des autres afin de limiter les contacts avec l'eau, et créer entre elles des liaisons dites interactions non covalentes.

Les acides aminés hydrophobes composants les protéines ont des chaînes latérales non chargées et non polaires ; il s'agit de l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, le tryptophane et la méthionine. De même que les interactions de van der Waals, les effets hydrophobes sont responsables de la densité à l'interface dans les assemblages macromoléculaires.

II-3 MODELISATION MOLECULAIRE :

La modélisation moléculaire est un domaine scientifique multidisciplinaire : elle exploite des lois de la chimie, de la physique et de la biologie dans des programmes informatiques spécifiques afin de déterminer la structure et les propriétés d'entités chimiques et biochimiques (protéines, acides nucléiques, complexes moléculaires, solides, cristaux etc.). Le but de cette approche est la compréhension ou la prédiction des phénomènes auxquels s'intéressent ces disciplines [6].

La modélisation moléculaire permet de représenter le comportement des systèmes en simulant, à l'aide de fonctions semi-empiriques appropriées, les grandeurs réelles. Elle permet l'étude de systèmes beaucoup plus complexes qu'en mécanique quantique. Les différentes interactions des atomes entre eux et avec leur environnement sont décrits par un 'champ de force'. Il existe plusieurs méthodes pour modéliser le comportement d'une molécule et de son environnement : la minimisation d'énergie, la méthode de Monte Carlo (MC), la dynamique moléculaire (DM) [7].

La modélisation moléculaire s'est développée grâce à l'évolution de l'informatique qui a permis l'intégration de concepts de chimie théorique dans les algorithmes et le développement de machines capable d'exécuter les lourds calculs numériques requis et de stocker les données générées [8, 9, 10]. Utilisées dans le domaine du Docking, ces applications potentielles permettent l'étude au niveau atomique d'interactions entre deux entités moléculaires. Elles visent la prédiction de l'agencement le plus probable de ces dernières en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable [11].

II-4 DOCKING MOLECULAIRE :

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques, les identifier représente une étape importante dans la conception de composés pouvant être utilisés en thérapie. Cette information s'obtient directement par le docking (ancrage ou amarrage) qui est le nom donné aux simulations moléculaires dont lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire et d'une petite molécule [11, 12].

Le docking *in silico* rend possible l'identification des interactions qui existent dans l'entité constituée à partir d'une protéine et d'un ligand. Il vise à prédire le positionnement le plus probable en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable [11] (**Figure II.3**).

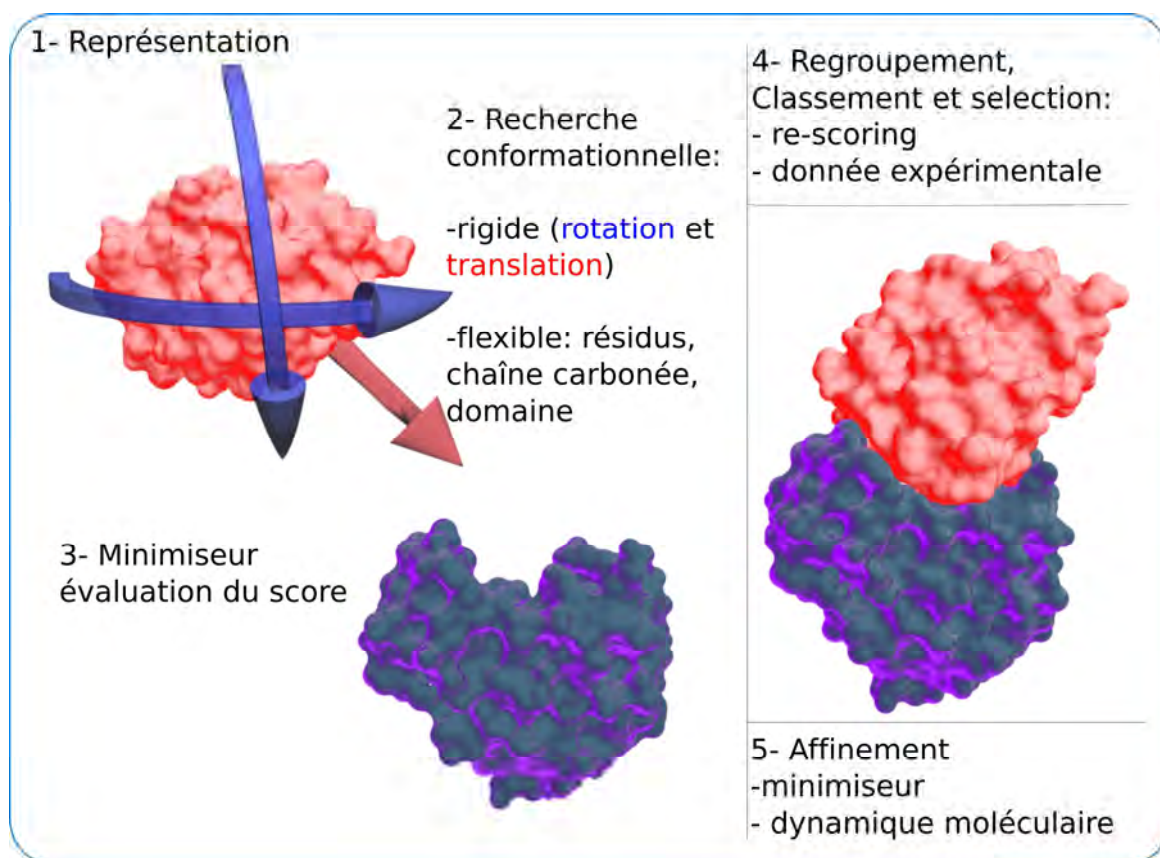


Figure II.3 : Représentation schématique d'un protocole de docking [13].

La plupart des programmes existants, essayent de déterminer la géométrie du complexe macromolécule-ligand. L'algorithme de base tient essentiellement en trois points :

- ✓ définir une géométrie du complexe
- ✓ évaluer la qualité de cette géométrie
- ✓ recommencer en classant les géométries

Le docking moléculaire permet l'étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes tels que : les interactions électrostatiques, de Van Der Waals et les liaisons hydrogènes.

Une simulation de Docking comprend essentiellement deux étapes le searching et le scoring. La première sert à trouver et sélectionner des géométries possibles pour le complexe en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine. Elle est utile pour échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) éventuelles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. Cette étape est le plus souvent exécutée de manière automatisée à l'aide d'un algorithme de Docking, ce qui améliore la vitesse et la précision des simulations. La seconde consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine dans chacun des complexes sélectionnés lors de l'étape précédente. Cette tâche est accomplie par des outils informatiques nommés fonctions de score. Celles-ci évaluent d'abord les différentes contributions énergétiques pour la stabilisation des complexes protéine-ligand, et les ordonnent ensuite, pour permettre l'identification des modes d'interactions les plus probables [11, 14].

Pour faciliter les calculs, la majorité des logiciels de docking ne prennent en compte que la flexibilité du ligand, la protéine est considérée entité rigide.

II-4-1 Searching:

Il existe plusieurs méthodes de recherche de l'espace conformationnel, celles basées sur la complémentarité géométrique d'une part et celles fondées sur la complémentarité atomique d'autre part. Elles utilisent différents algorithmes (Monté Carlo, recherche stochastique, exhaustive, construction incrémentale....etc) afin de trouver le meilleur positionnement du ligand au sein de la cavité enzymatique [15].

II-4-1-1 Méthode de Monte Carlo :

Dans sa forme la plus simple, le docking peut être réalisé manuellement, en utilisant un logiciel qui permet de manipuler les différents éléments du complexe. Cette approche peut se révéler efficace, pour peu qu'on dispose déjà d'informations réellement pertinentes sur le mode de liaison du ligand. Elle reste cependant risquée, car les expériences de diffraction de rayons X ont déjà prouvé que deux composés de structure très proche peuvent adopter des modes de liaison radicalement différents. La plupart du temps, une procédure informatique se révèle plus impartiale que le chercheur qui la met en œuvre et permet de mieux répondre à la multidimensionalité du problème, en considérant un plus grand nombre de possibilités [16].

Une simulation de type Monte Carlo repose sur la génération d'un nombre important de configurations selon un processus itératif, ainsi que sur l'utilisation de critères visant à accepter ou rejeter ces solutions. A chaque étape, une nouvelle hypothèse est générée en modifiant de manière aléatoire les degrés de liberté liés à la position, à l'orientation et à la conformation du ligand. La pertinence de cette configuration est évaluée grâce à une fonction de score, par exemple une énergie d'interaction. Si la nouvelle solution se révèle plus efficace que l'ancienne ($\Delta E < 0$), elle est automatiquement acceptée et devient la nouvelle hypothèse de référence. Dans le cas contraire, son acceptation dépend d'une probabilité calculée par analogie à une distribution de Maxwell-Boltzmann [16].

$$p(\Delta E) = \exp\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)$$

Un nombre aléatoire compris entre 0 et 1 est alors généré. S'il est compris dans la gamme de probabilité qui a été calculée, l'hypothèse est acceptée en tant que nouvelle référence. Dans le cas contraire, elle est définitivement rejetée. Cette règle de sélection est appelée « critère Metropolis ». Deux points importants peuvent être déduits de son expression :

- plus la différence d'énergie entre deux configurations augmente, plus la probabilité d'acceptation diminue.
- plus la température du système diminue, plus le critère de sélection se montre sévère.

II-4-1-2 Algorithmes évolutionnaires :

Les algorithmes évolutionnaires (AE) sont des méthodes d'optimisation génériques et itératives, reposant sur un processus adaptatif similaire à celui de l'évolution naturelle. Ils sont classés, avec les réseaux de neurones et les systèmes à logique floue, parmi les techniques d'intelligence artificielle. À l'inverse de la plupart des techniques d'optimisation, ils sont capables de gérer plusieurs solutions simultanément, regroupées dans une « population » (Figure II.5).

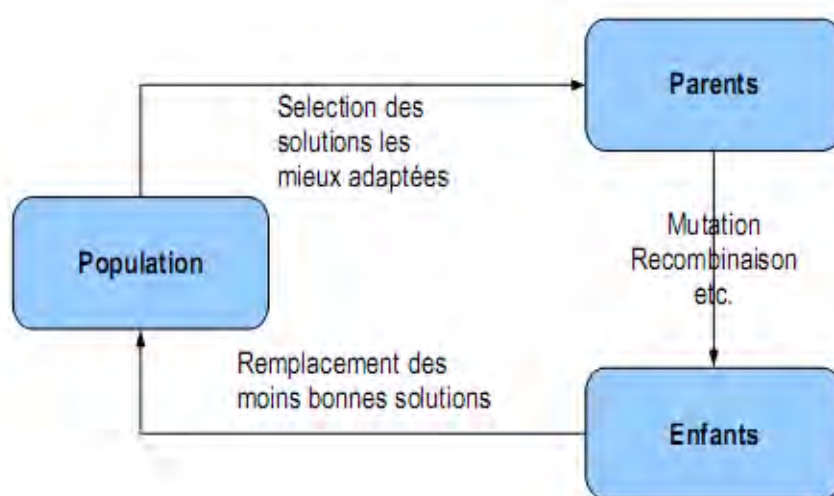


Figure II.5 : représentation schématique du cycle évolutionnaire d'un algorithme évolutionnaire.

Cette population est exposée à une pression de sélection, implémentée dans une fonction objective (fonction de score) qui décrit le problème à optimiser et dans laquelle plusieurs degrés de liberté (ddl) interviennent. L'ensemble des degrés de liberté permettant de définir une solution appelé « génome ».

La sélection des solutions les plus performantes d'après la fonction objective (appelées « parents ») est contrebalancée par la génération de nouvelles solutions « enfants », afin de maintenir la diversité de la population. Les enfants sont générés par modification du génome parental par des opérateurs, classés suivant le nombre de parents sur lesquels ils s'appliquent. Les opérateurs unaires sont appelés « mutations », les opérateurs binaires « recombinaisons ». Dans les AE Lamarckiens, une recherche locale supplémentaire est réalisée à proximité de tout génome nouvellement créé, de façon à ce que l'enfant correspondant se place dans un

minimum local pertinent. Une telle stratégie améliore sensiblement la recherche [17]. Cette astuce peut être vue comme des adaptations du phénotype introduites dans le génome.

