

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BAKR BELKAID DE TLEMCEM

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives "LASNABIO"

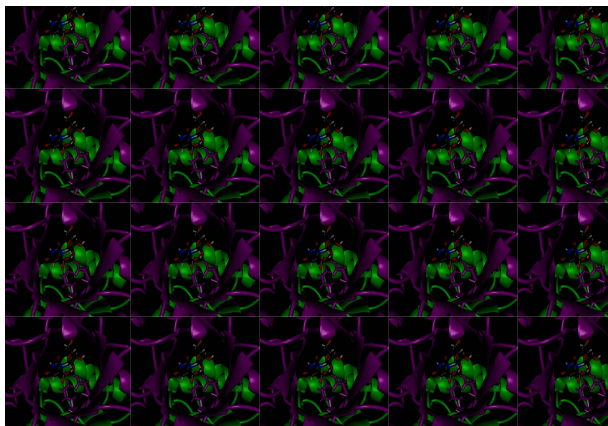
## MÉMOIRE

PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE : MAGISTER

**Spécialité** : Chimie Physique : Option : Chimie Théorique et Modélisation Moléculaire

Par

**M<sup>r</sup> AYACHI HICHAM**



**Thème :**

**Analyse de l'interaction Ribonucléase-Kanamycine par modélisation moléculaire**

Devant le jury :

Mme MERGHACHE Salima	MCA, Université Abou Bekr BelKaid-Tlemcen	Présidente.
Mme BENYAROU Meriem	MCA, Université Abou Bekr BelKaid-Tlemcen	Examinatrice.
Mr KOTBI Mohamed	Pr, Université Abou Bekr BelKaid-Tlemcen	Examineur.
Mr GHALEM Said	Pr, Université Abou Bekr BelKaid-Tlemcen	Encadreur.

**-2011-**

# Remerciements

*Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire LASNABIO (Laboratoire des Sciences Naturelles et Bioactives) dans l'équipe de modélisation moléculaire de la faculté des sciences, Département de chimie, de l'université de Tlemcen sous la direction de Monsieur le professeur Saïd GHALEM.*

*Il m'a été proposé par Monsieur le professeur Saïd GHALEM. Qu'il me soit permis de lui exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude pour les nombreux conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer et pour la bienveillante attention dont il m'a entouré.*

*Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à Madame le Docteur Salima MELGHACHE qui a bien voulu présidé ce jury.*

*Je tiens à remercier Professeur Mohamed KOTBI et Docteur Mériem BENYAROU de l'université Abou bekɣ BELKAID de Tlemcen, qui ont accepté d'examiner ce travail et de participer aux membres du jury.*

*Enfin, j'adresse mes remerciements à tous les collègues du laboratoire 'LASNABIO' et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

# Dédicaces

## Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

- *A mes très chers parents pour leurs sacrifices.*
- *A ma femme et ma fille.*
- *A mon frère et son épouse et ma sœur et son époux.*
- *A mes beaux parents et leurs enfants.*
- *A toute ma famille.*
- *A tous ceux, qui de près ou de loin m'ont aidé à mener à bon terme la réalisation de ce travail.*

# **SOMMAIRE**

**INTRODUCTION GENERALE**

**CHAPITRE I : LES ANTIBIOTIQUES**

**CHAPITRE II : LES METHODES DE LA MODELISATION MOLECULAIRE**

**CHAPITRE III : ANALYSE CONFORMATIONNELLE**

**CHAPITRE IV : ACIDES-AMINES, PEPTIDES, PROTEINES ET ENZYMES**

**CHAPITRE V : APPLICATION, RESULTATS ET DISCUSSIONS**

**CONCLUSION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

---

Toute vie dépend du bon fonctionnement d'une grande variété de catalyseurs organiques ou enzymes. Les structures biologiques correspondent à des fonctions bien définies et la vie d'un organisme dépend du rôle des structures biologiques, des membres aux divers organes, et jusqu'aux agents chimiques du métabolisme, comme les enzymes.

Les enzymes ont fait l'objet de recherches intensives ayant permis de dévoiler les principes du fonctionnement cellulaire. Leur importance s'est encore accrue avec le lancement de projets de séquençage des génomes à grande échelle. De plus, leur intérêt va bien au delà de la collecte de connaissances fondamentales puisqu'elles trouvent des applications dans des domaines variés tant biomédical (réactifs, kits de diagnostic, méthodes thérapeutiques) qu'industriel (mise en œuvre de technologies à base d'enzymes dans l'industrie agro-alimentaire) et les détergents.

La caractéristique la plus évidente des organismes vivants est qu'ils sont complexes et extrêmement organisés. Par exemple, les organismes assez grands pour être visibles à l'œil nu sont formés de nombreuses cellules, le plus souvent de types différents. A leur tour, ces cellules contiennent des structures subcellulaires, qui sont des assemblages complexes de très grosses molécules. Ces macromolécules elles-mêmes ont un remarquable degré d'organisation avec une structure tridimensionnelle complexe, bien qu'elles soient constituées d'un petit nombre d'éléments chimiques comme les sucres et les acides aminés.

En fait, la structure tridimensionnelle complexe caractéristique des macromolécules résulte des interactions entre ses constituants, en fonction de leurs propriétés chimiques individuelles [1].

Le traitement informatique des processus enzymatiques s'est développé spectaculairement dans les deux dernières décennies [2]. Bien que nous sommes loin de pouvoir exécuter des calculs quantitatifs avec précision, le graphisme moléculaire, la dynamique moléculaire et la mécanique quantique fournissent de nouvelles informations essentielles non disponibles par les expériences les plus

sophistiquées. Mais la meilleure manière d'obtenir de bons aspects structuraux des processus enzymatiques est de combiner les méthodes expérimentales et informatiques. Bien que les données primaires soient obtenues par la cristallographie des rayons X ou par spectroscopie RMN, l'importance de cette tendance a été déjà soulignée il y a plus de vingt ans [3]. Le développement rapide des ordinateurs et des méthodes informatiques permet d'étudier des systèmes entre 50-100 atomes par mécanique quantique et jusqu'à 50 000 atomes par mécanique moléculaire [4].

### I- MODELISATION MOLECULAIRE

On définit la modélisation moléculaire comme une application des méthodes théoriques et de calcul pour résoudre des problèmes impliquant la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et utilisables rapidement ou au contraire, elles peuvent être extrêmement complexes et demandent des centaines d'heures de calcul sur un ordinateur, même sur un super-ordinateur. En plus, ces méthodes utilisent souvent des moyens infographiques très sophistiqués qui facilitent grandement la transformation de quantités impressionnantes de données numériques en quelques représentations graphiques facilement interprétables [5].

Avec l'arrivée des méthodes théoriques de calcul et des ressources de computation plus accessibles. La chimie par ordinateur est maintenant accueillie comme un outil de plus en plus utile à la fois pour le milieu académique et l'industrie. La modélisation moléculaire par ordinateur d'une molécule implique généralement une présentation graphique de la géométrie ou de la configuration des atomes de la molécule suivie de l'application d'une méthode théorique, comme la mécanique quantique semi-empirique ou encore la mécanique moléculaire, pour évaluer les propriétés physiques de la molécule à étudiée [6].

Aujourd'hui, la modélisation moléculaire nous permet de traiter des systèmes contenant plus d'atomes (molécules de solvant explicite pouvant atteindre des dizaines de milliers d'atomes, grandes surfaces moléculaires et protéines). De ce fait, un phénomène de compétition entre la taille des systèmes moléculaires et la puissance des superordinateurs est apparu [7].

La modélisation moléculaire est aujourd'hui mieux reconnue. D'ailleurs, en 1998, le prix Nobel de chimie a été décerné à John. A. Pople et Walter Kohn pour leurs travaux dans les domaines de la chimie informatique et de la modélisation moléculaire (chimie quantique) [8].

La modélisation moléculaire sert pour simuler des systèmes moléculaires, des méthodes de calculs théoriques telles que la mécanique quantique (MQ : *ab initio*, semi- empiriques), la dynamique moléculaire (DM), la mécanique moléculaire (MM) et, depuis quelques années et l'association MQ/MM qui paraît très porteuse.

Les molécules peuvent adopter de nombreuses conformations dont certaines correspondent à l'interaction avec un site actif ou au comportement en solution. La stabilité relative de ces conformations peut être évaluée par le calcul de l'énergie potentielle qui leur est associée. Trois méthodes principales de calcul de l'énergie sont mises en œuvre, elles sont généralement couplées à des méthodes de recherche de conformations et des minimiseurs mathématiques permettant de calculer les minima de la fonction d'énergie [9].

### **I-1 Mécanique Quantique :**

Les méthodes de la mécanique quantique, qui font appel à la distribution des électrons répartis en orbitales autour de la molécule, impliquent des temps de calcul souvent élevés qui limitent leur usage à de petites molécules [10]. Elles sont particulièrement adaptées au calcul des charges et des potentiels électrostatiques, à l'approche des mécanismes réactionnels ou à la polarisabilité [11].

### **I-2 Mécanique Moléculaire :**

L'énergie conformationnelle est la somme de termes d'interactions évaluées à partir de tables pré-calculées (les champs de force) contenant les constantes d'élongation, déformation, torsion, attraction et de répulsion électrostatique [12]. C'est la méthode la plus fréquemment retenue car elle produit les temps de calcul les plus courts.





## INTRODUCTION GENERALE

---

de 124 acides aminés, qui sont représentés sur la figure (1). La séquence débute par une lysine en haut de la figure (1) et s'achève par une valine (124).

La ribonucléase est une protéine globulaire dont la structure secondaire contient peu d'hélices  $\alpha$  (acides aminés 50 à 56, accolade en bas à gauche) ou de feuillets  $\beta$  (quelques segments antiparallèles en bas à droite) [15].

Quatre ponts disulfures maintiennent la structure tertiaire de cette protéine. Celui qui lie les cystéines 40 et 95, particulièrement visible en haut à droite de l'image(1), fixe la position des deux boucles situées dans cette région. Le site actif est formé des radicaux des acides aminés qui ont un contact direct (ou par l'intermédiaire d'une molécule d'eau) avec les atomes des substrats : Histidine 12, Lysine 41 et Histidine 119 [16].

Tous les organismes étudiés contiennent de nombreuses ribonucléases de différentes classes, ce qui montre que la dégradation de l'ARN est un processus très ancien et important. Nettoyeuses des ARN qui ne sont plus nécessaires, les ribonucléases jouent un rôle clé dans la maturation de l'ensemble des molécules d'ARN, aussi bien les ARN messagers qui transportent du matériel génétique pour la fabrication des protéines, que les ARN non codants retrouvés dans divers processus cellulaires [17]. En outre, des systèmes de dégradation d'ARN actifs sont un premier moyen de défense contre les virus à ARN et permettent de fournir des mécanismes immunitaires cellulaires plus avancés tels que retrouvés avec les ARNi .

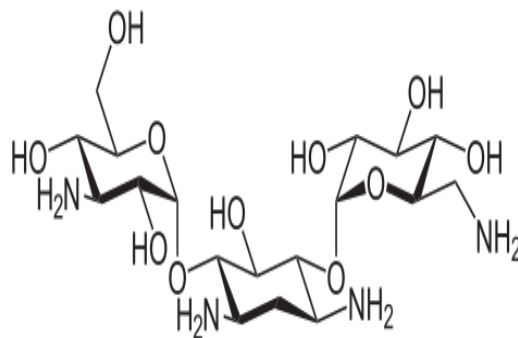
Un autre moyen de protection des ARN est l'existence d'un inhibiteur de la ribonucléase (RI), qui représente un pourcentage relativement important des protéines cellulaires environ 0,1% dans certains types de cellules et qui se lie à certaines ribonucléases avec une affinité bien supérieure à toute interaction protéine-protéine, la constante de dissociation pour le complexe RI-RNASE est d'environ 20 femtoMoles dans des conditions physiologiques. Le RI est utilisé dans la plupart des laboratoires qui étudient l'ARN pour protéger leurs échantillons contre la dégradation par les ribonucléases environnantes [18].