Une fois les enfants créés, ils prennent la place des plus mauvaises solutions de la population. Cette dernière est ensuite de nouveau exposée à la pression de sélection implémentée par la fonction objective, et l'évolution continue par une nouvelle itération (génération). Au fur et à mesure des générations, des solutions de mieux en mieux adaptées au problème décrit par la fonction objective émergent. Ces étapes se poursuivent jusqu'à convergence de la population, ou après un nombre déterminé de générations. Appliquée au problème du docking, cette dernière cherche à décrire les interactions entre le ligand et le récepteur, et contient les degrés de liberté correspondant aux positions, orientations et conformations du ligand et du récepteur.

II-4-2 Scoring:

Une fois, le ligand placé dans le site actif du récepteur, une scoring function est appliquée pour identifier la meilleure conformation du complexe. Représentant le résultat de la prédiction de l'interaction protéine-ligand, elle est estimée à partir de diverses méthodes [18] et s'obtient par le calcul de l'énergie libre du complexe formé.

Les fonctions de score se classent en quatre familles : les empiriques, les *knowledge-based*, celles reposant sur des champs de force et celles basées sur des consensus.

II-4-2-1 Fonctions de score empiriques :

L'idée principale des fonctions de score empiriques est qu'on peut interpréter l'énergie d'interaction d'un complexe récepteur-ligand comme une sommation d'interactions chimiques localisées [19].

Les fonctions objectives empiriques somment en les pondérant des termes décrivant les différents types d'interactions moléculaires, comme les liaisons hydrogène, les interactions ioniques ou de Van der Waals [20, 21]. La pondération est généralement optimisée grâce à une base de données de complexes dont les structures et les énergies libres de liaisons sont connues.

II-4-2-2 Fonctions de score *knowledge-based*:

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes ligand-protéine déterminés de manière expérimentale. Des règles définissant la géométrie préférentielle des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques. Cette alternative aux fonctions empiriques est plus tolérante quant aux interactions présentes au sein du complexe et leurs expressions sont moins strictes [22, 23, 24, 25, 26].

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes ligand-protéine déterminés de manière expérimentale. Des règles définissant la géométrie préférentielle des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques. Cette alternative aux fonctions empiriques est plus tolérante quant aux interactions présentes au sein du complexe et leurs expressions sont moins strictes.

II-4-2-3 Fonction de score se basant sur les champs de force :

Le champ de force est une fonction mathématique qui exprime l'énergie d'un système par la somme de divers termes issus de la mécanique moléculaire. Grâce aux résultats des travaux de Kuntz de l'université de Californie [27], et ceux des groupes de recherche de Shoichet [28] et Abagyn [29] que le champ de force peut être utilisé comme fonction de score dans le calcul de l'énergie libre d'un système.

Ce type de fonction de score est similaire aux fonctions de score empiriques du fait que les deux évaluent l'énergie libre d'un complexe récepteur-ligand par addition des diverses contributions individuelles de chaque type d'interactions. La fonction de score « champ de force » [30] quantifie en général cette somme en deux termes, l'énergie d'interactions entre le récepteur et le ligand (interactions intermoléculaires) et l'énergie interne du ligand.

II-4-2-4 Fonctions de score consensus :

Ces fonctions consensus [31, 32], combinent les informations obtenues à partir des différents scores, afin de compenser les insuffisances des autres fonctions de score. Plusieurs études ont montré que les énergies libres des complexes sont performées par ces fonctions, ainsi les interactions protéine-ligand mieux que les fonctions individuelles [32, 33, 34]. Un exemple

de fonction de score consensus est X-CSCORE [35] qui combine un PMF [36, 37, 38], et ChemScore [39].

Aucune fonction objective n'est parfaite, mais l'utilisation combinée de plusieurs d'entre elles permet de réduire considérablement les modes d'interactions irréalistes qui peuvent avoir une énergie favorable selon l'une ou l'autre [40].

ArgusLab (<http://www.ArgusLab.com>) se base sur une description géométrique du système protéine-ligand. Le ligand flexible va subir plusieurs translations suivies de rotations pour trouver sa position optimale dans le site actif de la protéine qui est considéré rigide. Dans cette approche, l'évaluation de l'énergie du système protéine-ligand doit être calculée après chaque combinaison de translation-rotation du ligand.

Avec le code ArgusLab, [41] les conformations sont classées selon leurs énergies croissante par « Ascore » formulée à partir de l'équation suivante :

$$\Delta G_{\text{liaison}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hydrophobique}} + \Delta G_{\text{liaison-H}} + \Delta G_{\text{liaison-H(chg)}} + \Delta G_{\text{déformation}} + \Delta G_0$$

$$\Delta G_{\text{vdw}} = C_{\text{VDW}} \times \text{VDW}$$

$$\Delta G_{\text{hydrophobique}} = C_{\text{hydrophobique}} \times \text{HP}$$

$$\Delta G_{\text{liaison-H}} = C_{\text{liaison-H}} \times \text{HB}$$

$$\Delta G_{\text{liaison-H(chg-chg \& chg-neutre)}} = C_{\text{liaison-H(chg)}} \times \text{HB}$$

$$\Delta G_{\text{déformation}} = C_{\text{rotation}} \times \text{RT}$$

$$\Delta G_0 = C_{\text{régression}}$$

Chapitre III:

Résultats et discussion

III-1 INTRODUCTION :

La recherche de nouvelles molécules qui pourraient avoir un caractère inhibiteur vis-à-vis de nNOS, est basée sur la notion de bioisostérisme. L'évaluation de l'activité inhibitrice (théorique) de ces nouvelles molécules envers la nNOS, nécessite le calcul des IC_{50} . La détermination de ce paramètre passe par la corrélation qui existe entre ΔG_{bind} estimées par Arguslab 4.01 et les valeurs correspondantes des IC_{50} des analogues d'arginine synthétisés et testés *in vitro* par Erik et son équipe [1].

III-2 CHOIX DE LA PDB :

Afin de réaliser un docking où le *root mean squar deviatuon* (RMSD) est inférieur à deux, dix complexes sont tirés de la banque de donnée (www.PDB.org).

Les calculs sont effectués par le biais de deux algorithmes Argus dock et Gad dock appartenant au code ArgusLab 4.01. Chacun des deux diffèrent de l'autre par la manière de chercher le meilleur positionnement du ligand au sein du site actif de la macromolécule.

D'après les résultats obtenus (**Tableau III.1**), le RMSD qui correspond au critère est celui trouvé avec l'entrée 1LZZ et le docking de type Gad Dock.

Afin de confirmer le choix de 1LZZ, le redocking dans les mêmes conditions opératoires a été refait dix fois pour le ligand natif de cette structure.



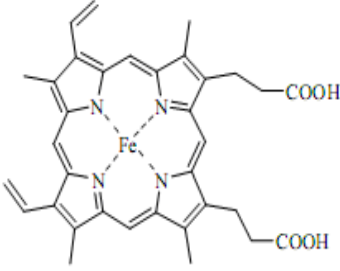
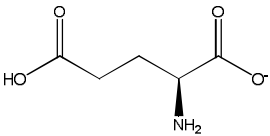
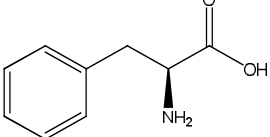
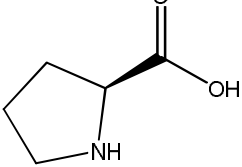
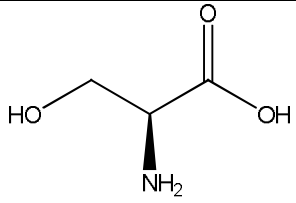
Figure III.1 : Redocking de la N-isopropyl-N'-hydroxyguanidine (IHG) dans la nNOS(1LZZ)

Complexe	RMSD (A°)	
	Argus dock	Gad dock
1K2R : structure of rat brain nNOS heme domain complexed with NG-nitro-L-arginine (NRG)	> 2	>2
1K2S : complexed with NG-allyl-L-arginine (ARV)	> 2	> 2
1ZZQ : complexed with L-N(omega)-nitroarginine-(4R)amino-L proline amide bound (DP9)	> 2	> 2
2HX3 : complexed with (4S)-N-{4-amino-5-[(2-aminoethyl)hydroxyamino]-pentyl}-N'-nitroguanidine (3HX)	> 2	> 2
3Q9A : structure of neuronal nitric oxide synthase in the ferric state in complex with N-5-[2-(ethylsulfanyl)ethanimidoyl]-L-ornithine (JM7)	> 2	> 2
1LZX : rat neuronal NOS heme domain with NG-hydroxy-L-arginine (HAR)	> 2	> 2
1LZZ : rat neuronal NOS heme domain with N-isopropyl-N'-hydroxyguanidine bound (IHG)	> 2	<2
1P6I : rat neuronal NOS heme domain with (4S)-N-(4-amino-5-[aminoethyl]aminopentyl)-N'-nitroguanidine bound (DP3)	> 2	> 2
1RS7 : rat neuronal NOS heme domain with D-phenylalanine -D-nitroarginine amide bound (D7P)	> 2	> 2
3JWT : structure of rat neuronal nitric oxide synthase heme domain complexed with 6-(((3R,4R)-4-(2-(3-fluorophenethylamino)ethoxy)pyrrolidin-3-yl)methyl)pyridine-2-amine	> 2	> 2

Tableau III.1 : Valeurs du RMSD pour les PDB en fonction de types de docking.

III-3 SITE ACTIF DE LA 1LZZ :

Le site Le site actif de l'entrée 1LZZ (rat brain neuronal NOS) est constitué d'acides aminés se trouvant à une distance de 3 Å du ligand d'origine qui est le N-isopropyl-N'-hydroxyguanidine (IHG) (Tableau III.2), (Figure III.2).

Résidu	Structure
Cofacteur protoporphyrine (750HEM)	
Glutamate (592GLU)	
Phénylalanine (584PHE)	
Proline (565PRO)	
Sérine (585SER)	

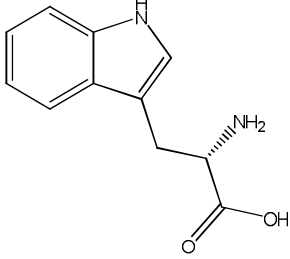
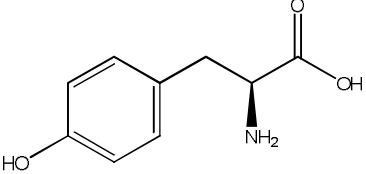
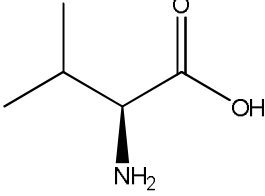
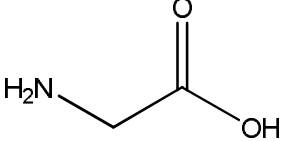
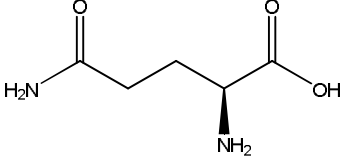
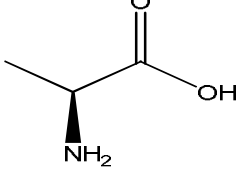
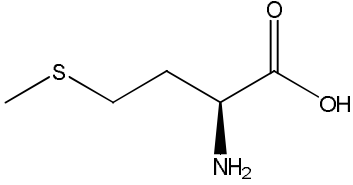
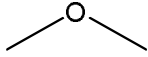
<p>Tryptophane (587TRP)</p>	
<p>Tyrosine (588TYR)</p>	
<p>Valine (567VAL)</p>	
<p>Glycine (586GLY)</p>	
<p>Glutamine (478GLN)</p>	
<p>alanine (566ALA)</p>	
<p>Méthionine (589MET)</p>	
<p>Eau H₂O</p>	

Tableau III.2 : différents résidus du site actif de la nNOS (PDB : 1LZZ).

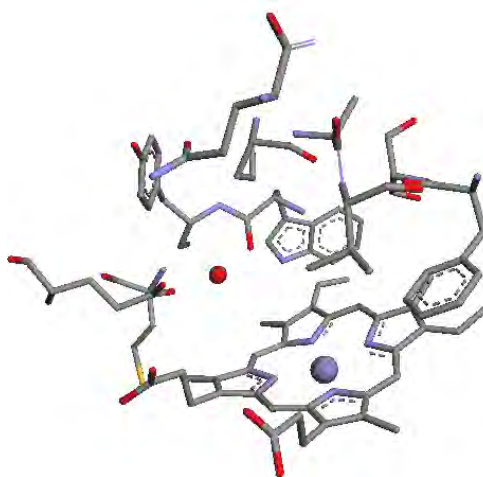


Figure III.2 : Représentation du site actif de la n NOS (PDB : 1LZZ).