Semblables aux enzymes de restriction, qui clivent très spécifiquement des séquences d'ADN double brin, on a trouvé et classé un certain nombre d'endoribonucléases capables de reconnaître et de cliver certaines séquences d'ARN simple brin [19].

Les ribonucléases jouent un rôle critique dans de nombreux processus biologiques, comme l'angiogenèse et de l'auto-incompatibilité chez les plantes à fleurs (les angiospermes) [20]. Les ribonucléases semblent aussi intervenir dans les systèmes toxine-antitoxine responsables de la stabilité des loci (emplacement précis d'un gène sur un chromosome) des plasmides et comme éléments de réponse au stress, lorsqu'elles se présentent sur les chromosomes .

### **III- Les antibiotiques :**

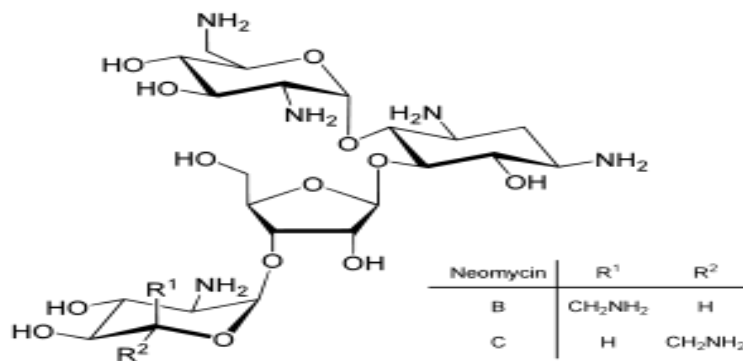
Les antibiotiques sont des substances chimiques qui agissent sur les bactéries de manière ciblée [21]. On connaît aujourd'hui plus de dix milles molécules antibiotiques dont une centaine est utilisée en médecine. Parmi les antibiotiques que nous avons choisi : la kanamycine, La néomycine, La streptomycine et La tobramycine qui font parti de la famille des aminosides.



**Kanamycine**

- Formule brute :  $C_{18}H_{36}N_4O_{11}$ .

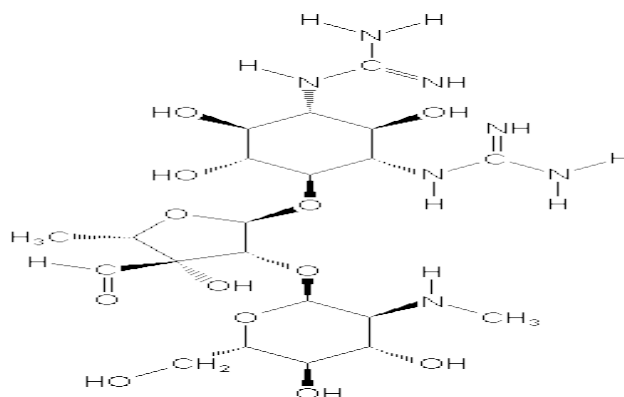
- Masse molaire : 484.4986g/mol [22].



**Néomycine**

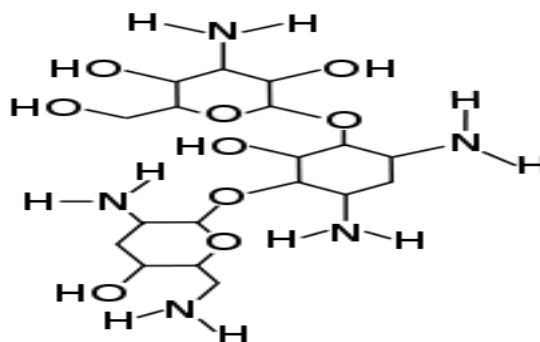
- Formule brute :  $C_{23}H_{46}N_6O_{13}$ .

- Masse molaire : 614.94g/mol [23].



**Streptomycine**

- Formule brute :  $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$ .
- Masse molaire : 581.5741g/mol [24].



**Tobramycine**

- Formule brute  $C_{18}H_{37}N_5O_9$ .
- Masse molaire : 467.5145 g/mol [25].
- Solubilité dans  $1g \cdot mol^{-1}$  d'eau à 25°C.

## INTRODUCTION GENERALE

---

Dans ce mémoire, une étude des interactions moléculaires entre la ribonucléase et les substrats a été réalisée grâce à outils de modélisation moléculaire selon le plan suivant : après une présentation des méthodes et des logiciels utilisés et des généralités sur les antibiotiques, les acides aminés, protéines et enzymes dans les cinq premiers chapitres, on passera à la sixième partie de ce mémoire qui concerne l'étude des interactions de la ribonucléase avec les différents substrats.

Après des minimisations d'énergie et un calcul de dynamique moléculaire effectués pour toutes les structures de départ est le positionnement de ces molécules dans le site actif de la ribonucléase. Pour cela, nous avons utilisé le module Docking moléculaire à l'aide logiciel Hexe4.

Une fois que le complexe ligand-récepteur est formé, celui-ci va adapter la conformation la plus stable correspondant à l'énergie la plus basse.

### Références:

- [1] R. Garrett, C. Grisham, H. Reginald. Biochimie. Éditions De Boeck Université, Paris. P125, **2000**.
- [2] L.A. Eriksson. Theoretical biochemistry, Processes and Properties of Biological Systems. Edition Elsevier, Amsterdam, P151, **2001**.
- [3] G. Náray- Szabó, Steric effects in biomolecules, Proceedings of International Symposium, Eger, Akadémiai Kiado/edition Elsevier, Budapest/ Amsterdam, P198, **1981**.
- [4] G. Náray-Szabó, I. Berente, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, Computer Modeling of Enzyme Reaction, 637-644, **2003**.
- [5] D. Liotta. *Advances in Molecular Modeling, Ed, JAI Press*, P1. **1988**.
- [6] J. Debord, Introduction à la modélisation moléculaire, 37-41, **2004**.
- [7] W. Van Gunsteren, Berendsen, H. J. C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 992-998, **1990**.
- [8] D. Morgan. Principles of CDK regulation. *Nature*; P374, **1995**.
- [9] H. Dugas, 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, **1996**.
- [10] C.M. Marle (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, **2003**.
- [11] E. Schrodinger, *Ann. phys. Leipzig*, P76, **1926**.
- [12] G. Grant, W. Richards, *Computational Chemistry*. Edition Oxford Chemistry Primers. **1995**.
- [13] J.A. McCammon, S.C. Harvey, *Dynamics of Proteins and Nucleic Acids* Cambridge. Edition Cambridge University Press, **1987**.
- [14] G. D'Alessio , J.F Riordan, *Ribonucléases : Structures et fonctions*, Pression d'universitaire, **1997**.
- [15] W.T. Schrader. *Ribonuclease: estrogenic control in rat uterus*. Edition Johns Hopkins University, P186, **1969**.
- [16] A.W. Nicholson. *Ribonucleases*. Edition Berlin Springer. P388, **2011**.

- [17] Centre national de la recherche scientifique (France). Centre de documentation. Bulletin signalétique: Biochimie, biophysique, génie biologique et médical, Volume 31, Numéros 1 à 6. Edition Centre de documentation du C.N.R.S. P261, **1970**.
- [18] A.M Vicentini, B. Kieffer, R. Matthies, B. Meyhack, B.A. Hemmings S.R. Stone, J. Hofsteenge. Biochimie 29. Edition Freidrich Miescher-Institut, Basel, Switzerland, P459, **1994**.
- [19] J.M. Messmore. Ribonuclease : exploring the function of the active-site lysine residue in catalysis and inhibition. Edition University of Wisconsin--Madison, P298, **1999**.
- [20] A.J. Scheffer. Horse pancreatic ribonuclease. Edition Groningen, P135, **1973**.
- [21] P. Chassagne, L. Georges-Janet, J.P Devaux. Les antibiotiques et leurs usages thérapeutiques dans la pratique médicale quotidienne. Edition Paris, Librairie Maloine, P451, **1967**.
- [22] F. Siegl. La Kanamycine: Étude expérimentale et clinique en dehors de la tuberculose. Edition Union franç. D'impr, P168, **1960**.
- [23] D.P. Barre, École nationale vétérinaire de Toulouse. Contribution a l'etude de la neomycine: indications veterinaires Volume 43 d'École Nationale Vétérinaire de Toulouse. Edition Imprimerie Parisienne, P 61, **1958**.
- [24] G.H. Werner. Recherches sur le mode d'action de la streptomycine. Edition Klausfelder, P91, **1949**.
- [25] D. Dumas, F. Gazagnes. Tobramycine et mucoviscidose: problème pratique: adaptation de posologie. Edition Quick print, P188, **1989**.

### I- Définition :

Un **antibiotique** (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») [1]

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique (produite par un micro-organisme: champignon microscopique ou bactérie), synthétique ou semi synthétique, qui agit sélectivement à faible concentration et en quelques heures sur une étape du métabolisme bactérien[2].

Exemples:

La pénicilline est produite par un champignon *penicillium notatum*.  
Le chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique.

### II- L'histoire des antibiotiques :

Les phénomènes de compétition chez les micro-organismes sont étudiés dès la fin du dix-neuvième siècle : en 1877 Pasteur et de Joubert constatent que lorsque des bactéries du charbon, *Bacillus anthracis* [3] sont injectées à un animal en même temps que des bactéries usuelles les animaux ne contractent pas la maladie. En 1897, le médecin français Ernest Duchesne soutient sa thèse de doctorat « Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes : antagonisme entre les moisissures et les microbes ». Il montre que les moisissures présentent une activité antimicrobienne : une culture d'*Escherichia coli* peut être éradiquée par l'introduction de *Penicillium glaucum* [4]. Il observe également cette activité in vivo : « certaines moisissures (*Penicillium glaucum*), inoculées à un animal en même temps que des cultures très virulentes de quelques microbes pathogènes (*B. coli* et *B. typhosus* d'Eberth), sont capables d'atténuer dans de très notables proportions la virulence de ces cultures bactériennes » [5]. Ses travaux ne seront pas poursuivis et il faut attendre près de trente ans pour que le hasard permette à Fleming de remettre en évidence l'action bactériostatique des moisissures.

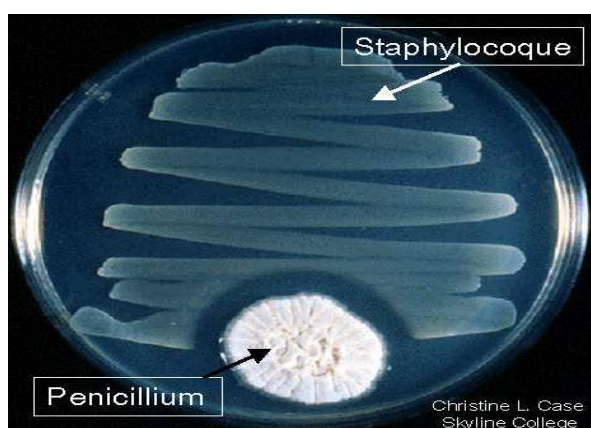
En septembre 1928, de retour de vacances, le docteur Alexander Fleming retrouve son laboratoire londonien et ses cultures de staphylocoques. Il a la mauvaise surprise de constater leur contamination par un champignon microscopique, *Penicillium notatum*, utilisé dans un laboratoire voisin. Ce genre de contamination n'est pas rare, mais avant de se débarrasser des cultures désormais



## CHAPITRE I : LES ANTIBIOTIQUES

---

inutilisables, il a le réflexe de les examiner attentivement [6]. Il constate que les staphylocoques ne se développent pas à proximité du champignon (figure 1), il émet alors l'hypothèse que ce dernier synthétise une substance qui bloque le développement de la bactérie et l'appelle « pénicilline ». Fleming publie sa découverte en 1929 et signale les possibilités thérapeutiques « la pénicilline utilisée en doses massives n'est ni toxique ni irritante... elle peut constituer, par applications ou en injections, un antiseptique efficace contre les microbes ». Mais la pénicilline est très difficile à purifier et isoler en quantités appréciables et elle est bientôt oubliée [7]. Il faut attendre une dizaine d'années avant qu'elle revienne sur le devant de la scène.



**Figure 1** : Découverte de la pénicilline par A. Fleming en 1928: Transformation vitreuse de colonies de staphylocoques.

Si le terme d'antibiose fut proposé en 1889 par Paul Vuillemin, en opposition au phénomène de symbiose, pour décrire le phénomène d'antagonisme entre deux espèces microbiennes, la paternité du terme antibiotique (sous forme adjectif ou substantif) est discutée : certains en créditent René Dubos (dès 1940) [8] ,d'autres Selman A. Waksman (en 1941, suite à sa découverte de la streptomycine qualifiée par lui de « médicament antibiotique »).

Waksman proposa en 1947 les définitions suivantes afin de diminuer les ambiguïtés sur le sens du terme antibiotique :

- antibiotique : « inhibition de la croissance ou des activités métaboliques de bactéries ou d'autres micro-organismes par une substance chimique d'origine microbienne »
- une substance antibiotique biochimique ou un antibiotique biochimique : « une substance chimique d'origine microbienne, possédant des propriétés antibiotiques » [9].

### III- Classification des antibiotiques :

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

**.Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

**.Mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.

**.Modalité d'action** : Etudie les interactions dans le temps entre des concentrations variables d'un antibiotique et d'une bactérie.

**.Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)

**.Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.)[10].

### IV- Mode d'action :

#### Action sur la paroi bactérienne :

L'antibiotique bloque la synthèse de la paroi par inhibition de la transpeptidase ce qui inhibe la synthèse du peptidoglycane. Ceci empêche la formation de nouvelles bactéries et peut entraîner la destruction de celles déjà existantes [11]. Les  $\beta$ -lactames (famille à laquelle appartient la pénicilline) agissent suivant ce mode d'action.

### **Action sur la membrane cellulaire :**

L'antibiotique a des propriétés de surfactant qui lui permettent de s'insérer parmi les phospholipides de la membrane externe. Cela perturbe la perméabilité membranaire (augmentation anormale) et permet la diffusion de substances hydrosolubles hors de la bactérie, ce qui entraîne sa destruction [12]. Les polymyxines (lipopeptides cycliques) agissent suivant ce mode d'action.

### **Action sur l'ADN :**

- l'antibiotique agit en se liant au complexe ADN-ADN gyrase bactérienne ce qui a pour effet d'inhiber la gyrase. Cet enzyme rajoute des supertours négatifs à l'ADN, préalable indispensable à l'ouverture de la double hélice [13]. Cela inhibe la réplication de l'ADN, indispensable à la formation de nouvelles bactéries, ainsi que la transcription. Les fluoroquinolones agissent suivant ce mode d'action (énoxacine) [14].

- l'antibiotique est un analogue structurel d'une molécule précurseur des bases entrant dans la composition des acides nucléiques. La bactérie va l'insérer dans son métabolisme mais les légères différences de structure entre l'antibiotique et le précurseur vont entraîner le blocage des voies métaboliques. La cellule ne peut plus synthétiser les acides nucléiques [15]. Les sulfamides agissent suivant ce mode d'action en entrant en compétition avec le PAB (acide para-aminobenzoïque), inhibant la dihydrosynthétase et de ce fait la synthèse d'acide folique [16].

### **Action sur la synthèse protéique :**

L'antibiotique interfère avec la synthèse protéique bactérienne en agissant sur les ribosomes. En effet, les ribosomes bactériens (constitués de deux sous-unité 30S et 50S formant un ribosome 70S) sont différents des ribosomes eucaryotes (constitués de deux sous-unités 40S et 60S formant un ribosome 80S) offrant la possibilité d'avoir des substances dont l'action est très spécifique [17]. Les tétracyclines (auréomycine) et les macrolides (érythromycine) agissent suivant ce mode d'action [18]. Les macrolides agissent au niveau de la sous-unité 50S, les tétracyclines agissent sur la sous-unité 30S.

### MODE D'ACTION DES ANTIBIOTIQUES

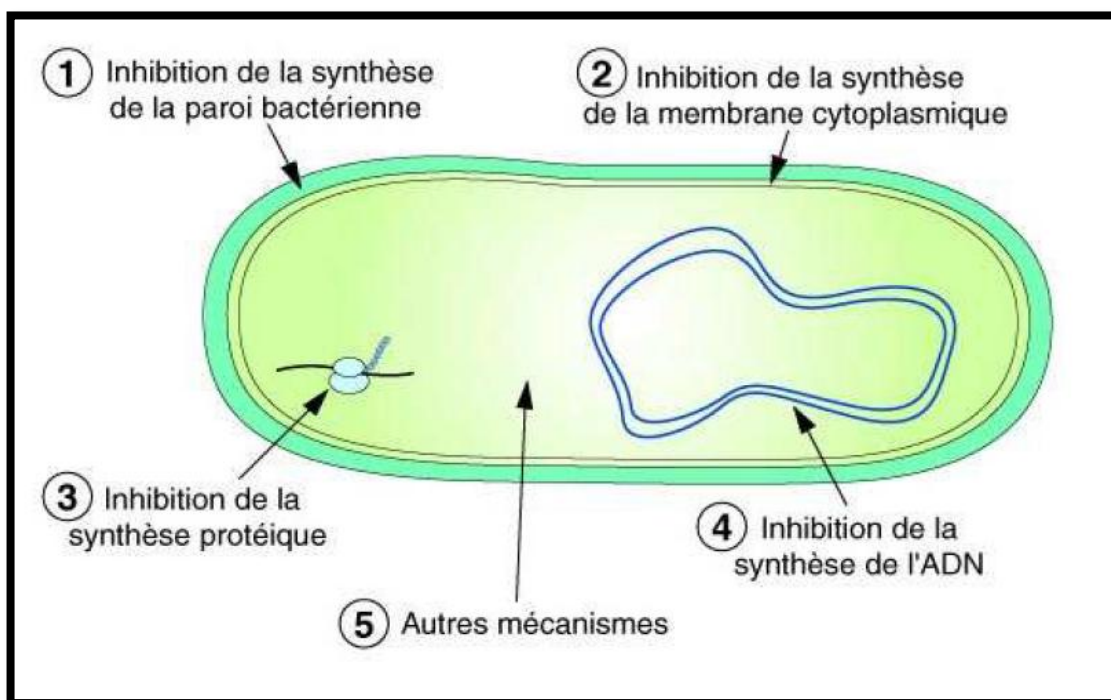


Figure2 : Structure d'une bactérie

#### V- Famille des antibiotiques :

Il existe plus de 10 000 molécules antibiotiques, mais seulement une centaine, dont un quart sont des pénicillines, sont efficaces et utilisables pour des applications thérapeutiques. Les autres sont trop toxiques, trop instables ou ont une biodisponibilité insuffisante chez l'homme [19]. La plupart des antibiotiques sont des produits naturels, synthétisés par des procaryotes, des champignons, des végétaux supérieurs ou des animaux [20].

Les plus courantes sont:

- 1- LES PÉNICILLINES** Les pénicillines appartiennent au groupe des bêta-lactamines. Le plus souvent bien tolérées, possédant un spectre d'activité assez large, essentiellement prescrites par voie orale, elles font partie des antibiotiques les plus couramment utilisés en médecine générale [21]. Elles peuvent cependant entraîner quelques cas d'allergies. Il en existe différentes catégories, les pénicillines A (amoxicilline) étant les plus

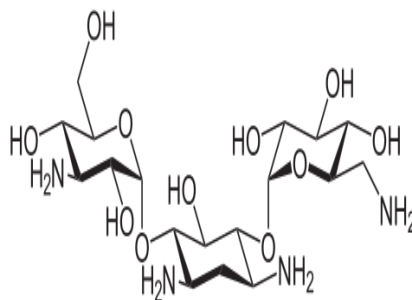
connues. Elles peuvent être associées à d'autres molécules (acide clavulanique) qui renforcent leur efficacité.

- 2- LES CÉPHALOSPORINES** Elles appartiennent également au groupe des bêta-lactamines. On les classe en céphalosporines de 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> générations. En médecine générale, elles sont essentiellement indiquées, par voie orale, dans le traitement des infections O.R.L. et bronchiques. En revanche, un bon nombre d'entre elles, injectables, est réservé à l'usage hospitalier. Elles sont en général bien tolérées mais peuvent être responsables d'allergie notamment chez les sujets allergiques aux pénicillines (5% des cas) [22].
- 3- LES MACROLIDES** Leur spectre d'activité est dit étroit. Ils sont utilisés essentiellement en médecine générale pour le traitement de certaines angines, notamment en cas d'allergie à la pénicilline, de bronchites et pour le traitement de la toxoplasmose chez la femme enceinte. Leur utilisation nécessite quelques précautions chez les sujets migraineux ou allergiques sous traitement (risque d'effets indésirables en association avec certains médicaments de la migraine ou de l'allergie) [23].
- 4- LES QUINOLONES** Les quinolones sont des antibiotiques à large spectre. Elles diffusent très bien dans l'ensemble de l'organisme et peuvent être administrées par voies locale, orale ou intraveineuse. Elles sont indiquées dans le traitement d'infections oculaires, digestives, uro-génitales, pulmonaires, ostéo-articulaires et de méningites [24]. Elles sont fréquemment responsables de troubles digestifs sans gravité, et peuvent entraîner une tendinite. Il ne faut pas s'exposer au soleil ou au rayonnement U.V. pendant leur utilisation (risque de photosensibilisation).
- 5- LES CYCLINES** Les cyclines sont actives sur les germes dits intracellulaires responsables, entre autres, d'infections génitales (mycoplasme, chlamydiae). On les prescrit également dans l'acné. L'exposition solaire est contre-indiquée [25].
- 6- LES AMINOSIDES** Les aminosides sont des antibiotiques d'action rapide et puissante [26]. Leur prescription est essentiellement hospitalière. Nous avons choisi cette classe d'antibiotiques comme inhibiteur.

### 6.1 La kanamycine (inhibiteur 1) :

La kanamycine est un antibiotique aminoside produit par *Streptomyces kanamyceticus* qui peut traiter une large variété d'infections. Cette molécule peut être utilisée par voie orale, intraveineuse ou intramusculaire [27].

La kamamycine permet de traiter les infections causées par de nombreuses souches bactériennes telles que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus species*, *Acinetobacter species*, *Serratia marcescens* et *Enterobacter aerogenes*. Elle peut aussi être utilisée en traitement secondaire contre *Mycobacterium tuberculosis*.