III-4 CORRELATION $\Delta G_{\text{bind}}/IC_{50}$:

La relation entre IC_{50} et ΔG_{bind} des composés de référence, établie par la technique de régression linéaire, donne l'équation qui servira à prédire les IC_{50} des molécules élaborées à partir du concept de bioisostérisme. Deux formules sont proposées, une pour les molécules pourvues d'un groupement OH terminal (01) et l'autre pour celles possédant un NH_2 terminal (02).

$$IC_{50} = 1862.810 + 220.659 \Delta G_{\text{bind}} \quad (R^2 = 0.9560) \quad (01)$$

$$IC_{50} = 147.35 + 15.45 \Delta G_{\text{bind}} \quad (R^2 = 0.7195) \quad (02)$$

Les valeurs des différentes variables qui ont contribué à la corrélation sont rapportées dans les Tableaux III.3 et III.4.

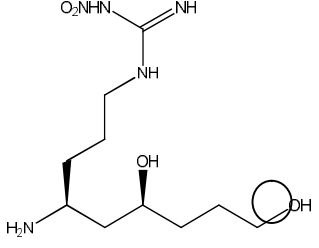
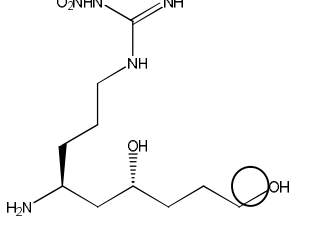
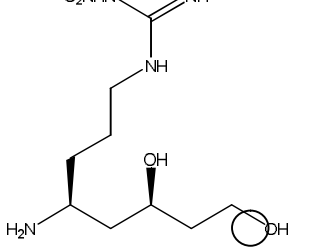
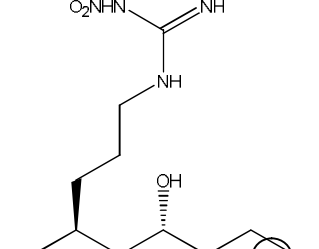
Structure	Nomenclature	IC ₅₀ exp (μM)	ΔG _{bind} (kcal/mol)
	1-((4S, 6S)-4-amino-6,9-dihydroxynonyl)-3-nitroguanidine	255	-7.4185
	1-((4S, 6R)-4-amino-6,9-dihydroxynonyl)-3-nitroguanidine	490	-6.2517
	1-((4S, 6R)-4-amino-6,8-dihydroxyoctyl)-3-nitroguanidine	106	-8.03091
	1-((4S, 6S)-4-amino-6,8-dihydroxyoctyl)-3-nitroguanidine	168	-7.44904

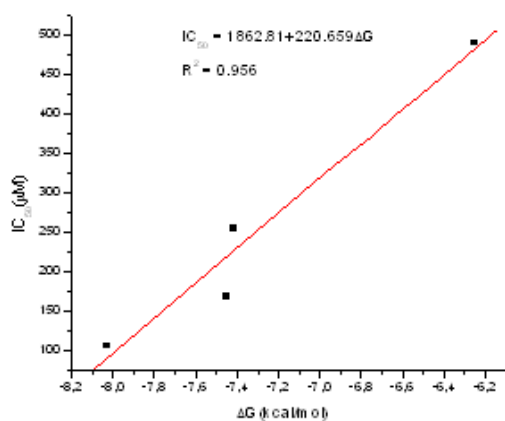
Tableau III.3 : Valeurs corrélation ΔG_{bind}/IC₅₀ (01).

Figure III.3 : Courbe de corrélation

ΔG_{bind}/IC₅₀ (01).

Structure	Nomenclature	IC ₅₀ exp(μM)	ΔG _{bind} (kcal/mol)
	1-((4S, 6S)-4,9-diamino-6-hydroxynonyl)-3-nitroguanidine	23.5	-8.35655
	1-((4S, 6R)-4,9-diamino-6-hydroxynonyl)-3-nitroguanidine	6.8	-9.12617
	1-((4S, 6S)-4,8-diamino-6-hydroxyoctyl)-3-nitroguanidine	2.4	-9.41184
	1-((4S, 6R)-4,8-diamino-6-hydroxyoctyl)-3-nitroguanidine	9.4	-8.50966

Tableau III.4 : Valeurs corrélation ΔG_{bind}/IC₅₀ (02).

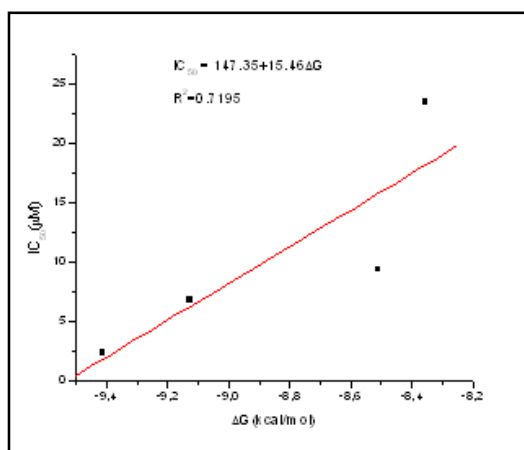


Figure III.4 : Courbe de corrélation $\Delta G_{\text{bind}}/IC_{50}$ (02)

III-5 ELABORATION DE NOUVELLES STRUCTURES :

Dans le cadre de cette étude le choix de la molécule référence s'est porté sur le composé (1-((4S, 6S)-4,8-diamino-6-hydroxyoctyl)-3-nitroguanidine) parce que ce dernier possède l'inhibition la plus importante [1]. La conception de nouvelles structures va se faire par une substitution où le groupement NH_2 terminal est remplacé par les bioisostères correspondants.

Molécule référence	Bioisostère		Nomenclature de nouvelles structures
		(A) R = H	1-((4S,6S)-6-amino-4-hydroxy-9-(3-nitroguanidino)nonylcarbamic acid
		(B) R = CH_3	Methyl(4S,6S)-6-amino-4-hydroxy-9-(3-nitroguanidino)nonylcarbamate
		(C) R = CH_2CH_3	N-((4S,6S)-6-amino-4-hydroxy-9-(3-nitroguanidino)nonyl)butyramide
		(D) R = H	(4S,6S)-6-amino-4-hydroxy-9-(3-nitroguanidino)nonylsulfurous acid
		(E) R = CH_3	methyl-6-amino-4-hydroxy-9-(3-nitroguanidino)nonylsulfite

		(F) R= CH ₂ CH ₃	ethyl-6-amino-4-hydroxy-9-(3-nitroguanidino)nonyl
	-NHCN	(G)	1-((4S,6S)-4-amino-9-cyanamido-6-hydroxynonyl)-3-nitroguanidine
	-CH(CN) ₂	(H)	1-((4S,6S)-4-amino-10,10-dicyano-6-hydroxydecyl)-3-nitroguanidine
	-CH ₃	(I)	1-((4S,6S)-4-amino-6-hydroxydecyl)-3-nitroguanidine
	-Cl	(J)	1-((4S,6S)-4-amino-9-chloro-6-hydroxynonyl)-3-nitroguanidine
	-F	(K)	1-((4S,6S)-4-amino-9-fluoro-6-hydroxynonyl)-3-nitroguanidine

Tableau III.5: Structures de molécules proposées.

III-6 CALCUL DES VALEURS DES IC₅₀ THEORIQUES :

Après une optimisation de géométrie avec le champ de force UFF (*universal force Field*), tous les ligands sont soumis à un docking dans le site actif de la nitrique oxyde synthase neuronale (nNOS). L'énergie du complexe (ΔG) est déterminée par la fonction de score et l'utilisation des deux équations de régression linéaire introduites précédemment, ont permis de déduire le IC₅₀ de nos molécules. Tous les résultats sont exprimés dans les deux tableaux (Tableau III.6 et Tableau III.7)

Molécule	ΔG (kcal/mol)	IC ₅₀ théo (μM)
A	-7.03019	311,533
B	-7.46301	216,029
C	-7.77650	146,854
E	-6.97988	322,636
F	-6.88975	342,524
H	-6.30506	471,542

Tableau III.6 : Correspondance IC₅₀ théorique/nouvelles structures (01).

Molécule	ΔG (kcal/mol)	IC ₅₀ théo (μM)
D	-9.07133	7,198
G	-8.62496	14,094
I	-9.44735	1.388
J	-9.01940	8.0003
K	-8.27217	19.545

Tableau III.7 : Correspondance IC₅₀ théorique/nouvelles structures (02).

III-7 INTERACTIONS LIGANDS-1LZZ :

III-7-1 Complexes (A, B, C)-1LZZ :

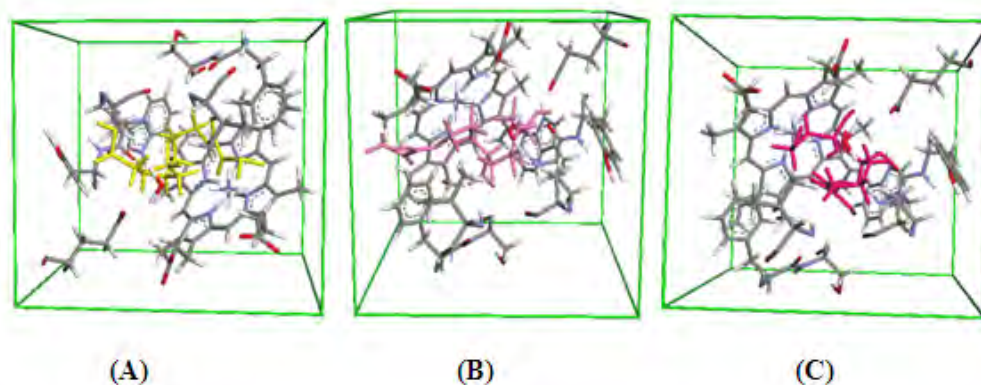


Figure III.5 : Positionnement des molécules (A, B, C) dans le site actif de la 1LZZ

Dans les trois complexes, le ligand est orienté de la même manière au sein du site actif de l'enzyme.

Du point de vue énergétique, la molécule C forme le complexe le plus stable avec un ΔG égale à -7.77650 kcal/mol. Elle présente donc un caractère inhibiteur plus prépondérant par rapport aux deux autres composés A et B.

III-7-1-1 Complexe A-1LZZ :

Dans les complexes A-1LZZ et B-1LZZ, des liaisons hydrogènes sont établies, quatre pour le premier et trois pour le second. Les principaux acides aminés responsables de la formation de ces interactions sont présentés dans les **Tableaux III.8 et III.9** et schématisés sur la **Figure III.6**.

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å°)	Atome du ligand	Résidu	Type d'interaction	Distance (Å°)
NH	584PHE	2.938352	N	567VAL	Polaire	1.791999
NH	592GLU	2.880506	N	584PHE	Polaire	2.396719
OH	566ALA	2.968226	C	584PHE	Polaire	1.827545
OH	478GLN	2.025519				

Tableau III.8 : Liaisons hydrogènes dans le complexe A-1LZZ

Tableau III.9 : Principales interactions dans le complexe A-1LZZ

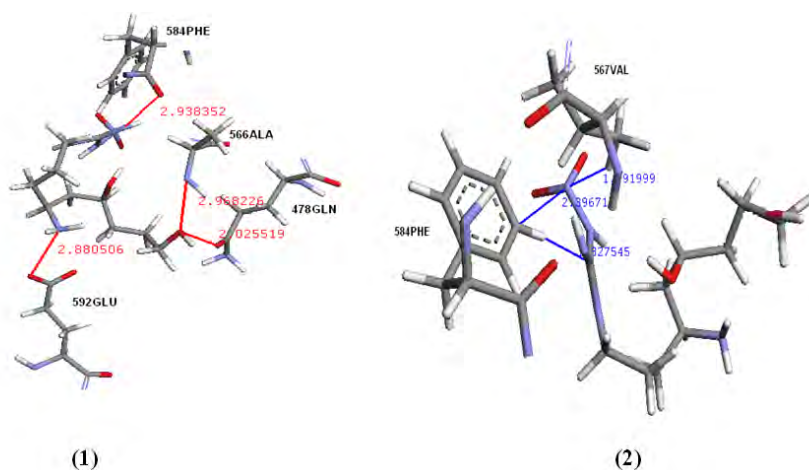


Figure III.6: Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule A.