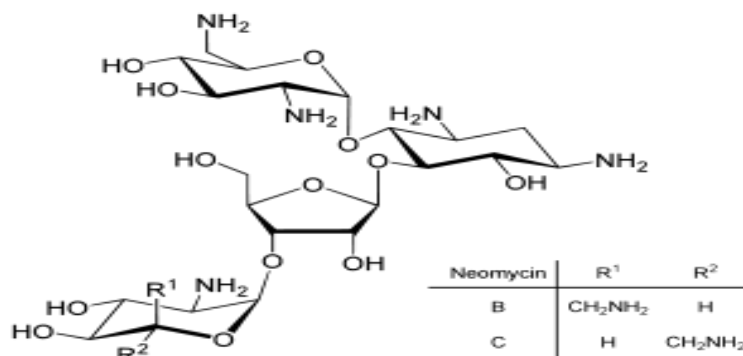
**Kanamycine**

La kanamycine ayant de nombreux effets secondaires, elle n'est pas utilisée en médecine humaine (cas de la France) ou rarement. Elle est par contre utilisée en médecine vétérinaire pour traiter les infections bactériennes [28].

### 6.2 La néomycine (inhibiteur 2) :

La néomycine, ou sulfate de néomycine, est un antibiotique de la famille des aminoglycosides (aminoside). Il est fabriqué à partir d'une culture de *Streptomyces fradiae*.

Il existe une sensibilisation croisée avec les autres antibiotiques de la même famille (framécétine, gentamicine, kanamycine, paramomycine, ribostamicine, streptomycine et tobramicine), mais pas avec la Bacitracine [29].

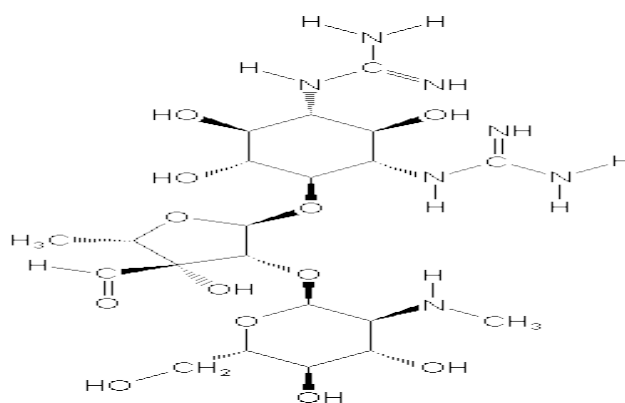


### Néomycine

La néomycine est un antibiotique aminoside proche de la gentamicine. On la trouve surtout dans divers médicaments topiques (locaux) tels des crèmes, pommades, collyres [30].

### 6.3 La streptomycine (inhibiteur 3) :

La streptomycine est un antibiotique de la drogue, le premier d'une classe de médicaments appelés aminosides à être découvert, et a été le premier remède antibiotique pour la tuberculose . Il est dérivé de l' actinobactérie griseus Streptomyces . La streptomycine est un antibiotique bactéricide. La streptomycine ne peut être donnée verbalement, mais doit être régulièrement administrés par injections intramusculaires [31].



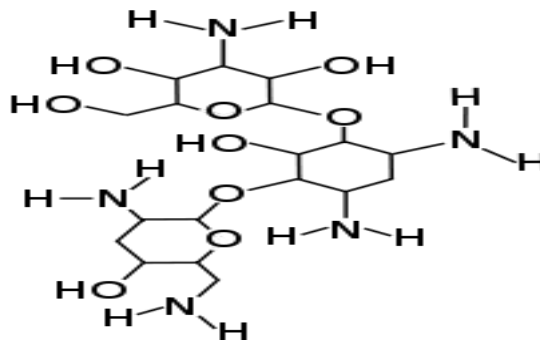
### Streptomycine

La streptomycine est une poudre de couleur blanc cassé issus de bactéries Streptomyces griseus [32]. Il est inodore et a un goût légèrement amer. Les formes de sels hygroscopiques, mais ne sont pas affectés par l'exposition à la lumière ou l'air [33]. Solutions neutres de la streptomycine sont stables pendant des semaines à

des températures inférieures à 25 °C. La streptomycine est plus active à un pH alcalin. Il est instable dans les acides et alcalins forts. Elle est incompatible avec les matières alcalines [34.35].

### 6.4 La tobramycine (inhibiteur 4) :

Solide inodore blanc à blanc cassé. Un aminoside à large spectre antibiotique produit par *Streptomyces tenebrarius*. Il est efficace contre les bactéries Gram négatif, en particulier les espèces de *Pseudomonas*. C'est un composant de 10% du complexe antibiotique, nebramycine, produit par la même espèce [36.37].



**Tobramycine**

On citera également **LES PHÉNICOLÉS, LES RIFAMYCINES, LES POLYPEPTIDES, LA FOSFOMYCINE, LES SULFAMIDES, LES ANTITUBERCULEUX . . .** Ils sont d'utilisation plus spécifique et donc moins fréquente.



### **Références :**

- [1] S. Pinnert, H. Alberto. Les antibiotiques. Edition Dunod, P 150. **1971**.
- [2] J.I. Avril. Les antibiotiques : Que sais-je ? Edition Presses Universitaires de France, P 127. **1980**.
- [3] M. de Clerck. Les antibiotiques: du bon usage des antibiotiques, antipaludiques, antiparasitaires. Edition Bureau d'études et de recherches pour la promotion de la santé, P 291. **1993**.
- [4] M. Neuman. Les antibiotiques : Numéro 132 de Monographies Medicales et Scientifiques . Les Monographies médicales et scientifiques. Numéro spécial. Edition Editions leures de France, P112. **1968**.
- [5] S.A. Waksman. Les antibiotiques : Volume 4 de Medecine et biologie. Edition Masson & Cie, P 107. **1947**.
- [6] J.P. Labro. Les Antibiotiques: leur histoire, aperçu de leur utilité au cabinet dentaire. Edition Chir. dent. --Clermont-Ferrand 1, P 5.**1977**.
- [7] M. Masson, J. Richard, Société Radio-Canada. Les antibiotiques. Edition Société Radio-Canada, P 11. **2001**.
- [8] J.M. Saudubray. Les antibiotiques: bases théoriques et règles générales d'utilisation, sous la direction de J.-M. Saudubray. Numéro 26 de Le Perfectionnement privé et permanent du praticien. Edition Institut national de promotion internationale, P 62. **1969**.
- [9] J. Fleurette, Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Lyon. Chaire de bactériologie, virologie, immunologie. Les antibiotiques: plans de cours. Edition Impr. nouvelle, P 22. **1967**.
- [10] T. Eberlin. Les antibiotiques: classification, mode d'action, utilisation thérapeutique. Volume 53 de 128. Sciences. Volume 53 de Collection 128. Edition Nathan, P 128.**1994**.
- [11] C. Morel, R. Marcy. Les Antibiotiques: mécanismes d'action, antibiorésistance, et son exploration au laboratoire. Numéro 6 de Conférences post-universitaires de Basse-Normandie. Edition U.E.R. des sciences pharmaceutiques : Société de pharmacie, P 17. **1973**.
- [12] J. Asselineau, J.P. Zalta, J.R. Boissier. Les antibiotiques: structure et exemples de mode d'action. Volume 1353 d'Actualités scientifiques et industrielles. Edition Hermann, P 364. **1973**.

## CHAPITRE I : LES ANTIBIOTIQUES

---

- [13] C. Martin. Urgences et infections: Guide du bon usage des antibiotiques, antifongiques. Edition Editions Arnette, P 9. **2008**.
- [14] S.A. Waksman. Les antibiotiques; trois conférences. Volume 4 de Médecine et biologie. Edition Masson, P 107. **1947**.
- [15] Y. Mouton. Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux. Edition John Libbey Eurotext, P 261. **1997**.
- [16] A. Molinier, J. Massol. Molinier: pathologie médicale et pratique infirmière, Volume 3. Edition Editions Lamarre, P 39. **2002**.
- [17] C. Nauciel, J.L. Vildé. Bactériologie médicale. Edition Elsevier Masson, P 257. **2005**.
- [18] F. Denis, M.C. Poly, C. Martin, E. Bingen. Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Edition Masson, P 143. **2007**.
- [19] A. Carbon, C. Crémieux, J.J. Pocidalò. Traitement antibiotiques courts. Edition Arnette, P 87. **1995**.
- [20] Y.M. Briand. Une histoire de la résistance aux antibiotiques : a propos de six bactéries. Edition L'Harmattan, Paris. P 3. **2009**.
- [21] C. Perronne. Maladie infectieuses, Volume1. Edition DOIN, P 126. **1999**.
- [22] J.J. Jalladeau. Les familles d'antibiotiques: essai de mise au point actuelle. Edition Université de Paris V, Cochin-Port-Royal, P 8. **1975**.
- [23] R. Bédry, B. Lianas, V. Danel, M. Fayon. Guide pratique de toxicologie pédiatrique. Edition Arnette, P 279. **1999**.
- [24] A. Eyquem, J.E. Alouf, L. Montagnier. Traité de microbiologie clinique: troisièmes mises à jour et compléments. Edition PICCIN, P 107. **2003**.
- [25] C.P. Page, M.J. Curtis, M.C. Sutter, M.J. Walker, B.B. Hoffman. Pharmacologie intégrée. Edition De Boeck Supérieur, P 616. **1999**.
- [26] J. Brisou. Les bactéries marines: halophilie, psychrophilie, bioluminescence, barophilie, taxinomie, techniques d'étude. Volume 4 de Collection de biologie des milieux marins. Edition Masson, P 209. **1980**.
- [27] F. Siegl. La Kanamycine: Étude expérimentale et clinique en dehors de la tuberculose ,Edition Union franç. D'impr, P168, **1960**.
- [28] H. Demoulin. Kanamycine et pédiatrie. Edition Société industrielle graphique, P 70. **1962**.

- [29] D.P. Barre, École nationale vétérinaire de Toulouse. Contribution a l'etude de la neomycine: indications veterinaires. Volume 43. Edition Imprimerie Parisienne, P 61. **1958**.
- [30] R. Eckert, D. Randall. Physiologie animale: mécanismes et adaptations. Biologie générale. Edition De Boeck Supérieur, P 236. **1999**.
- [31] M. Morin. La streptomycine. Edition Masson, P 509. **1949**.
- [32] R. Debré, H.E. Brissaud, S. Thiéfry, Hôpital Des Enfants-Malades, Paris Clinique Medicale des Enfants. La streptomycine: appliquée au traitement de la méningite tuberculeuse et de la tuberculose miliaire chez l'enfant. Edition Masson, P 203. **1948**.
- [33] L. Manuila. La streptomycine: Historique - pharmacologie - applications thérapeutiques. Volume 5 de Monographies scientifiques. Edition F. Rouge, P 189. **1949**.
- [34] A. Abaza. La Streptomycine: étude expérimentale et thérapeutique, par Alphonse Abaza. Edition G. Doin, P 95. **1947**.
- [35] Canada, Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire Staff. Streptomycine. Edition Canadian Government Publishing, P 5. **2008**.
- [36] D. Dumas, F. Gazagnes. Tobramycine et mucoviscidose: problème pratique : adaptation de posologie. Edition Quick print, P 188. **1989**.
- [37] A.M. Barnett. Utilisation de la tobramycine, efficacité, tolérance: à propos de 31 observations en chirurgie digestive. Edition Méd. Bordeaux 2, P 12. **1978**.

### **Introduction :**

La recherche et la synthèse de nouveaux composés chimiques et biochimiques sont aujourd'hui souvent associées à une étude par modélisation moléculaire. La modélisation moléculaire est un terme générale qui englobe différentes technique de graphisme moléculaire et de chimie computationnelle permettant de dessiner, affiche, analyser, calculer et stocker les propriétés des molécules.