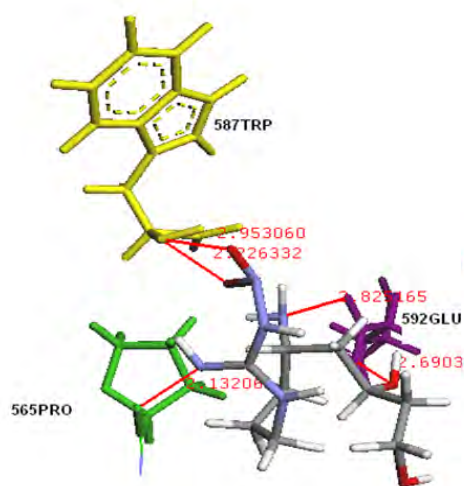
III-7-1-2 Complexe B-1LZZ :

Le ligand B forme trois liaisons hydrogènes dont deux par le biais du groupement hydroxyle. La troisième est la plus longue formée à partir du groupement NH. La stabilité de ce complexe est aussi due aux interactions polaires et une hydrophobique. L'hème joue un rôle important dans la formation de ces interactions (**Tableau III.10 et Tableau III.11**) (**Figure III.7**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)	Atome du ligand	Résidu	Type d'interaction	Distance (Å)
OH	592GLU	2.712910	N	750HEM	Polaire	1.958191
OH	587TRP	2.238320	C	750HEM	Polaire	2.437812
NH	586GLY	2.862501	C	750HEM	Hydrophobique	2.680796
			C	584PHE	Polaire	2.094347
			C	565PRO	Polaire	2.168695

Tableau III.10 : Liaisons hydrogènes dans

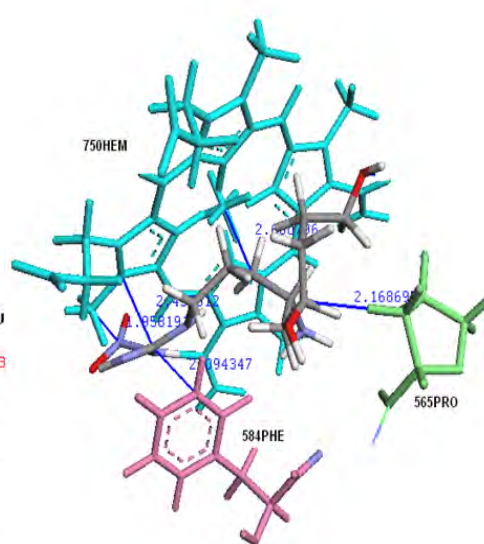
le complexe B-1LZZ



(1)

Tableau III.11 : Principales interactions dans

le complexe B-1LZZ



(2)

Figure III.7: Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule B.

III-7-1-3 Complexe C-1LZZ :

La molécule C établit avec l'enzyme cinq liaisons hydrogènes, dont deux avec le GLU, deux autres avec le TRP et une avec le PRO (Tableau III.12) (Figure III.8).

D'autres interactions sont mises en jeu lors de la formation des complexes moléculaires (A, B, C)-1LZZ. Elles sont de type polaire et hydrophobe.

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)	Atome du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å)
OH	592GLU	2.690354	N	750HEM	Polaire	2.297257
NH	592GLU	2.825165	C	565PRO	Hydrophobique	2.498714
NH	565PRO	2.132061	C	567VAL	Polaire	2.047297
NO	587TRP	2.226332				
NO	587TRP	2.953060				

Tableau III.12 : Liaisons hydrogènes dans le complexe C-1LZZ

Tableau III.13 : Principales interactions dans le complexe C-1LZZ

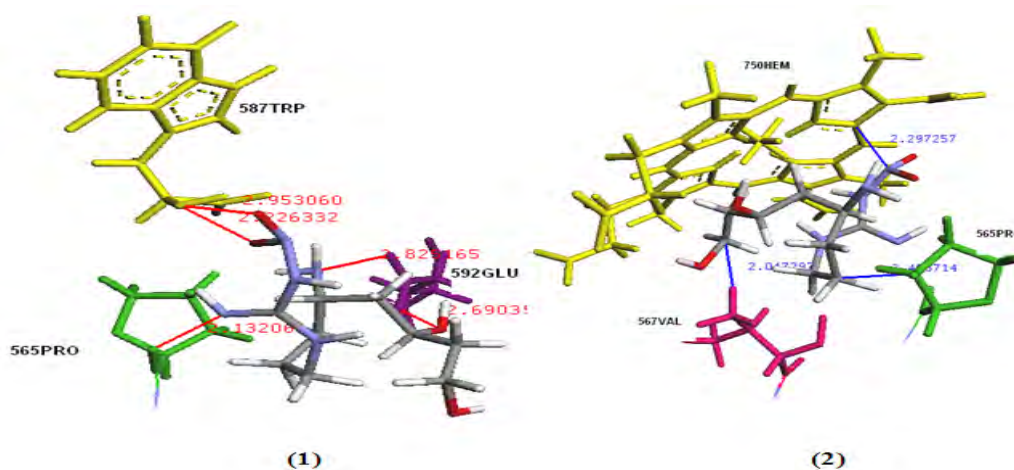


Figure III.8: Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule C.

III-7-2 Complexes (D, E, F)-1LZZ :

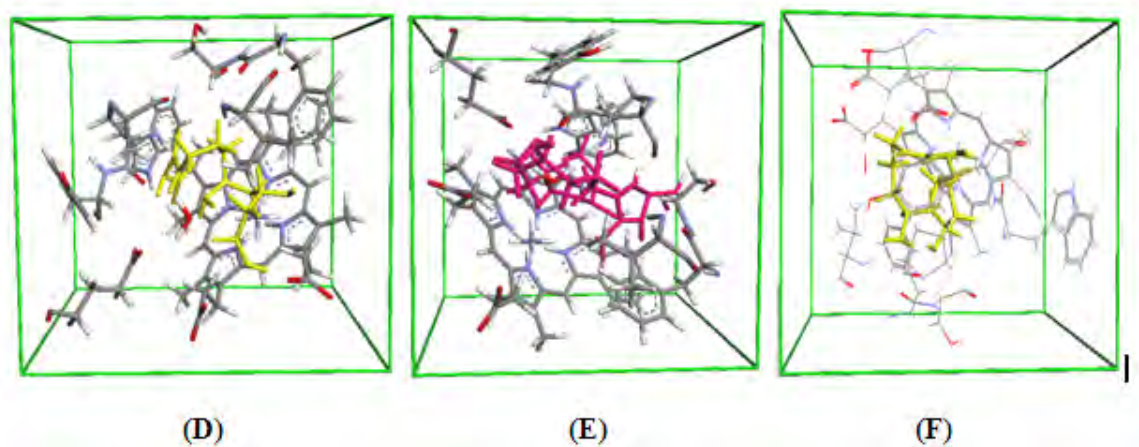


Figure III.9 : Positionnement des molécules (D, E, F) dans le site actif de la 1LZZ.

La molécule D (-9.07133 kcal/mol) forme le complexe le plus stable par rapport à ces homologues E et F (-6,97988 kcal/mol et -6,88975 kcal/mol respectivement).

Le réseau des liaisons hydrogènes établies lors de la formation de ces trois complexes est représenté dans les **Tableaux III.14, III.16 et III.18** et schématisé sur les **Figures III.10, III.11 et III.12**.

III-7-2-1 Complexe D-1LZZ :

L'hème de la nNOS et le groupement OH de la molécule D forment une liaison hydrogène à une distance de 2,92 Å. Cette dernière ne se trouve pas dans les deux autres complexes.

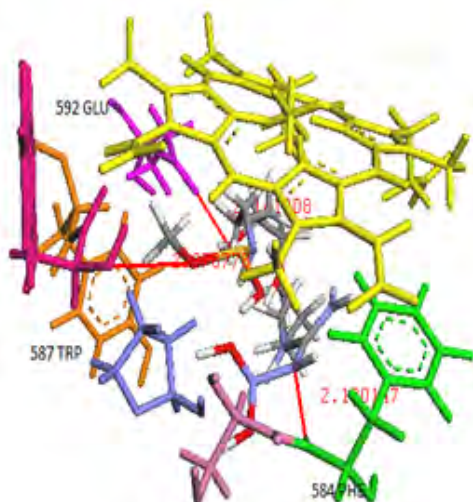
La formation de ce complexe est aussi assurée par deux interactions polaires avec l'acide aminé PRO et une hydrophobique avec VAL. Dans le **Tableau III.15** et la **Figure III.10 (2)** sont résumées les principales interactions.

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
NO	587TRP	2.954539
NH	565PRO	2.073873
OH	750HEM	2.921952

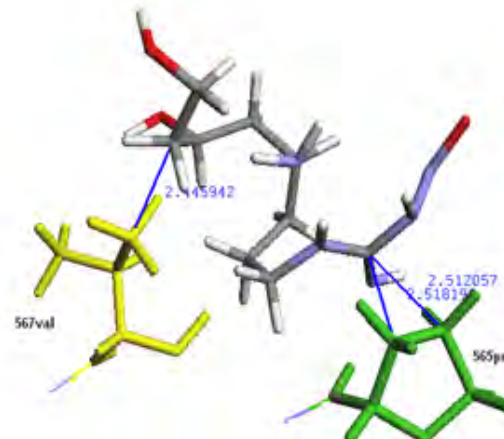
Atome du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å)
C	565PRO	Polaire	2.512057
C	565PRO	Polaire	2.518198
C	567VAL	Hydrophobique	2.445942

Tableau III.14 : Liaisons hydrogènes dans le complexe D-1LZZ

Tableau III.15 : Principales interactions dans le complexe D-1LZZ



(1)



(2)

Figure III.10 : Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule D.

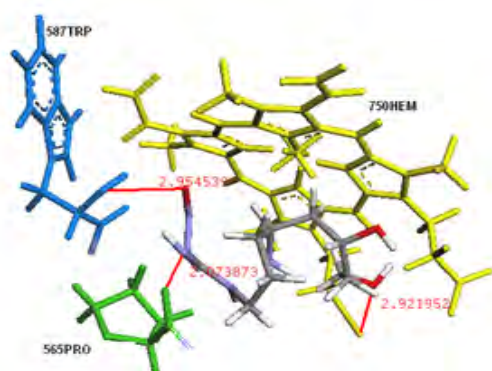
III-7-2-2 Complexe E-1LZZ :

Avec une énergie de -6,979 kcal/mol, ce complexe est moins stable que celui formé par la molécule D. Trois interactions le caractérisent, deux hydrophobiques sont établies entre l'hème de la macromolécule et le ligand E et une polaire générée avec le résidu PHE.

Les groupements NO et OH de la molécule créent chacun respectivement une et deux liaisons hydrogènes.

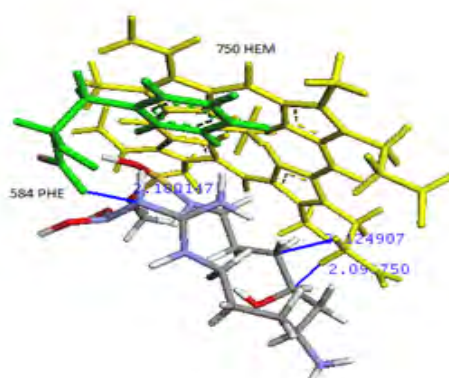
Atome du ligand	Résidu	Distance (Å°)	Atom e du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å°)
NO	584 PHE	2.188147	N	584PHE	Polaire	2.180147
OH	587TRP	2.978778	C	750 HEM	Hydrophobique	2.091750
OH	592 GLU	2.141808	C	750 HEM	Hydrophobique	2.124907

Tableau III.16 : Liaisons hydrogènes dans le complexe E-1LZZ



(1)

Tableau III.17 : Principales interactions dans le complexe E-1LZZ



(2)

Figure III.11 : Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule E.

III-7-2-3 Complexe F-1LZZ :

La plupart des interactions qui caractérisent ce complexe sont de type liaison hydrogène dont les principaux responsables de formation sont les groupements OH, NH et NO du ligand.

Deux interactions polaires et une hydrophobique sont également observées. L'hème quant à lui forme une interaction polaire (**Tableau III.18 et Tableau III.19**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)	Atome du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å)
OH	586GLY	2.492861	C	567VAL	Hydrophobique	1.857476
OH	565PRO	2.384525		L		
NH	584PHE	2.886960	C	750HEM	Polaire	1.781289
NH	567VAL	2.702650	N	592GLU	Polaire	2.168523
NH	592GLU	2.51724		U		
NO	589MET	2.704206				
NO	588TYR	2.905513				
NO	587TRP	2.799105				

Tableau III.18 : Liaisons hydrogènes dans le complexe F-1LZZ

Tableau III.19 : Principales interactions dans le complexe F-1LZZ

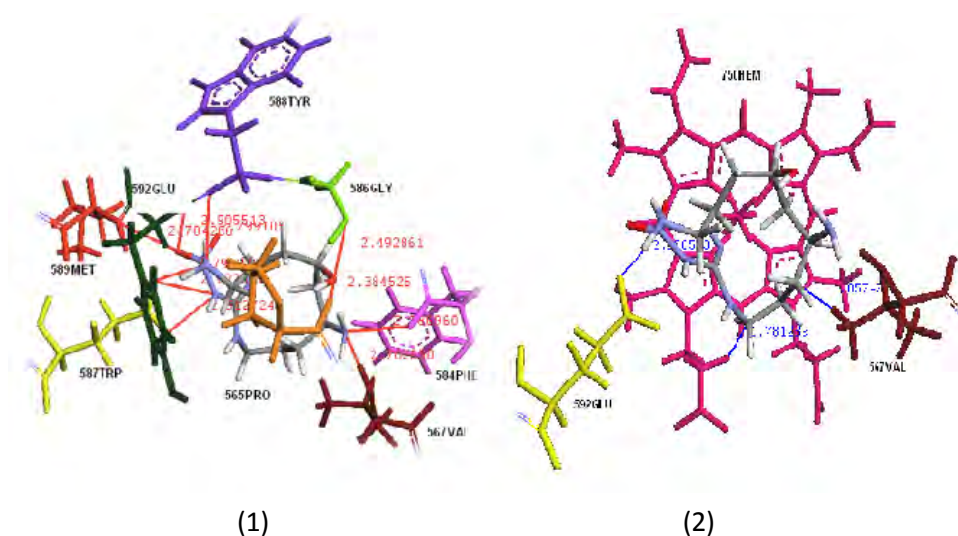


Figure III.12 : Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule F.

III-7-3 Interactions de la molécule G avec la 1LZZ :

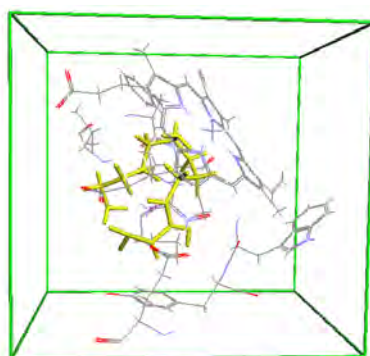


Figure III.13 : Positionnement de la molécule G dans le site actif de la 1LZZ.

Comparativement au complexe F-1LZZ, celui avec le ligand G, en plus des liaisons hydrogènes créées avec les groupements OH, NH et NO, forme deux supplémentaires avec l'hème (**Tableau III.20**).

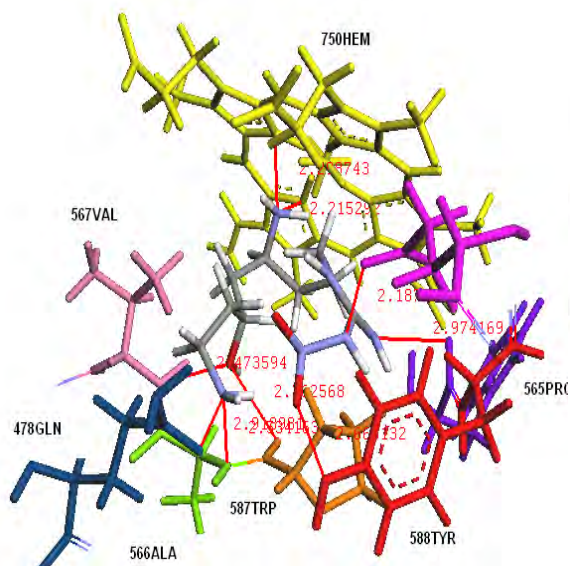
D'autres interactions hydrophobiques et polaires sont également établies (**Tableau III.21**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å°)
NO	588TYR	2.666132
NH	592GLU	2.187203
NH	478GLN	2.918981
NH	566ALA	2.534163
OH	565PRO	2.762586
OH	567VAL	2.473594
NH	750HEM	2.298743
NH	750HEM	2.215292

Atom e du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å°)
C	567VAL	Polaire	2.540679
C	567VAL	Hydrophobique	2.075509
C	584PHE	Hydrophobique	1.854517
C	584PHE	Polaire	2.159912

Tableau III.20 : Liaisons hydrogènes dans dans

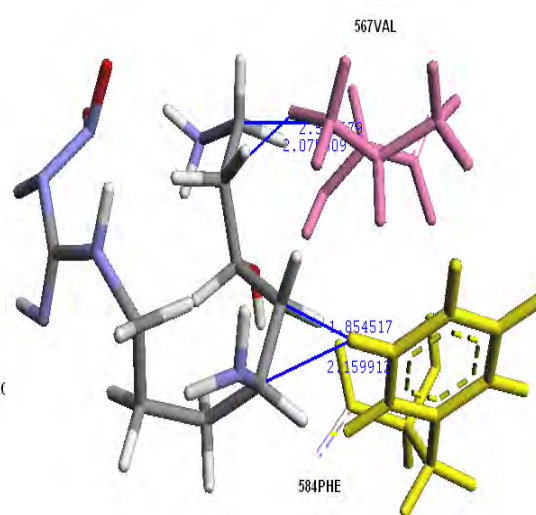
le complexe G-1LZZ



(1)

Tableau III.21 : Principales interactions

le complexe G-1LZZ



(2)

Figure III.14: Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule G.

III-7-4 Interactions de la molécule H avec la 1LZZ :

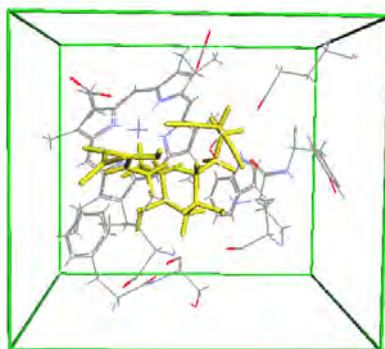


Figure III.15 : Positionnement de la molécule H dans le site actif de la 1LZZ.

La molécule H qui est la moins stable par rapport à ces homologues forme uniquement une liaison hydrogène avec trois résidus différents du site actif de l'entrée 1LZZ (Tableau III.21 & Figure III.16)

Dans le complexe H-1LZZ, l'hème de la macromolécule est responsable de la formation de deux interactions hydrophobiques. Ce type d'interaction est le plus prépondérant par rapport à l'interaction polaire.

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)	Atome du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å)
OH	566 ALA	2.829497	C	750 HEM	Hydrophobique	1.901837
OH	565 PRO	2.119888	C	750 HEM	Hydrophobique	2.145787
NH	750 HEM	2.997884	C	567VAL	Hydrophobique	2.291821
			C	584PHE	Hydrophobique	2.004609
			C	592 GLU	Polaire	2.208871
			C	586 GLY	Hydrophobique	2.150318

Tableau III.22 : Liaisons hydrogènes dans le complexe G-1LZZ

Tableau III.23 : Principales interactions dans le complexe G-1LZZ

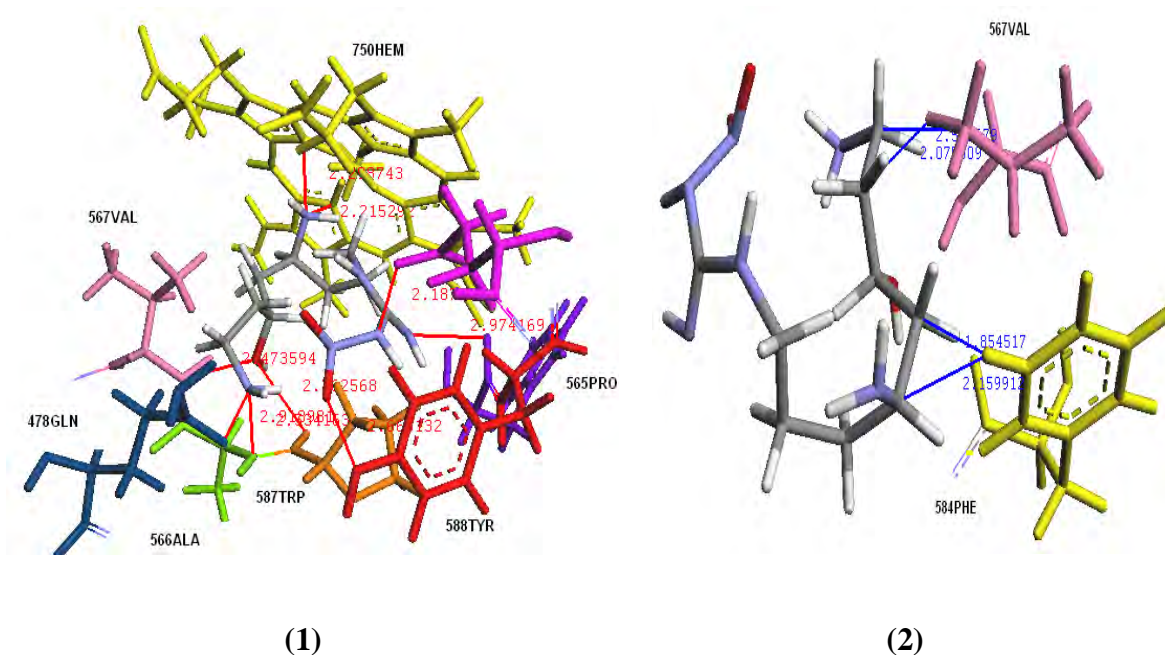


Figure III.16: Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule H.

III-7-5 Interactions de molécule I avec la 1LZZ :

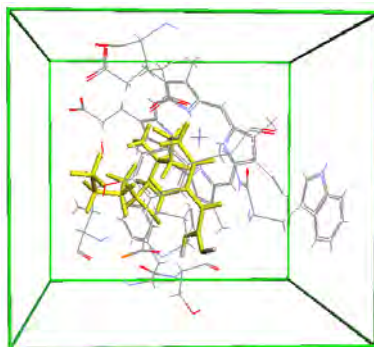


Figure III.17 : Positionnement de la molécule I dans le site actif de la 1LZZ.

Avec une énergie de $-9,44735$ kcal/mol, la molécule I forme le complexe le plus stable avec la nNOS. Cette énergie est comparable, voir même très proche de celle de la molécule référence. C'est pour cela que son IC_{50} théorique est le plus faible.

Les principales liaisons hydrogènes trouvées entre ce ligand I et la nNOS sont résumées dans le **Tableau III.24** et schématisées dans la **Figure III.18**.

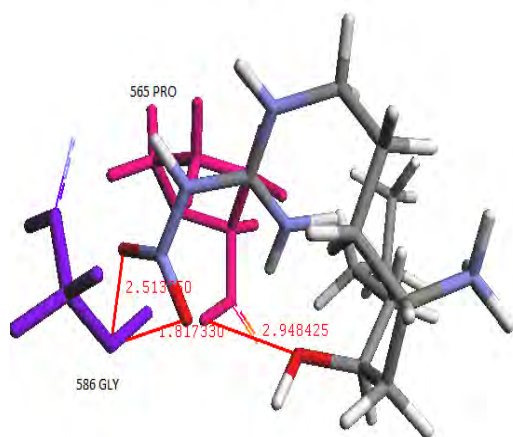
Atome du ligand	Résidu	Distance (Å°)	Atome du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å°)
OH	565 PRO	2.948425	C	584 PHE	Hydrophobique	1.720889
NO	586 GLY	1.817330	C	478 GLN	Polaire	2.372658
NO	586 GLY	2.513750	N	565 PRO	Hydrophobique	1.610122
			C	565 PRO	Hydrophobique	2.423204

Tableau III.24 : Liaisons hydrogènes dans

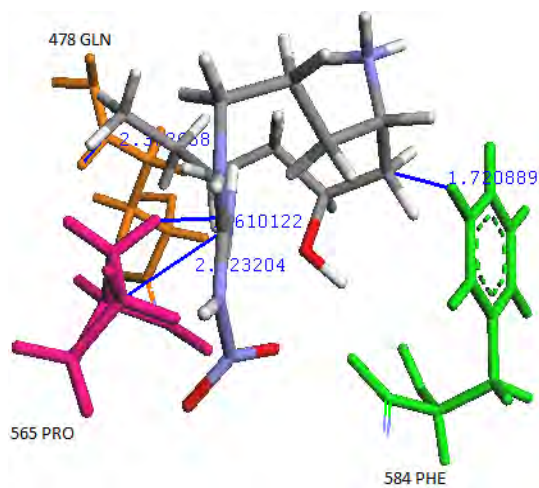
Tableau III.25 : Principales interactions dans

le complexe I-1LZZ

le complexe I-1LZZ



(1)



(2)

Figure III.18 : Représentation des principales liaisons hydrogène (1) et les interactions hydrophobique et polaire (2) entre les résidus du site actif et la molécule I.