La modélisation moléculaire implique l'utilisation des méthodes de calcul théoriques (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire, mécanique quantique ab-initio ou semi empirique,...) permettant de déterminer la représentation graphique de la géométrie ou de la configuration des atomes d'une molécule et d'évaluer les propriétés physico-chimiques de la molécule étudiée. La modélisation moléculaire associée à une représentation infographique des stéréochimies permet d'interpréter des phénomènes physico-chimiques, de suggérer des nouvelles expériences et d'analyse ainsi des résultats d'une façon plus critique que les expériences classiquement utilisées, mais ces deux approches purement théoriques ou expérimentales sont complémentaires.

Le comportement des molécules peut être simulé de façon statistique ou dynamique. Cette simulation inclut notamment la flexibilité des molécules en solution, les mécanismes réactionnels et les interactions mises en jeu dans la catalyse enzymatique, la reconnaissance ou la complexation, la prédiction de propriétés et de fonctionnalités à partir d'analogies de structure.

La modélisation moléculaire à pour but de prévoir la structure et la réactivité des molécules ou des systèmes de molécules. Les méthodes de la modélisation moléculaire peuvent être rangées en trois catégories [1] :

- les méthodes quantiques.
- La mécanique moléculaire.
- La dynamique moléculaire.

### **I- Méthodes quantiques :**

La mécanique quantique est le prolongement de la théorie des quanta, issue des travaux de Planck, de leur interprétation par Einstein et de leur application à la théorie atomique par Bohr et Sommerfeld. Elle explique la quantification de certaines grandeurs (énergie, moment cinétique) et fait émerger le principe d'exclusion de Pauli. La nouvelle conception des particules qui découle de la dualité onde corpusculaire, explicitée dans les travaux de De Broglie (1923) conduit à la mécanique ondulatoire.

Les méthodes de la mécanique quantique, qui font appel à la distribution des électrons répartis en orbitales autour de la molécule, impliquent des temps de calcul souvent élevés qui limitent leur usage à des petites molécules ou nécessitent le recours à de nombreuses approximations. Elles sont particulièrement adaptées au calcul des charges et des potentiels électrostatiques, à l'approche des mécanismes réactionnels ou à la polarisabilité. L'objectif de la mécanique quantique est principalement de déterminer l'énergie et la distribution électronique [2].

La chimie quantique définit la structure moléculaire comme un noyau autour duquel gravitent des électrons, qui sont décrit par leur probabilité de présence en un point et représentés par des orbitales [3]. Les équations de la chimie quantique sont basées sur la résolution de l'équation de SCHRÖDINGER qui s'écrit pour les états stationnaires [4] :

$$\hat{H}\Psi = E\Psi$$

Où :

$\Psi$  : Fonction d'onde de la molécule.

$H$  : Hamiltonien total d'une molécule comportant  $N$  noyaux et  $n$  électrons.

Il est défini par la somme de cinq termes (cinétique des électrons, cinétique des noyaux, répulsion entre électrons, répulsion entre noyaux et le terme d'attraction électrons -noyaux).

$E$  : Energie totale d'une molécule.

La résolution exacte de cette équation n'est possible que pour l'atome d'hydrogène et les systèmes **mono-électroniques**. Pour les systèmes **poly-électroniques**, on fait appel aux méthodes d'approximation, pour la résolution approchée de l'équation de SCHRÖDINGER.

### **I-1 méthodes *ab-initio* (Hartree-fock-roothann):**

Les méthodes *ab-initio* sont des méthodes non empiriques, toutes les intégrales sont rigoureusement et il n'y a pas d'approximation à faire sauf celle de Born Oppenheimer et l'approximation OM-CLOA.

Dans les méthodes *ab-initio*, toutes les particules (noyau et électrons) sont traitées explicitement. On n'utilise aucun paramètre empirique dans le calcul de l'énergie.

### **I-2 méthodes semi-empiriques :**

Dans les méthodes *ab-initio* le quasi totalité du temps de calcul est consommé par les calculs des intégrales, et dans le but de réduire ce temps de calcul, il est nécessaire de simplifier les équations de Roothann.

Une méthode semi-empirique est une méthode dans laquelle une partie des calculs nécessaires aux calculs Hartree-Fock est remplacé par des paramètres ajustés sur des valeurs expérimentales (l'hamiltonien est toujours paramétrée par comparaison avec des références). En générale toutes ces méthodes sont très précises pour des familles de produits données voisines de celles utilisées pour la paramétrisation.

Les méthodes semi-empiriques ne considérant que les électrons de la couche de valence ; les électrons des couches internes sont inclus dans le cœur nucléaire.

- **CNDO/2** : (Complète Neglect of Differential Overlap/version 2) 1ere méthode semi empirique, elle a été proposée par Pople, Segal et Santry en 1965. Méthode présentant certains défauts entre autres : elle ne tient compte de la règle de Hund.
- **INDO** : (intermediate Neglect of Differential Overlap) proposée par Pople Beveridge et Dobosh en 1967. Elle permet de distinguer entre les états Singulets et les états triplets d'un système en conservant les intégrales d'échange.
- **MINDO/3**: Proposée par Bingham, Dewar et Lo en 1975. Parametisation effectuée en se référant aux résultats expérimentaux et non pas aux résultats *ab-initio*, de plus l'algorithme d'optimisation utilise est très efficace (Davidon-Fletcher-Powell).

Cependant, elle surestime la chaleur de la formation des systèmes instables et sous-estime celle des molécules contenant des atomes voisins ayant des paires libres.

- **MNDO**: (Modified Neglect of Diatomic Overlap) Proposée par Dewar et Thiel en 1977. Méthode basée sur l'approximation NDDO (Neglect of Diatomic Differential Overlap) qui consiste à négliger le recouvrement différentiel entre orbitales atomiques sur des atomes différents. Cette méthode ne traite pas les métaux de transition et présente des difficultés pour les systèmes conjugués.
- **AM 1** : (Austin Model 1) Proposée par Dewar en 1985. Il a tenté de corriger les défauts de MNDO.
- **PM 3** : (Parametric Method 3) Proposée par Stewart en 1989. Présente beaucoup de points en commun avec AM1, D'ailleurs il existe toujours un débat concernant les mérites relatifs de paramétrisation de chacune d'elles.
- **SAM 1** : (Semi-*ab-initio* Model 1) La méthode la plus récente proposée par Dewar en 1993. Elle inclut la corrélation électronique [5].

### **II- La Mécanique Moléculaire :**

La mécanique moléculaire est basée sur l'approximation de Born-Oppenheimer selon laquelle les électrons sont beaucoup plus rapides que les noyaux et ces derniers sont donc implicitement traités. La mécanique moléculaire est une méthode empirique où les atomes (les noyaux) sont représentés par des masses ou des sphères, et les liaisons par des ressorts de différentes forces. Les valeurs de ces forces proviennent de données expérimentales de spectroscopie vibrationnelle (IR, Raman), de données de diffraction de rayons X ou de valeurs obtenues par les méthodes *ab-initio*. Le calcul de l'ensemble de ces forces, selon les règles établies pour les oscillateurs harmoniques, permet d'obtenir l'énergie moléculaire et de déterminer la structure tridimensionnelle.

La mécanique moléculaire est une méthode non quantique, mais elle a un intérêt pour les grands systèmes ; comme dans le cas des systèmes biologiques qu'on ne peut aborder avec les méthodes quantiques [6]. La mécanique moléculaire (MM), appelée parfois " calcul par champ de force empirique " [7-8], nous permet de minimiser l'énergie afin d'obtenir des conformations à basse énergie de notre

système moléculaire et de réduire des forces initiales trop grandes qui aboutiront à une trajectoire aberrante [9].

La mécanique moléculaire ressemble aux modèles de type " tiges et boules". Elle a que la somme de toutes les contributions énergétique est minimisée ; ses résultats concernant surtout la géométrie et l'énergie du système. L'idée directrice de cette méthode est d'établir par le choix des fonctions énergétiques et des paramètres qu'elles contiennent, un modèle mathématique, le " **CHAMP DE FORCE**", qui représente aussi bien que possible les variations de l'énergie potentielle avec la géométrie moléculaire [10]. Son but de calculer l'énergie potentielle d'une molécule (ou d'un système de molécule) en fonction de coordonnées des atomes :

$$E_p = f(r_1, r_2, \dots, r_n)$$

Où  $r$  représente le vecteur position de l'atome  $i$ .

La mécanique moléculaire utilise les approximations suivantes ;

- ❖ chaque atome constitue une particule ;
- ❖ l'atome est considéré comme une sphère rigide ayant un rayon et une charge déterminée ;
- ❖ les énergies sont calculées par des formules dérivées de la mécanique classique [11].

### **II-1 Champ de force :**

Compte tenu de la taille des systèmes étudiés en biologie, l'utilisation de la mécanique quantique n'est pas possible. Les macromolécules sont représentées comme un ensemble d'atomes ponctuels dont les interactions sont décrites par un potentiel semi-empirique ou champ de force.

On appelle champ de force le modèle mathématique représentant l'énergie potentielle d'une molécule en mécanique moléculaire.



Le champ de force exprime réellement à la moyenne les interactions électroniques entre les atomes [12].

Le champ de force permet d'accéder à l'hypersurface énergétique d'une molécule en établissant un lien entre les déformations structurales du système et son énergie potentielle. Il désigne à la fois l'équation mathématique (fonction d'énergie potentielle) et les paramètres qui la composent [13]. La fonction d'énergie potentielle définit une énergie empirique, l'énergie totale étant décomposée en une somme de termes additifs représentant chacun des interactions inter atomiques. Elle est exprimée comme une somme de contributions de plusieurs types d'interaction [14-15]. Elle peut se décomposer en termes d'interaction intramoléculaire et un terme d'interaction intermoléculaire.

Les interactions intramoléculaires ne dépendent que des coordonnées internes des molécules c'est-à-dire des liaisons, des angles de valence, et de torsions. En fait pour affiner l'expression du terme potentielle est rendre plus fidèle la description du système, des termes de couplages entre différents atomes ont été introduit. Le potentielle intramoléculaire peut s'écrire de façon générale

$$V_{\text{int ra}} = \sum_{\text{liaison}} V_{\text{élongation}} + \sum_{\text{angles}} V_{\text{courbure}} + \sum_{\text{anglesdiédres}} V_{\text{torsion}} + \sum V_{\text{croisé}}$$



Les interactions intermoléculaires prennent en compte les interactions qui n'interagissent pas par des termes de liaison, d'angle de courbure et d'angle de torsion. Le potentiel non liant s'exprime en deux termes : un terme de Van der Walls et un terme d'énergie électrostatique. On a donc :

$$V_{\text{int moléculaire}} = \sum_{\text{atomes non liés}} V_{\text{van der Walls}} + \sum_{\text{atomes non liés}} V_{\text{électrostatique}}$$

Donc l'énergie stérique s'exprime par l'équation suivante :

$$E = E_{\text{stretching}} + E_{\text{bending}} + E_{\text{torsion}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{elec}} + E_{\text{hydrogen}}$$

Le terme « Stretching » représente l'élongation des liaisons.

Le terme « Bending » représente la variation des angles.

Le terme « Torsion » se rapporte à l'énergie de torsion des angles dièdres.

Le terme « VdW » rend compte des énergies d'interaction non covalente entre atome non liés.

Le terme « Elec » rend compte des énergies d'interaction électrostatiques entre atomes non liés.

Le terme « Hydrogen » rend compte des liaisons d'hydrogènes.

Il est important de noter que les champs de forces constituent une approche purement empirique. Ils sont paramétrés de manière à ce que l'ensemble des différentes contributions permette de reproduire une série de résultats expérimentaux. Un champ doit donc toujours être considéré comme une entité indivisible et il est exclu de combiner les termes et/ou les paramètres de deux champs dans l'espoir d'obtenir un meilleur ensemble [16]. En outre, le paramétrage vise souvent à ce que le champ de forces puisse traiter de manière réaliste une catégorie particulière de composés. On peut ainsi trouver des champs destinés plus spécialement à la modélisation de petites molécules organiques de macromolécule [17], de nucléotides [18] ou encore de complexes organométalliques. Il est donc dans un premier temps important de vérifier si le champ choisi est adapté au système à étudier.