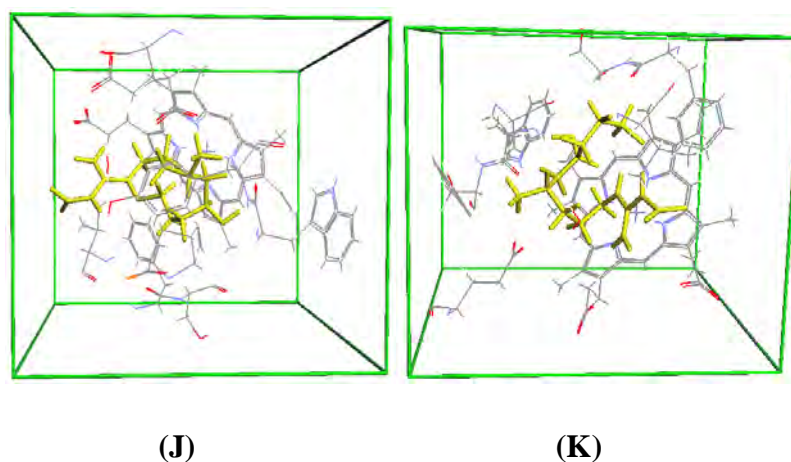
III-7-6 Interactions des molécules J et K avec la 1LZZ :

Figure III.19 : Positionnement de molécules J et K dans le site actif de la 1LZZ.

Les deux molécules J et K diffèrent des autres molécules par le fait qu'elles contiennent un chlore et un fluor.

III-7-6-1 Complexe J-1LZZ :

Du point de vue énergétique le complexe J-1LZZ est plus stable que celui formé avec le ligand K. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'atome de chlore du composé J possède une interaction polaire supplémentaire par rapport au fluor de la molécule K (**Tableau III.27**).

Le ligand J forme plus d'interactions polaires que d'interactions hydrophobiques. L'atome de chlore est responsable des premières.

Les principales liaisons hydrogènes du complexe J-1LZZ sont représentées dans le **Tableau III.26** et schématisées sur la **Figure III.20**.

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å°)	Atome du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å°)
OH	587 TRP	2.670748	C	584 PHE	Hydrophobique	1.967652
OH	586 GLY	2.447927	Cl	584 PHE	Polaire	1.261856
NH	592GLU	2.149899	Cl	584 PHE	Polaire	2.020391
NO	478 GLN	2.559316	Cl	567VAL	Polaire	1.802349
			C	567 VAL	Hydrophobique	1.759774

Tableau III.26 : Liaisons hydrogènes dans le complexe J-1LZZ

Tableau III.27 : Principales interactions dans le complexe J-1LZZ

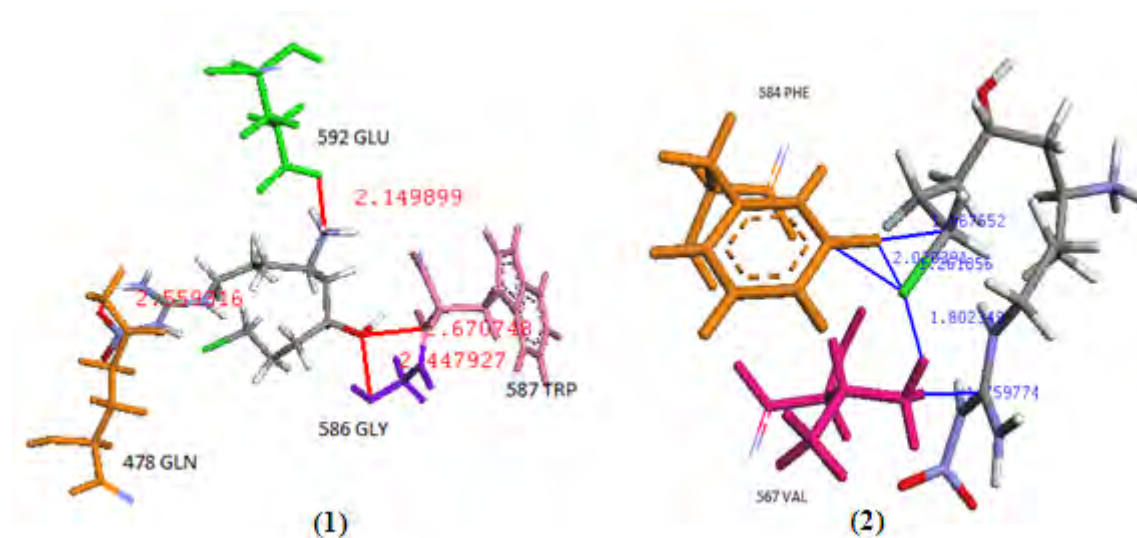


Figure III.20 : Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule J.

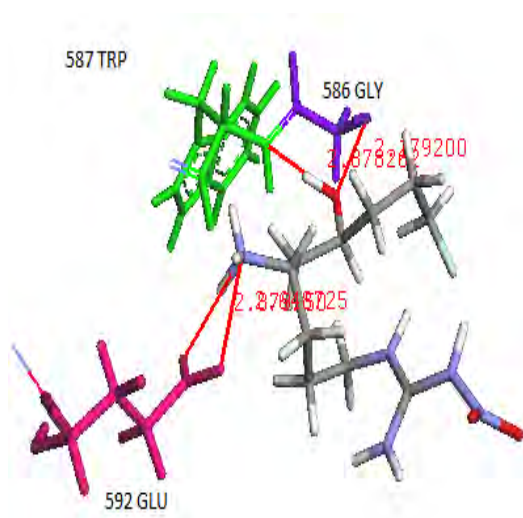
III-7-6-2 Complexe K-1LZZ :

Dans le complexe K-1LZZ, les interactions hydrophobiques sont supérieures en nombre par rapport aux polaires. Ces dernières sont directement formées avec l'atome de fluor.

(Tableau III.29)

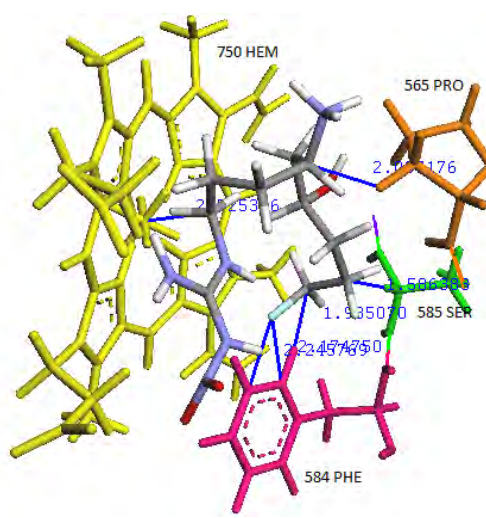
Atome du ligand	Résidu	Distance (Å°)	Atome du ligand	Résidu	Types d'interaction	Distance (Å°)
NH	592GLU	2.648725	F	584 PHE	Polaire	2.245769
NH	592GLU	2.879250	F	584 PHE	Polaire	2.174750
OH	586 GLY	2.179200	C	584 PHE	Hydrophobique	1.985070
OH	587 TRP	2.878262	C	585 SER	Hydrophobique	1.586383
			C	565 PRO	Hydrophobique	2.007176
			C	750HEM	Hydrophobique	2.725326

Tableau III.28 : Liaisons hydrogènes dans le complexe K-1LZZ



(1)

Tableau III.29 : Principales interactions dans le complexe K-1LZZ



(2)

Figure III.21 : Représentation des principales liaisons hydrogènes (1) et interactions hydrophobiques et polaires (2) entre les résidus du site actif et la molécule K.

III-8 CONCLUSION :

Du point de vue énergétique I-1LZZ est le complexe le plus stable avec une énergie de -9,44 kcal/mol. Cette stabilité est gouvernée par un réseau de liaisons hydrogènes et la présence de plusieurs interactions hydrophobiques et une interaction polaire.

Concernant les molécules halogénées (J et K) les atomes de chlore et de fluor forment d'une manière particulière des interactions polaires.

En analysant les différentes interactions obtenues grâce à la simulation du docking moléculaire effectué avec le logiciel Arguslab, et en comparant les énergies des complexes nNOS-structures élaborées, nous pouvons conclure que les molécules I, D, J, G et K présentent des valeurs de IC50 théoriques inférieures à 20 μ M, traduisant ainsi l'énorme potentialité qu'offrent ces nouvelles architectures moléculaires dans l'inhibition de la nNOS.

Conclusion

La présente recherche représente une contribution qui rentre dans le cadre de l'axe de recherche « interactions protéines-ligands » développé au niveau de notre laboratoire.

Dans ce travail, une étude des interactions moléculaires entre la *Nitric Oxide Synthase* neuronal (nNOS) et les composés élaborés par notre entremise selon le concept de bioisotérisme à partir d'un analogue d'arginine (1-((4S, 6S)-4,8-diamino-6-hydroxyoctyl)-3-nitroguanidine) a été réalisée grâce à des techniques de modélisation via la simulation, notamment le docking moléculaire. La molécule qui sert de référence est tirée de la littérature et elle est choisie en raison de son pouvoir inhibiteur testé *in vitro* ($IC_{50} = 2.4 \mu M$) [1].

L'outil informatique utilisé pour le docking est le logiciel libre Arguslab 4.01. Les énergies de liaison (ΔG_{bind}) ainsi que les liaisons hydrogènes formées lors de l'amarrage dans le complexe protéine-ligand sont employées pour analyser les interactions entre les nouvelles structures et le site actif de la nNOS. Les informations recueillies, après criblage, permettent de déterminer lesquelles sont les plus prometteuses.

Sur les onze architectures élaborées qui ont servi à cette expérimentation *in silico*, les cinq structures D, G, I, J et K se sont révélées posséder des activités inhibitrices assez conséquentes (IC_{50} inférieur à $20 \mu M$) vis-à-vis de nNOS. La molécule I qui se place en tête de liste est celle dont le NH_2 terminal a été substitué par un radical méthyl (CH_3).

D'après les résultats obtenus et qui s'avèrent intéressants, il serait souhaitable dans une première étape, de faire synthétiser ces molécules par l'équipe d'électrochimie de notre laboratoire et dans une deuxième étape en évaluer les différents paramètres théoriquement et expérimentalement. Pour cela, il sera fait appel à d'autres outils de modélisation plus performants et éventuellement à la collaboration de certaines équipes de recherche pour les tester *in vitro* et pourquoi pas *in vivo*.

*Références
bibliographiques*

Introduction générale :

[1] : Rosen E.D., O'Donnell A.L. and Koenig R., 1991.- Protein-protein interactions involving erbA superfamily receptors: through the TRAPdoor. Mol. Cell. Endocrinol., 78 :83-88

[2]: Roberts M.R., 2000.- Regulatory 14-3-3 protein-protein interactions in plant cells. Curr Opin Plant Bio. 3(5) : 400-405

[3] : Pawson T., Nash P., 2000.- Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. Genes Dev. 14(9):1027-47

[4] : Filman D.J., BOLIN J.T., MATTHEWS D.A. and KRAUT J., 1982.- Crystal structures of Escherichia coli and Lactobacillus casei dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. II. Environment of bound NADPH and implications for catalysis. J.Biol.Chem. 257 (22) :13663-13672

[5] : Heroux A, White EL, Ross LJ, Kuzin AP, Borhani DW., 2000.- Substrate deformation in a hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase ternary complex: the structural basis for catalysis. Structure, 8:1309-1318.

[6] : Zacharias N., Dougherty D.A., 2000.- Cation- π interactions in ligand recognition and catalysis. Trends Pharmacol Sci., 23(6):281-287. Review.

[7] : Schmid, E.F.; Smith, D.A., 2005.- Keynote review: Is declining innovation in the pharmaceutical industry a myth? *Drug Discov. Today*, 10, 1031-1039.

[8] : O'Driscoll, C. A., 2004.- virtual space odyssey, *Horizon Symposia*, 1-4.

[9]: Bruckdorfer R., 2005.- Mol.Aspects Med.,26, 3-31

Chapitre I:

[1] : Kehrer J.P. 1993.- Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical review in toxicology, 23 (1): 21-48.

[2] : Beers MH, Berkow R, (eds), 1999.- The Merck manual of diagnosis and therapy. Whitehouse Station, NJ: Merck Research Laboratories,

[3] : Bae Y. S., Kang S. W., Seo M. S., Baines I. C., Tekel E., Chock P. B., and Rhee S. G., 1997. - Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. J Biol Chem 272 : 217-221.

[4] : Tohyama Y., Takano T. and Yamamura H., 2004.- B cell responses to oxidative stress. Curr Pharm Des 10 : 835-839.

[5] : Dean R. T., FU S., Stocker R., and Davies M. J., 1997.- Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. Biochem J, 324 (1) : 1-18.

[6] : Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C., - 2005.- Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. J. Biochem. Biophys. Methods, 65 : 45–80.

[7] : Halliwell, B. G., JMC., 1999.- Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press.

[8] : Durackova Z., Djrolo F., Hougbe H., Avode G., Attoulou V., Addra B., Kodjoh N., Avimadj M., 2008.- Oxidants, Antioxidants and Oxidative stress. Mitochondrial medicine. Gvozdzakova A (ed). P : 19-43.

[9] : Delattre J. 2005.- Radicaux libres et stress oxydant ed : TECDOC. Londres-paris –new york.p :620

[10] : Favier A., 2003.- Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique : 108-115.

[11] : Darley-Usmar V., Wiseman H and Halliwell B., 1995.- Nitric oxide and oxygene radicals: a question of balance. FEBS Letters 369: 131-135.

[12] : Zheng H.L., Zhao Z.Q., Zhang C.G., Feng J.Z., KE Z.L., SU M.J., 2000.- Changes in lipid peroxidation, the redox system and ATPase activities in plasma membranes of rice seedling roots caused by lanthanum chloride. Biometals; 13:157-63.

[13] : Lander H.M., 1997.- An essential role for free radicals and derived species in

signal transduction. *Faseb J.*, 11:118-24.

[14] : Giroud C., 2007.- Etude du mécanisme des NO synthases : importance du réseau de liaisons hydrogène dans l'environnement et la réactivité de l'hème. Thèse de doctorat, Université Descartes, Paris.

[15] : Manunta A., Tirillini B., and Fraternali D., 1992.- Secretory tissue and essential oil composition of *Bupleurum fruticosum* L., *J. Essent. Oil Res.*, 4(5), 461–466.

[16] : Furchgott R.F. and Zawadzki, J.V., 1980.- The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288 (5789): 373-6.

[17] : Beckman J. S, Beckman T. W, Chen J, Marshall P. A. and Freeman B. A., 1990.- Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:1620-4.

[18] : Beckman J. S. and Koppenol W. H., 1996.- Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 271:C1424-37.

[19] : Ignarro, L. J., J. M. Fukuto, et al., 1993.- Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(17): 8103-7.

[20] : Griffith OW & Stuehr DJ., 1995.- Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol* 57, 707-736.

[21] : Hibbs J. B., Taintor R. R. and Vavrin Z., 1987.- Macrophage Cytotoxicity - Role for L-Arginine Deiminase and Imino-Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science* 235(4787), 473-476.

[22] : Stuehr D. J., Kwon N. S., Nathan C. F., Griffith O. W., Feldman P. L. and Wiseman J., 1991.- N-Omega-Hydroxy-L-Arginine Is an Intermediate in the Biosynthesis of Nitric-Oxide from L-Arginine. *Journal of Biological Chemistry* 266(10), 6259-6263.

[23] : Aktan F., 2004.- iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 75, 639-653.

[24] : Schiffrin, E.L., 1994.- The endothelium and control of blood vessel function in health and disease. *Clin Invest Med.*, 17 (6): 602-20.

[25] : Förstermann U., Gath I., Schwarz P., Closs E.I., Kleinert H., 1995.- Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control.

Biochem Pharmacol, 50 : 1321-32.

[26] : Alderton, W.K., Cooper, CE., AND Knowles, R.G. 2001.- Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357 :593-615.

[27] : Bredt D. S., Hwang P. M., Glatt C. E., Lowenstein C., Reed R. R. and Snyder S. H., 1991.- Cloned and Expressed Nitric-Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome-P-450 Reductase. *Nature*, 351(6329): p. 714-718.

[28] : Adak S., Ghosh S., Abu-Soud H. M. and Stuehr D. J., 1999.- Role of reductase domain cluster 1 acidic residues in neuronal nitric oxide synthase –characterization of the FMN-free enzyme. *J. Bio. Chem*, 274(32) : p.22313-22320.

[29] : Garcin E. D., Bruns C. M., Lloyd S. J., Hosfield D. J., Tiso M., Gachhui R., Stuehr D. J., Tainer J. A. and Getzoff E. D., 2004.- Structural basis for isozyme-specific regulation of electron transfer in nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 279(36), 37918-37927.

[30] : Wang M., Roberts D. L., Paschke R., Shea T. M., Masters B. S. S. and Kim J. J. P., 1997.- Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(16), 8411-8416.

[31] : Crane B. R., Arvai A. S., Ghosh D. K., Wu C. Q., Getzoff E. D., Stuehr D. J. and Tainer J. A., 1998.- Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* 279(5359), 2121-2126.

[32] : Raman C. S., Li H. Y., Martasek P., Kral V., Masters B. S. S. and Poulos T. L., 1998.- Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* 95(7), 939-950.

[33] : Wang M., Roberts D. L., Paschke R., Shea T. M., Masters B. S. S. and Kim J. J. P., 1997.- Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(16), 8411-8416.

[34] : Li H. Y. and Poulos T. L., 2005.- Structure-function studies on nitric oxide synthases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 99(1), 293-305.

[35] : Abu-Soud H. M., Ichimori K., Presta A. and Stuehr D. J., 2000.- Electron transfer, oxygen binding, and nitric oxide feedback inhibition in endothelial nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry* 275(23), 17349-17357.

[36] : Abu-Soud H. M., Yoho L. L. and Stuehr D. J., 1994.- Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and

interdomain electron transfer. *The Journal of biological chemistry* 269(51), 32047-32050.

[37] : Baek K. J., Thiel B. A., Lucas S. and Stuehr D. J., 1993.- Macrophage Nitric-Oxide Synthase Subunits - Purification, Characterization, and Role of Prosthetic Groups and Substrate in Regulating Their Association into a Dimeric Enzyme. *J. Biol. Chem.*, 268(28): p. 21120-21129.

[38] : Ghosh D. K., AbuSoud H. M. and Stuehr D. J., 1996.- Domains of macrophage NO synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry*, 35(5): p. 1444-1449

[39] : Hemmens B., Goessler W., Schmidt K. and Mayer B., 2000.- Role of bound zinc in dimer stabilization but not enzyme activity of neuronal nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 275(46): p. 35786-35791.

[40] : Li H. Y., Raman C. S., Glaser C. B., Blasko E., Young T. A., Parkinson J. F., Whitlow M. and Poulos T. L., 1999.- Crystal structure of zinc free and bound heme domain of human inducible nitric oxide – Implications for dimer stability and comparaison with endothelial nitric oxide synthase. *J.Biol. Chem.*, 274(30) : p.21276-21284.

[41] : Hemmens B., Gorren A. C. F., Schmidt K., Werner E. R. and Mayer B.,1998.- Haem insertion, dimerization and reactivation of haem-free rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 332, 337-342.

[42] : Klatt P., Pfeiffer S., List B. M., Lehner D., Glatter O., Bachinger H. P., Werner E. R., Schmidt K. and Mayer B., 1996.- Characterization of heme-deficient neuronal nitric-oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerization and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *Journal of Biological Chemistry* 271(13), 7336-7342.

[43] : Klatt P., Schmidt K., Lehner D., Glatter O., Bachinger H. P. and Mayer B., 1995.- Structural-Analysis of Porcine Brain Nitric-Oxide Synthase Reveals a Role for Tetrahydrobiopterin and L-Arginine in the Formation of an Sds-Resistant Dimer. *Embo Journal* 14(15), 3687-3695.

[44] : Rodriguez-Crespo I., Gerber N. C. and deMontellano P. R. O., 1996.- Endothelial nitric-oxide synthase - Expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation. *Journal of Biological Chemistry* 271(19), 11462-11467.

[45] : Siddhanta U., Presta A., Fan B. C., Wolan D., Rousseau D. L. and Stuehr D. J., 1998.- Domain swapping in inducible nitric-oxide synthase - Electron transfer occurs

between flavin and heme groups located on adjacent subunits in the dimer. *J. Biol. Chem.*, 273(30) : p. 18950-18958.

[46] : Crane B. R., Arvai A. S., Ghosh S., Getzoff E. D., Stuehr D. J. and Tainer J. A., 2000.- Structures of the N-omega-hydroxy-L-arginine complex of inducible nitric oxide synthase oxygenase dimer with active and inactive pterins. *Biochemistry* 39(16), 4608-4621.

[47] : Li H., Shimizu H., Flinspach M., Jamal J., Yang W., Xian M., Cai T., Wen E. Z., Jia Q., Wang P. G. and Poulos T. L., 2002.- The novel binding mode of N-alkyl-N'-hydroxyguanidine to neuronal nitric oxide synthase provides mechanistic insights into NO biosynthesis. *Biochemistry* 41(47), 13868-13875.

[48] : Wendy K. Alderton, Chris E. Cooper and Richard G. Knowes., 2001.- Nitric oxide synthases : structure, function and inhibition. *Biochem.J.* 357,593-615.

[49] : Elfering S. L, Sarkela T. M and C., 2002.- Giulivi. *Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. J Biol Chem.*277:38079-86.

[50] : C. Giulivi, J. J. Poderoso and A., 1998.- Boveris. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.*273:11038-43.

[51] : Son H., Hawkins R.D., Martin K., Kiebler M., Huang P.L., Fishman M.C., and Kandel E.R., 1996.- Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* 87:1015-1023.

[52] : Nathan C. and Shiloh M.U., 2000.- Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 :8841-8848.

[53] : Papapetropoulos A, Rudic R.D. and Sessa W.C., 1999.- Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, 43 (3): 509-20.

[54] : Wheatcroft S.B., Williams I.L., Shah A.M., Kearney M.T., 2003.- Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabet Med*, 20 (4): 255-68.

[55] : Ducrocq C., Servy C., Cudic M., Blanchard E.B., 2001.- Intervention by nitric oxide, NO, and its oxide derivatives particularly in mammals. *Can J Physiol Pharmacol*, 79 (2): 95-102.

[56] : Andrew P.J. and Mayer B., 1999.- Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*, 43 (3): 521-31.

[57] : Dallaire P., 2006.- Invalidation génétique ou pharmacologique de iNOS dans le

traitement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité et l'endotoxémie. Thèse de doctorat, Faculté de médecine Université Laval, Québec

[58] : Cadenas E., 1997.- Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* 6(4): 391- 397.

[59] : Domenico, R., 2004.- Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Curr Pharm Des*, 10 (14): 1667-76.

[60] : Hayden M.R. and Tyagi S.C., 2003.- Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stress. *Cardiovasc Diabetol.*, 2(2) : doi: 10.1186/1475-2840-2-2.

[61] : Xie, Q. and Nathan, C., 1994.- The high-output nitric oxide pathway: rôle and régulation. *JLeukoc Biol* 56:576-582.

[62] : Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., AND Fishman, M.C., 1995.- Hypertension in mice lacking the gène for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377 :239-242.

[63] : Shesely E.G., Maeda N., Kim H.S., Desai K.M., Krege J.H., Laubach V.E., Sherman P.A., Sessa W.C., and Smithies O., 1996.- Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13176-13181.

[64] : Ohashi Y., Kawashima S., Hirata K., Yamashita T., Ishida T., Inoue N., Sadoka T., Kurihara H., Yazaki Y. and Yokoyama M., 1998.- Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice over expressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, 102 :2061-2071.

[65] : Shaul, P.W., 2002.- Régulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*, 64:749-774.

[66] : Reid, M.B. 2001.- Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc* 33:371-376.

[67] : Paton J.F., Kasparov S. and Paterson DJ., 2002.- Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci* 25 :626-631.

[68] : Patman J., Bhardwaj N., Ramnauth J., Annedi S. C., Renton P., Maddaford S. P., Rakhit S. and Andrews J. S., 2007.- Novel 2-aminobenzothiazoles as selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17(9), 2540-2544.

[69] : Alderton, W.K., Cooper, CE., and Knowles, R.G. 2001.- Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 357 :593-615.

[70] : Adak S., Santolini J., Tikunova S., Wang Q., Johnson J. D. and Stuehr D. J., 2001.- Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 -> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 276(2), 1244-1252.

[71] : Adak S., Santolini J., Tikunova S., Wang Q., Johnson J. D. and Stuehr D. J., 2001.- Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 -> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 276(2), 1244-1252.

[72] : Liu F. Z., Fang H., Zhu H. W., Wang Q., Yang Y. and Xu W. F., 2008.- Design, synthesis, and preliminary evaluation of 4-(6-(3 nitroguanidino) hexanamido) pyrrolidine derivatives as potential iNOS inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* 16(1), 578-585.