### **II-2 Différents champs de force en mécanique moléculaire :**

Différents champs de force utilisent le même type de termes énergétiques mais paramétrés de manières différentes. Les champs de forces en MM peuvent être groupés en trois classes principales [19] :

- ❖ Champs de force contenant uniquement les termes harmoniques.
- ❖ Champs de force utilisant les termes d'ordre supérieur (cubique, quadratique,...).
- ❖ Champs de force suggères par Allinger et col. [20] ne considérant pas que les termes de la mécanique moléculaire classique mais aussi les effets chimiques comme l'électronégativité.

### - **MM2/MM3/MM4 :**

MM2 est le premier champ de force développé par Allinger et Col. [21-22]. Il a été conçu au début pour les molécules simples (alcane, alcène, alcyne non conjugués, amines...), mais ses versions améliorées MM3 (1989) [23] et MM4 (1996) [24] lui permet de traiter des molécules organiques de plus en plus complexes.

### - **OPLS :**

Le programme OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations), comme l'indique son nom, est conçu pour optimiser le potentiel qui permet la description des propriétés de solvation. Il est écrit par W. L Jorgensen et J. Tirado Rives [25].

### - **GROMOS :**

GROMOS (Groningen Molecular Simulation Program Package), est écrit par Van Gusteren [26] est conçu spécialement pour les biomolécules en milieu aqueux en vue de l'étude des interactions entre les molécules d'eau et les groupements polaires des protéines.

### - **CHARM (Bio+) :**

Développé par Karplus et col [27-28], pour le calcul de biomolécules. Son concept est semblable à celui d'AMBER. Bien qu'au début, ce champ de force est conçu pour les acides aminés et les protéines, maintenant il traite d'autres biomolécules.

### -**SPASIBA :**

(Spectroscopic Potential Algorithm for Simulating biomolecular conformational Adaptability), élaboré par Gérard Vergoten et col. (1995).

Il combine le champ de force spectroscopique modifiée de Urey-Bradly-Shimanouchi [29] et le champ de force AMBER. Il permet de trouver les structures, les énergies de conformation et les fréquences vibrationnelle au minimum énergétique d'une molécule [30].

### **- EMO :**

Le programme EMO (Energy Of Molecule), est développé par B. Blaive [31-32-33-34], il est basé sur le champ de force MM2. Il est articulé autour de trois menus :

Menu 1 : entrée de la molécule à l'aide d'un clavier.

Menu 2 : manipulation géométrique sur la molécule.

Menu 3 : minimisation de l'énergie par mécanique moléculaire.

### **-AMBER:**

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), a été écrit par Kollman [35]. Le champ est paramétré pour les protéines et les acides nucléiques (UCSF, 1994). Il a été utilisé pour les polymères et pour d'autres petites molécules [36]. Dans le cadre de ces travaux, nous utiliserons ce champ de force, puisque on va traiter les protéines.

## **III- Dynamique Moléculaire :**

La dynamique moléculaire a pour but de calculer les mouvements des molécules, le plus souvent à partir des énergies de la mécanique moléculaire, en appliquant les lois de la mécanique classique. Ces mouvements correspondent à des vibrations autour d'un minimum ou au passage d'un minimum local [37]. C'est une technique qui permet de simuler l'évolution des systèmes dans le temps. Elle prend en compte l'effet de la température, de la pression et du temps, calcule les trajectoires des atomes et rend compte de la flexibilité des molécules, leur comportement en solution ou les modes de vibration.

### **III-1 Principe de la dynamique moléculaire :**

La dynamique moléculaire [38], consiste à étudier la trajectoire d'une molécule en lui appliquant les lois de la mécanique classique newtonienne. Une molécule est considérée comme un assemblage d'atomes dont les positions spatiales varient au

cours du temps. Chaque atome est considéré comme une masse ponctuelle dont le mouvement est déterminé par l'ensemble des forces qui s'exercent sur elle [39]. Il en résulte un mouvement atomique correspondant à des oscillations autour d'un minimum d'énergie ou au passage d'un de ces minima à un autre. La dynamique moléculaire possède ainsi la faculté d'extraire la molécule d'un minimum local. Cette technique repose sur l'intégration des équations de mouvements de Newton pour chaque atome  $i$  :

$$\vec{F}_i(t) = m_i \cdot \vec{a}_i(t) \quad (1)$$

Où :

$m_i$  : Masse de l'atome  $i$

$\vec{a}_i$  : Accélération de l'atome  $i$

$\vec{F}_i$  : Force s'exerçant sur l'atome  $i$

L'accélération étant dérivée des coordonnées  $\vec{r}_i(t)$  d'un atome  $i$  à un instant  $t$ , on en déduit que :

$$\vec{F}_i(t) = m_i \cdot \frac{d\vec{v}_i(t)}{dt} = m_i \cdot \frac{d^2\vec{r}_i(t)}{dt^2} \quad (2)$$

Si  $\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n$  sont les coordonnées des différents atomes à un instant  $t$ , on peut déterminer la force  $\vec{F}_i$  qui s'exerce à cet instant sur un atome  $i$  par dérivation par rapport à ses coordonnées spatiales de la fonction énergie potentielle  $E(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_n)$

Pour obtenir la trajectoire des atomes en fonction du temps, on va réaliser une intégration numérique sur un court intervalle de temps des équations de mouvements. Ces équations de mouvements sont déterministes. Il faut, pour réaliser une simulation de dynamique moléculaire, partir d'une structure raisonnable du système (expérimentale ou modèle) que l'on veut étudier et on déterminera les coordonnées et vitesses initiales en procédant ainsi :

- Une minimisation d'énergie du système fournira le jeu de coordonnées de départ de la dynamique. Cette étape de minimisation nécessaire permet d'éviter qu'une énergie mécanique trop forte ne détériore l'assemblage moléculaire dès le début de la production de dynamique moléculaire.

-les vitesses de départ des atomes sont attribuées aléatoirement à partir d'une distribution gaussienne de maxwell-Boltzman correspondant à la température T [40].

### **III-2 Un calcul de dynamique moléculaire :**

Une dynamique moléculaire se compose de quatre phases distinctes :

#### **Initialisation :**

La dynamique moléculaire requiert un jeu de coordonnées et vitesses initiales. La géométrie de départ utilisée provient d'une structure établie expérimentalement lorsque c'est possible, si non elle générée à partir du champ de force utilise. L'énergie du système est minimisée afin d'éliminer toutes les interactions fortement défavorable, qui, si elles étaient conservées, perturberaient la simulation. Les vitesses initiales sont attribuées selon la statistique de Boltzmann.

#### **Thermalisation :**

Il s'agit de chauffer le système pour l'amener à la température souhaitée.

On utilise comme structure initiale la structure minimisée.

On tire aléatoirement le jeu de vitesse initiale, soit à Zéro à des vitesses correspondants à quelques dizaines de Kelvin. On intègre ainsi les équations du mouvement en multipliant régulièrement les vitesses afin d'augmenter la température jusqu'à la température de référence (généralement 300K).

Une montée en température demande en général 2 à 10ps de simulation (200 à 1000 pas d'intégration  $\Delta t$ ).

#### **Equilibration :**

C'est une phase importante au cours de laquelle on stabilise la température du système, il y a alors un échange important entre énergie potentielle et énergie cinétique. C'est une phase où on contrôle régulièrement la température que l'on ramène dans la fenêtre souhaitée. La température de déviation se fait suivant un

processus de relaxation ou la température est recalculée après chaque étape et ramenée à la température de référence par la formule :

$$d/dtT = \tau^{-1} (T_0 - T)$$

Avec  $\tau$  : temps de relaxation.

$T_0$  : Température de référence

$T$  : Température du système.

Durant la phase d'équilibration la valeur de  $\tau$  doit être assez petite pour permettre un couplage efficace (généralement  $\tau = 10$  fs) Cette phase peut durer de 10 à 20 ps.

### **Dynamique ou production :**

C'est la phase réellement exploitable qui dure en moyenne de 60 à 100 ps. Au cours de cette simulation, on doit sauvegarder les conformations, énergies...toutes les 0.05 ou 0.1 ps.

La dynamique la plus classique se fait à température constante avec un scaling des vitesses, mais un temps de relaxation plus grand (0.1 à 0.4 ps) pour permettre d'évaluer l'équilibre propre du système.

Il est conseillé d'enlever les contraintes ( $\Delta t = 2$  fs) durant cette phase de dynamique.

### **IV- Docking Moléculaire (Arrimage Moléculaire) :**

Les interactions récepteur-ligand jouent un rôle important dans tous les processus biologiques et la compréhension théorique de ces interactions est d'une grande importance pour une nouvelle recherche pharmaceutique.

Les outils de modélisation moléculaire sont particulièrement performants pour l'étude au niveau atomique d'interactions entre deux entités moléculaires et ce type d'étude fait appel le plus souvent aux techniques de « DOCKING » [41].

Le Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe formé par deux molécules, la formation de ces complexes est fondée sur la reconnaissance de la structure tridimensionnelle d'un ligand par site récepteur et contrôle de l'activité de nombreuses molécules [42].

Le plus souvent, le récepteur est une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques, plus ou moins accessibles selon les cas. Le ligand, est

généralement une molécule flexible étrangère de petite taille. La liaison entre le ligand et le récepteur introduit un signal biologique qui peut avoir diverses formes [43].

Par exemple, certains récepteurs sont des protéines membranaires permettant le passage sélectif de certaines molécules (ions, nutriments) à l'intérieur de la cellule, d'autres sont des enzymes dont l'activité est fonction de l'affinité spécifique avec un substrat.

Le Docking moléculaire est l'étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes moléculaires telle que :

- Les interactions VDW.
- Les interactions électrostatiques.
- Les interactions Hydrogènes.

Le but du Docking moléculaire est de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou de plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur [44].

Toutes les méthodes du « DOCKING MOLECULAIRE » peuvent être décomposées en trois étapes :

- Caractérisation du récepteur et l'identification du site de fixation.
- L'orientation du ligand dans le site de récepteur.
- L'évaluation de l'orientation du ligand et de son adéquation au récepteur.



### Références :

- [1] C. Audouze. Vers une parallélisation par bandes en chimie quantique, Laboratoire de Mathématique, UMR CNRS 8628, Université Paris-Sud, P8 .**2003**.
- [2] H. Dugas. Principes de base en modélisation moléculaire, Aspects théorique et pratiques, Chapitre3 introduction aux méthodes de minimisation d'énergie ,quatrième édition, Librairie de L'Université de Montréal. **1996**.
- [3] B. Donald, K. Boyd, B. Lipkowitz, Molecular Mechanics. The Method and Its Underlying Philosophy. *Chem. Educ* , P59. **1982**.
- [4] E. Schrodinger, *Ann.Phys.Leipzig*, P 76. **1926**.
- [5] S.M. Mekelleche .Cours de post-graduation; option; chimie théorique: **2000-2001**.
- [6] P. Chaquin, Manuel de chimie théorique, application à la structure et la réactivité en chimie moléculaire, P190. **2000**.
- [7] J.E. Williams, P. Von, R. Schleyer, . *Physic-Chemestry*, P19, **1968**.
- [8] U. Burkert , N.L. Allinger, "Molecular Mechanics", *J.A.C.S.*, Washington, P45. **1982**.
- [9] M. Baaden, Outils pour étudier la structure et la dynamique des peptides et des protéines, (Institut de Biologie Physico-chimique, PARIS) CNRS UPR9080, P36. **2003**.
- [10] J.S. Lomas, l'actualité chimique, La Mécanique Moléculaire, une méthode non quantique pour le calcul de la structure et de l'énergie d'entité moléculaire, P7. **1986**.
- [11] D. Liotta, Advances in Molecular Modeling, *Ed. JAI Press*, P1. **1988**.
- [12] F. Jensen, Introduction to Computational Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester. **1999**.
- [13] G. Monard, Introduction à la Modélisation Moléculaire, Formation continue CNRS-Nancy. **2003**.
- [14] J.P Brown, N.L. Allinger, in: K.B. Boyd (Eds.) reviews in computational chemistry, *VCH*, New York, P2. **1991**.
- [15] J.R. Maple, in: P.v.R. Schleyer (Ed.), "Encyclopedia of Computational Chemistry", Wiley, Chichester, 1015. **1998**.
- [16] J. Goodman, "Chemical Applications of Molecular Modelling ", Royal society of Chemistry, Cambridge, P78, **1998**.
- [17] U. Brkert, N.L. Allinger, "Molecular Mechanics", ACS Monograph, ACS, Washington, D. C, P177. **1982**.