[72] : Henrion D, Dowell FJ, Levy BI and Michel JB., 1996.- In vitro alteration of aortic vascular reactivity in hypertension induced by chronic NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Hypertension* 28:361-366.

[73] : Bartunek J, Weinberg EO, Tajima M, Rohrbach S, Katz SE, Douglas PS and Lorell BH., 2000.- Chronic N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension : novel molecular adaptation to systolic load in absence of hypertrophy. *Circulation* 101:423-429.

[74] : Ciani E, Baldinotti I and Contestabile A., 2001.- Sustained, long-lasting inhibition of nitric oxide synthase aggravates the neural damage in some models of excitotoxic brain injury. *Brain Res Bull* 56:29-35.

[75] : Boulouard M., Schumann-Bard P., Butt-Gueulle S., Lohou E., Stiebing S., Collot V. and Rault S., 2007.- 4-substituted indazoles as new inhibitors of neuronal nitric oxide synthase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17(11), 3177-3180.

[76] : MacMicking J., Xie Q. W. and Nathan C., 1997.- Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology* 15, 323-350.

[77] : Whitlow M., Adler M., Davey D., Huang Q., Koovakkat S., Parkinson J. F., Pham E., Polokoff M., Xu W., Yuan S. and Phillips G., 2007.- The rational design of inhibitors of nitric oxide formation by inducible nitric oxide synthase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17(9), 2505-2508.

[78] : Patrick., 2002.- *Chimie pharmaceutique, Chapitre 4 : Effet de médicaments sur des enzymes* 43-48. Traduction de la 2^{ème} édition anglaise par Paul Depovere.

[79] : Bruckdorfer. R., 2005.- *Mol.Aspects Med.*,26, 3-31.

- [80] : Radi. R., G. Pelufo, M. N. Alvarez, M. Naviliat et A. Cayota, Free Radic., 2001.- Biol. Med., 30,463-468.
- [81] : Friedman, H. L., 1951.- Influence of Isosteric Replacements upon Biological Activity, National Academy of Sciences – National Research Council Publication No 206, Washington D.C.,
p. 295.
- [82] : Thornber, C. W., 1979.- Chem. Soc. Rev., 8, 563.
- [83] : Burger,, 1960.- A. in 'Medicinal Chemistry' 2nd Edn., Wiley-Interscience, New York, p.171.
- [84] : Korolkovas., 1970.-A. 'Essentials of Molecular Pharmacology: Background for Drug Design', Wiley, p. 203.
- [85] : Annales de physiologie végétale., 1959.- Volumes 1 à 3, Institut national de la recherche agronomique (France),
- [86] : <http://georges.dolisi.free.fr/Les%20prions/proteine.htm>
- [87] : <http://www.cem.msu.edu/~cem252/sp97/ch24/ch24aa.html>
- [88] : Geiger R. and Köning W., 1981.- Amine protecting groups. In The peptides. E. Gross and J.Meienhofer, Eds. Academic Press: London, Vol. 3.
- [89] : Simonin F., Zajac J.M., Simonet G., 2007.- Ligands de RCPG de neuropeptides à motif RFamide.

Chapitre II:

[1] Sordo J. A, Probst M, Corongiu G, Chin S et Clementi E., 1987.- Ab Initio Pair Potentials for the Interactions between Aliphatic amino Acids. Journal of the American Chemical Society, 109, 1702-1708

[2] Truchon J. F., 2008.- Modéliser la polarisation électronique par un continuum diélectrique intramoléculaire vers un champ de force polarisable pour la chimie bioorganique, Université de Montréal

[3] Dugas H., 1996.- Principes de base en modélisation moléculaire, Aspects théoriques et pratiques, Chapitre 3 introductions aux méthodes de minimisation d'énergie, Librairie de l'Université de Montréal

[4] Marle C.M., 2003.- (Université Paris 6-Pierre et Marie Curie, France), De la mécanique classique à la mécanique quantique : pourquoi et comment quantifier?, Université Pierre et Marie Curie Paris, France, P18

[5] Wilfred F. van Gunsteren et Herman J. C. Berendsen, Angew., 1990.- Chem. International Edition England ,29, 992-1023: "Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry",

[6] : Leach A.R., 2001.- Molecular modelling, Principles and Application, Prentice hall, New jersey.

[7] : Bastard K., 2005.- Assemblage flexible de macromolécules : la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques. UFR Biologie et Sciences de la Nature.

[8] : Liotta D., 1988.- Advances in Molecular Modeling, Ed, JAI Press, P1.

[9] : Toulhoat H., 2007.- Modélisation moléculaire. Bases théoriques : des propriétés microscopiques aux propriétés macroscopiques. Techniques de l'ingénieur J 1-013

[10] : Deremble,C. et Lavery,R,. 2005.- Macromolecular recognition. Curr Opin Struct Biol, 15 (2), 171–175

[11] : Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A.M., Clarke B., Lalonde J., Lambert M., Lindvall M., Nevins N., Semus S.F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J.M., Peishoff C.E., Head M.S., 2006.- A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions, J. Med. Chem., 49:5912-5931.

- [12] : Seuret P., 2003.- Interactions intermoléculaires et cohésion moléculaire: inhibiteurs viraux, colonnes de séparation HPLC et microdépôts métalliques. THÈSE Présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève pour obtenir le grade de Docteur ès sciences, mention chimique
- [13] : Férey N, Bouyer G, Martin C, Drif A, Bourdot P, Ammi M, Nelson J., Burkhart J.M, Autin L., 2008.- Docking de protéines en Réalité Virtuelle : une approche hybride et multimodale.
- [14] : Helperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R., 2002.- Principles of docking : an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *PROTEINE, Structure, Function and Bioinformatics* 47, 409-443
- [15] : Kontoyianni M., Mcclellan L., Sokol G.S., 2004.- Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms, *J.Med.Chem.*, 47:558-565.
- [16] : Leach, A.R., 1996.- Monte Carlo simulation methods, in *Molecular modeling : Principles and applications*. Addison Wesley Longman Ltd.: Harlow. p. 371-411.
- [17] : Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S. et al., 1998.- Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function., *J. Comput. Chem.*, 19 : 1639-1662.
- [18] : Stahl, M., Rarey, M., 2001.- Detailed analysis of scoring functions for virtual screening, *J. Med. Chem.*, 44:1035-1042.
- [19] : Protein-Ligand interactions: from Molecular Recognition to Drug Design. Pdf.
- [20] : Holloway M. K., 1995.- A priori Prediction of Activity for HIV-1 Protease Inhibitors Employing Energy Minimization in the Active Site, *J. Med. Chem.*, 38 : 305-317
- [21] : Perez C., Pastor M., Ortiz A. R., Gago F ., 1998.- Comparative binding energy analysis of HIV-1 Protease inhibitors: incorporation of solvent effects and validation as a powerful tool in receptor-based drug design, *J. Med. Chem.*, 41 : 836-852
- [22]: Boehm 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. Aided Mol. Des.*, 8 : 243-256
- [23] Boehm 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. Aided Mol. Des.*, 12 : 309-323

- [24] : Head R. D., Smythe M. L., Oprea T. I., Waller C. L., Green S. M., Marshall G. R., 1996.- Validate: a new method for the Receptor-Based prediction of binding affinities of Novel ligands, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 : 3959-3969
- [25] : Muegge I., Martin Y., 1999.- A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach, *J. Med. Chem.*, 42 : 791-804
- [26] : Muegge I., 2000.- A knowledge-based scoring function for protein-ligand interactions: Probing the reference state, *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 20 : 99-114
- [27] : Kuntz I.D, Blaney J.M, Oatley S.J, Langridge R, Ferrin T.E., 1982.- A geometric approach to macromolecule-ligand interactions., *J Mol Biol* 161 269-288.
- [38] : Wei B.Q, Weaver L.H, Ferrari A.M, Matthews B.W, Shoichet B.K., 2004.- Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site., *J Mol Biol* 337 1161-1182.
- [29] : Totrov M, Abagyan R., 1997.- Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates., *Proteins Suppl* 1 215-220.
- [30] : Kitchen D.B, Decornez H, Furr J.R, Bajorath J., 2004.- Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications, *Nat Rev Drug Discov* 3 935-949.
- [31] : Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R., 2002.- Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions., *Proteins* 47, 409-443.
- [32] : Charifson P.S, Corkery J.J, Murcko M.A, Walters W.P., 1999.- Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins., *J. Med. Chem* 42, 5100-5109.
- [33] : 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.
- [34] : Terp G.E, Johansen B.N, Christensen I.T, Jørgensen F.S., 2001.- A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities., *J. Med. Chem* 44, 2333-2343.
- [35] : Wang R.X, Lai L.H, Wang S.M., 2002.- Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction, *J. Comput. Aided. Mol. Des* 16, 11-26.

- [36] : Muegge I., 2006.- PMF scoring revisited., J .Med .Chem 49, 5895-5902.
- [37] : Muegge I, Martin Y.C., 1999.- A general and fast scoring function for protein-ligand interactions: a simplified potential approach., J .Med .Chem 42 791-804.
- [38] : Muegge I., 2001.- Effect of ligand volume correction on PMF scoring, J .Comput .Chem. 22, 418-425.
- [39] : Eldridge M.D, Murray C.W, Auton T.R, Paolini G.V, Mee R.P., 1997.- Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes., J. Comput. Aided. Mol. Des 11, 425-445.
- [40] : Charifson P . S., Corkery J. J., Murcko M. A., Walters W. P ., 1999.- Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins., J Med Chem, 42 : 5100-5109
- [41] : Akifumi ODA, Ohgi Takahashi., 2009.- Validation of ArgusLab Efficiencies for Binding Free Energy Calculations. Chem-Bio Informatics Journal, 9:52-61

Chapitre III:

- [1] : Erik P, Erdal, Pavel Martašek, Linda J. Romanb, and Richard B. Silverman., 2007.- Hydroxyethylene isosteres of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15, 6096–6108.

Conclusion:

- [1] : Erik P, Erdal, Pavel Martašek, Linda J. Romanb, and Richard B. Silverman., 2007.- Hydroxyethylene isosteres of selective neuronal nitric oxide synthase inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry 15, 6096–6108.

Résumé :

La modélisation des interactions protéine–ligand et le docking moléculaire représentent des techniques performantes dans le domaine de la simulation. L'étude « *in silico* » par le biais du Docking moléculaire vise à prédire la structure 3D d'un complexe formé à partir de molécules isolées, évaluer le mode de fixation et les différentes interactions établies entre les deux entités.

Dans ce contexte, Arguslab 4.0.1, logiciel libre a été utilisé pour estimer l'affinité des ligands analogues d'arginine avec l'oxyde nitrique synthase neuronale (nNOS) d'une part et quantifier leur activité inhibitrice d'autre part. L'excès de la production de NO par la nNOS est responsable de plusieurs maladies telles que l'ischémie cérébrale et les maladies neurodégénératives (Parkinson et Alzheimer).

Pour réaliser notre travail, nous nous sommes basés sur le concept de bioisostérisme pour proposer de nouvelles architectures moléculaires déduites de structures existantes. Les composés ainsi conçus interagissent au niveau du site catalytique de la nNOS en formant des complexes plus ou moins stables. Leur IC_{50} a été déterminé théoriquement.

Mots clé :

Monoxyde d'azote, Oxyde nitrique synthase, Inhibition, Analogues d'arginine, Interactions protéine-ligand, *in silico*, Docking moléculaire, Arguslab 4.01, Bioisostère.

Abstract :

Modeling of protein-ligand interactions and molecular docking techniques are successful in the field of simulation. The study "*in silico*" through molecular docking is to predict the 3D structure of a complex formed from isolated molecules, evaluate the binding mode and the different interactions established between the two entities.

In this context, Arguslab 4.0.1, free software was used to estimate the affinity of ligands arginine analogues with neuronal nitric oxide synthase (nNOS) on the one hand and quantify their inhibitory activity on the other. Excess production of NO by nNOS is responsible for several diseases such as cerebral ischemia and neurodegenerative diseases (Parkinson's and Alzheimer's).

To realize our work, we relied on the concept of bioisostérisme to propose new molecular architectures derived from existing structures. The compounds interact to read at the catalytic site of nNOS by forming complexes more or less stable. Their IC₅₀ was determined theoretically.

Keywords:

Nitric oxide, nitric oxide synthase, inhibition, analogs of arginine, protein-ligand interactions, *in silico*, molecular, docking, Arguslab 4.01, bioisostere.