- [18] P. Comba, T.W. Hambley, "Molecular Modeling of Inorganic Compounds", VCH, New York, **1995**.
- [19] K.B. Lipkowitz, Abuses of molecular mechanics: Pitfalls to avoid. *J. Chem.*, 1070-1075. **1995**.
- [20] S. Diego, Discover, user guide, ed. Biosym/MSI. **1995**.
- [21] S.J. Weiner, P.A. Kollman, D.T. Nguyen, D.A. Case, An all-atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. *J. Comp. Chem.*, 230. **1986**.
- [22] U. Dinur, A. Hagler, Reviews in computational Chemistry, (K. B. Lipkowitz, D.B. Boyd, Eds). VCH, Weinheim. 99. **1991**.
- [23] N.L. Allinger, K. Chen, J.A. Katzenellenbogen, S.R. Willson, G.M. Anstead, *J. Comp. Chem.*, 747. **1996**.
- [24] N.L. Allinger, *Adv. Phys. Org. Chem*, 1. **1976**.
- [25] N.L. Allinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 8127. **1977**.
- [26] U. Burkert, N.L. Allinger, Molecular Mechanics, ACS Monograph 177. American Chemical Society, Washington DC, **1982**.
- [27] N.L. Allinger, Y.H. Yuh, J-H. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 8522. **1989**.
- [28] N.L. Allinger, K. Chen, J-H. Lii, *J. Comp. Chem*, 642. **1996**.
- [29] W.L. Jorgensen, J.T. Rives, *J. Am. Chem. Soc.*, 1657. **1988**.
- [30] W.F. Van Gunsteren, M. Karplus, *Macromolecules*, 1528. **1982**.
- [31] A. Bouraoui, M. Fathallah, B. Blaive, R. Gallo, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1211-1214. **1990**
- [32] A. Bouraoui, M. Fathallah, F. M'Henni, B. Blaive, R. Gallo., "Modeling of Molecular Structures and Properties". Proceeding of an International Meeting Nancy, France, 11-15, ed, J.L. Rivail., *Studies in Physical and Theoretical chemistry*, 381-393, Septembre **1989**.
- [33] A. Zinelabidine, A. Bouraoui, M. Fathallah, F. M'Henni, B. Blaive, R. Gallo, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 267-274. **1993**.
- [34] B. Blaive, G. Legsai, R. Lai, *J. Mol. Struct.*, 245-250. **1995**.
- [35] T. Shimanouchi, *Pure Appl. Chem.*, 131. **1963**.
- [36] F. Tristram, V. Durier, G. Vergoten, *Journal of Molecular Structure*, 249-259. **1996**.
- [37] J.A. McCammon; S.C. Harvey, Dynamics of Proteins and Nucleic Acids Cambridge, **1987**.

- [38] D. Frenkel, B. Smit, Understanding molecular simulations: From algorithms to applications, Academic press: San, Diego, **1996**.
- [39] W.F.V. Gunsteren, H.J.C. Berendsen, Computer simulation of molecular dynamics: Methodology, applications, and perspectives in Chemistry, Angew: Chem.Int. Ed. Engl. 99-1023. **1990**.
- [40] J.L.G. Violle , Cours de physique: Physique moléculaire. *Volume 1 de Cours de physique*, Edition G. Masson, P 22. **1883**.
- [41] P. Bamborough, F.E. Cohn, Modeling protein-ligand complexes, University of California, San Francisco, **1995**.
- [42] B. Daunay. Couplage haptique pour des applications de docking moléculaire. Edition Robotique : Paris 6, P150. **2007**
- [43] Molecular Graphics and Modelling Society, American Chemical Society. Division of Computers in Chemistry. Journal of molecular graphics and modelling, Volume 15. Edition Elsevier Science, Inc. P9. **1997**.
- [44] D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Efficient unbound docking of rigid molecules, **2002**.

### **I- Minimisation de l'énergie stérique :**

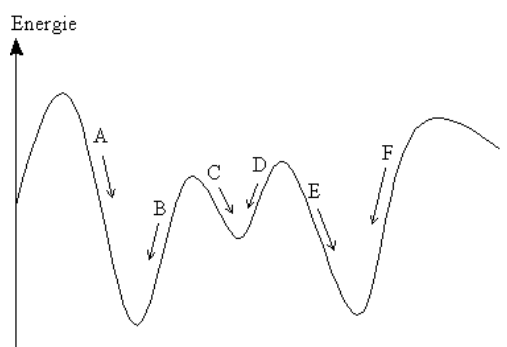
Une fois le champ de force établi (expression de l'énergie choisie, constantes de force et valeurs de références calculées) on peut calculer l'énergie d'une structure moléculaire donnée. Le but de la mécanique moléculaire est alors, en fait, de déterminer la géométrie de la structure de façon à ce qu'elle ait une énergie minimale. Le rôle de la minimisation est essentiellement de relaxer la structure initiale et d'éliminer les mauvais contacts intra atomiques. Les structures « minimisées » correspondent généralement au minimum local le plus proche de la structure de départ plutôt qu'au minimum global d'énergie.

Cette détermination de la conformation moléculaire de plus basse énergie est effectuée par minimisation de l'énergie. Elle peut se faire selon différentes méthodes mathématiques, leur principe étant d'ajuster (à partir d'une conformation initiale) les paramètres géométriques de la structure moléculaire de façon à minimiser la valeur de la fonction énergétique.

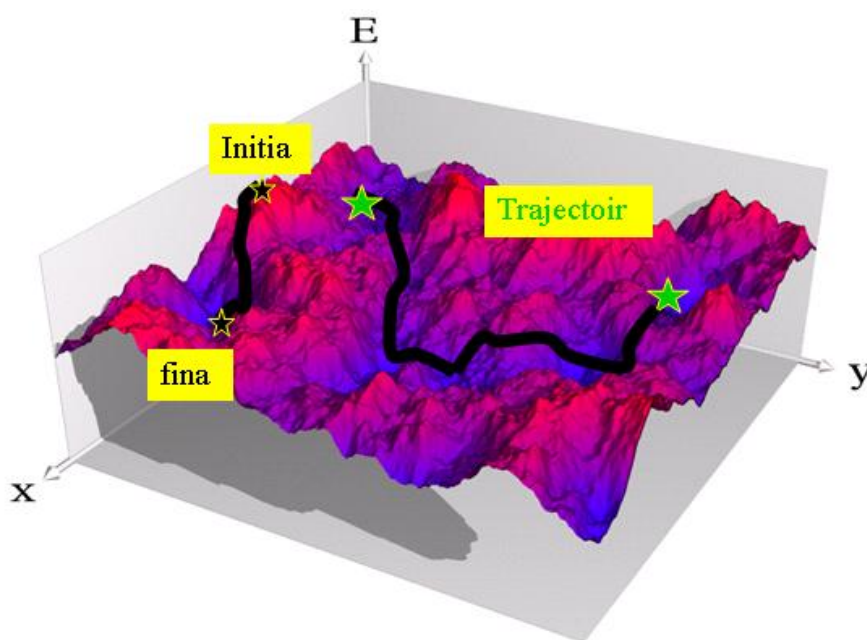
Le principe de base de la minimisation est qu'à partir d'une géométrie très approximative, on recherche le jeu de coordonnées cartésiennes qui réduit à son minimum la somme de toutes les contributions énergétiques dues aux déformations des coordonnées internes et aux interactions entre atomes non liés. En principe, il suffit de prendre la dérivée première de l'énergie stérique par rapport à chacun des degrés de liberté de la molécule et de trouver l'endroit sur l'hypersurface énergétique où, pour chaque coordonnée  $r_i$ ,  $(dE/dr_i)=0$ . Les procédures pour atteindre ce but sont de deux types : les unes utilisent uniquement la pente de la surface (dérivée première), les autres, à la fois cette pente et la courbure de la surface (les dérivées première et seconde). Presque toutes les méthodes de minimisation ont au moins un point en commun : on commence à un endroit donné de l'hypersurface et on descend vers le minimum le plus proche, sans savoir si ce minimum est local ou absolu. On doit donc présenter à l'ordinateur plusieurs conformations de départ, sous forme de coordonnées internes, en s'inspirant de modèles moléculaires [1].

Les méthodes de minimisation ne déterminent ainsi que la conformation stable la plus proche en énergie de la conformation initiale de la structure moléculaire, celle-ci pouvant correspondre à un minimum énergétique global ou simplement local :

Les minima locaux sont inévitables car les longueurs de liaison et les angles de valence sont rapidement optimisés au stade initial de la minimisation ; mais quand ces derniers ont atteint leur valeur d'équilibre, d'autres mouvements torsionnels sont inhibés puisque pour réduire d'avantage l'énergie totale du système il faut pouvoir déplacer plusieurs atomes [2].



**Figure 1:** Convergence de la fonction énergie vers un minimum global ou local selon la conformation initiale de la structure moléculaire.



**Figure 2 :** Notion de surface d'énergie potentielle.

### **II- Méthodes de minimisation :**

#### **II-1 Méthode de minimisation "steepest descent" :**

La méthode de minimisation "steepest descent" (de pente la plus importante) se base sur le calcul de la dérivée première de la fonction énergétique par rapport aux coordonnées géométriques afin de déterminer la distance au minimum énergétique le plus proche et dans quelle direction modifier les coordonnées de chaque atome de la structure.

Cette méthode à l'avantage de converger très rapidement lorsque la conformation initiale de la structure est éloignée d'un minimum énergétique, mais la convergence autour de ce minimum est très lente. C'est pourquoi elle est souvent utilisée en première approximation, dans le but de diminuer les calculs. Cette méthode marche bien lorsque le gradient  $r$  est grand et possède une faible convergence car ce dernier devient faible rapidement à l'approche du minimum [3].

#### **II-2 Méthode de minimisation "conjugate gradient" :**

La méthode de minimisation "conjugate gradient" (de gradient conjugué) se base sur le calcul du gradient de la fonction énergétique par rapport aux coordonnées géométriques afin de déterminer la distance au minimum énergétique le plus proche et dans quelle direction modifier les coordonnées de chaque atome de la structure.

Le gradient correspondant à une conjugaison des dérivées premières entre elles, cette méthode reprend donc, de manière plus précise, le principe des méthodes de minimisation de type "steepest descent".

Cette méthode à l'avantage de donner des résultats plus précis que la méthode "steepest descent" mais nécessite des temps de calcul importants lorsque la structure est éloignée d'un minimum énergétique. C'est pourquoi elle est souvent utilisée à la suite de la méthode "steepest descent", dans le but d'obtenir des résultats plus précis. On rencontre des problèmes de calcul lorsque la conformation initiale est loin du minimum.

### **II-3 Méthode de minimisation de Newton-Raphson :**

La méthode de minimisation de Newton-Raphson se base sur le calcul du gradient de la fonction énergétique par rapport aux coordonnées géométriques afin de déterminer dans quelle direction en modifier les coordonnées de chaque atome de la structure pour minimiser l'énergie. La distance au minimum énergétique le plus proche, dans cette direction, est alors déterminée à partir des dérivées secondes de la fonction énergétique.

Cette méthode à l'avantage de conduire à des résultats très précis mais nécessite des temps de calcul très importants. C'est pourquoi il est nécessaire de la mettre en œuvre en association avec les méthodes "*steepest descent*" ou "conjugate gradient" dans le but de limiter les calculs les plus importants à des structures proches d'un minimum énergétique. On peut rencontrer des problèmes lorsque la conformation initiale est éloignée du minimum [4].

### **II-4 Méthode du recuit simulé :**

Les méthodes précédentes ont la particularité de faire décroître à chaque pas la fonction d'énergie ; elles ne peuvent donc pas échapper au minimum local proche de la structure de départ, et ont par conséquent un rayon de convergence toujours restreint. La méthode du recuit simulé, développée par Kirkpatrick (1983), autorise la fonction d'énergie à augmenter momentanément afin de franchir des barrières d'énergie pour retomber dans un minimum plus profond. Le franchissement de ces barrières permet d'aller au-delà des minima locaux au voisinage de la structure initiale pour explorer de façon plus extensive l'espace conformationnelle accessible, afin de découvrir des minima plus profonds et plus éloignés de la structure initiale que les minima locaux.

### **II-5 Méthode du simplex :**

- Elle se limite à un calcul direct de l'énergie observé si elle augmente ou diminue.
- Elle fonctionne bien si on a 20 variables ou moins.
- Elle consiste en essais successifs représentant une triangulation de l'hypersurface ; C'est à dire qu'on examine le sens et l'amplitude des variations de la fonction dans différentes directions pour suivre celles qui mènent vers un minimum. Néanmoins, il

devient nécessaire de disposer d'une procédure qui part d'une structure approchée et déplace les atomes vers leurs coordonnées optimales d'une façon moins aléatoire.

### **II-6 Conjugaison des différentes méthodes de minimisation :**

Compte tenu des avantages et limitations de chacune des méthodes de minimisation de l'énergie, celles-ci sont le plus souvent conjuguées afin d'utiliser leur vitesse de convergence et leur précision dans leur domaine d'application.

Ainsi, en mécanique moléculaire, la minimisation d'une structure moléculaire met souvent en œuvre un calcul de type "conjugate gradient", permettant une convergence rapide vers le minimum énergétique le plus proche, suivi d'un calcul de type Newton-Raphson, permettant une convergence précise vers ce minimum.

### **III- Analyse Conformationnelle :**

L'analyse conformationnelle est une méthode qui permet de calculer l'énergie relative associée à la conformation d'une molécule [2]. Son but est donc de trouver le plus de minima possible, et de calculer la population de Boltzmann [5].

$$\left. \begin{array}{l} N_i = N_0 \exp(-E_i / KT) \\ N_j = N_0 \exp(-E_j / KT) \end{array} \right\} \Rightarrow N_i / N_j = \exp(-\Delta E_{ij} / KT)$$

$E_i$  : Energie de la molécule.

$K$  : Constante de Boltzmann.

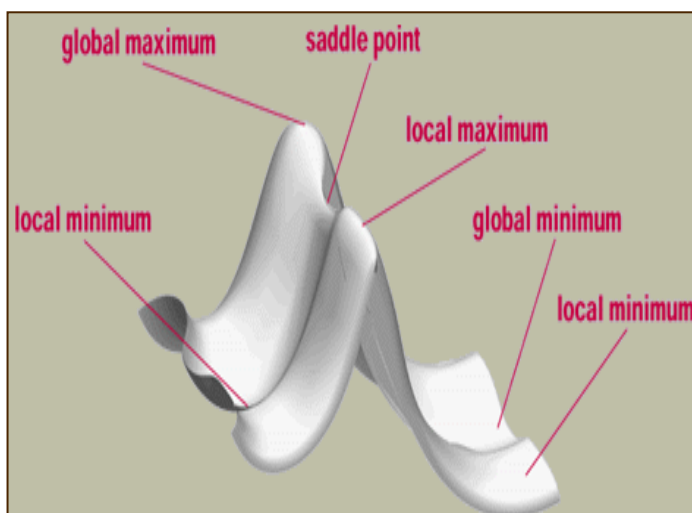
$T$  : Température (Kelvin).

Les molécules flexibles présentent un nombre astronomique de conformations différentes, mais les plus importantes sont celles ayant une énergie libre suffisamment basse pour qu'elles puissent être peuplées à des températures raisonnables.

Un des modèles les plus réussis utilisés en chimie computationnelle est la surface d'énergie potentielle (Potential Energy Surface « PES ») figure 3. C'est une représentation remarquable des molécules individuelles, des complexes moléculaires et des interconversions conformationnelles. Elle permet aussi de faire le lien entre les concepts chimiques clés et les caractéristiques géométriques de base des surfaces.



Dans le cas de l'analyse conformationnelle, les minima et les points de selle (saddle points) sur la PES sont les caractéristiques les plus importantes. Les minima correspondent à des conformations d'énergie minimale et les points de selle à des états de transition associés à des interconversions conformationnelles [6].



**Figure 3** : surface d'énergie potentielle

En analyse conformationnelle, un grand nombre de géométries de départ de haute énergie sont générées, minimisées et stockées. Pour que la recherche soit minutieuse, les géométries de départ brutes doivent couvrir toute la surface d'énergie potentielle. Dans le cas contraire, on n'est pas sûr de trouver tous les minima [5]

Certaines méthodes de recherche conformationnelle sont destinées au traitement des petits cycles, des peptides acycliques et des molécules organiques [7, 8,9], d'autres pour les petites protéines [4], des polymères [10] et les hydrates de carbone [11].

Dans le paragraphe précédent, on suppose une surface d'énergie potentielle parfaite. Toutefois, en pratique, la fonction d'énergie potentielle et la surface d'énergie sont sujettes à beaucoup d'approximations. En effet, il y a de nombreuses fonctions d'énergie potentielle utilisées basées soit sur la mécanique quantique soit sur la mécanique moléculaire. Malgré la précision des potentiels de la mécanique quantique, ceux de la mécanique moléculaire sont exclusivement utilisés en analyse conformationnelle puisqu'elle permet de traiter de grosses molécules. Il est à noter cependant, que des champs de force différents génèrent des surfaces de potentiel

différentes, ainsi la localisation des minima locaux dépend du champ de force utilisé. Les différents champs de force donnent en général les mêmes résultats pour de petites molécules, mais présentent des divergences dans les conformations des molécules plus complexes [6]. Par exemple, il apparaît 262 conformations d'énergie minimale pour le cycloheptadecane, la plus basse étant à 3 Kcal/mol avec MM2, et seulement 134 conformations avec MM3 [8].

L'analyse conformationnelle permet de trouver les minima et les points de selle, et d'identifier les interconversions impliquant des petites barrières énergétiques. Pour cela il faut générer un ensemble de structures d'essai, et passer à la minimisation ensuite. Dans un système moléculaire sans contrainte et avec un nombre d'atomes  $n > 2$ , le nombre de degrés de liberté est égal au nombre de coordonnées internes c'est à dire  $3n - 6$ . Lors de la minimisation de l'énergie, l'ensemble des structures d'essai est généré en faisant varier les degrés de liberté les plus flexibles à savoir les angles dièdres [6]. De façon générale, pour les liaisons simples, la modification d'un angle dièdre coûte moins cher en Kcal/mol que la déformation d'un angle de valence qui, à son tour, est plus facile que l'élongation d'une liaison. On dit que les angles dièdres sont plus mous que les autres coordonnées internes [1]. Pour pouvoir faire varier tous les angles dièdres d'une molécule, on dresse une grille pour obtenir toutes les possibilités combinatoires. Ainsi, une molécule avec trois angles dièdres va générer 216 conformations si l'incrément d'angle est de  $60^\circ$  c'est à dire 63. Pour une molécule ayant six angles dièdres on atteindra déjà 46656 conformères, tandis qu'avec neuf angles on arrive à plus de 10 millions de conformations possibles [2].

La recherche et la localisation des structures des états d'équilibre et de transition sur l'hypersurface d'énergie potentielle d'un système moléculaire sont nécessaires pour la détermination des propriétés thermodynamiques et cinétiques, de même que pour l'interprétation de spectres de vibration et de rotation. Des techniques spéciales d'optimisation de géométrie ont été élaborées pour cela [12].

L'optimisation de la géométrie d'un système moléculaire consiste à trouver la géométrie de ce système qui correspond à l'énergie la plus basse du système. C'est pourquoi ces méthodes sont dites de minimisation [13]. Il est important de préciser que ces dernières s'appliquent au voisinage des points stationnaires, donc pour des petites variations de la géométrie. Ceci est dû au fait que ces méthodes partent toutes du développement de l'énergie en série de Taylor qui n'est valable que pour un petit écart de la position d'équilibre recherchée [14].

Elles peuvent être en défaut et déceler un minimum global englobant ainsi plusieurs minimums locaux, si la géométrie de départ est trop éloignée de celle de l'état d'équilibre [15].

Donc, l'analyse conformationnelle reste un moyen efficace de prédiction des conformations stables d'une structure moléculaire correspondant aux minima de son énergie intramoléculaire [16]. L'énergie calculée mesure la différence entre l'énergie de la structure moléculaire considérée et celle d'une structure hypothétique dont toutes les coordonnées prendraient leurs valeurs de référence. Sa valeur absolue dépend du champ de force considéré, c'est-à-dire des fonctions d'énergie potentielle et des paramètres utilisés. Les valeurs de cette énergie sont toutefois très utiles lorsqu'il s'agit de comparer la stabilité relative des conformations ou des stéréoisomères d'une même molécule [2].

### Références:

- [1] A.R. Leach, Energy minimisation and related methods for exploring the energy surface, in *Molecular modeling: Principles and applications*, Addison Wesley Longman Ltd: Harlow. 260. **1996**.
- [2] M. Baaden, Outils pour etudier la structure et la dynamique des peptides et des proteines, (Institut de Biologie Physico-Chimique, PARIS) CNRS UPR9080, P36. **2003**.
- [3] J.S. Lomas, l'actualite chimique- Mai **1986**.
- [4] A. Aumelas. L'Analyse conformationnelle: perspectives et limites actuelles. Edition Butterworths, P 202. **1971**.
- [5] S.D. bousmaha, These de doctorat, USTHB Alger, **1999**.
- [6] J. Bartol, P. Comba, M. Melter, M. Zimmer, *Journal of computational Chemistry*, P2, **1999**.
- [7] G. Keseru ,I. Kolossvary, *Molecular Mechanics and Conformational Analysis in Drug. Design*, Departement of chemical Information Technology, Technical University of Budapest, Blackwell Science Ltd, **1999**.
- [8] C.L. Brooks, M. Karplus, B.M. Pettitt, *Proteins. Advences in Chemical Physics*, Willey: New York, LXXI, **1998**.
- [9] J.T. Ngo , M. Karplus, *J. Am. Soc.* P119. **1997**.
- [10] I. Kolossvary , W.C. Guida, *J. Am. Chem. Soc.*, P118. **1996**.
- [11] H. Senderowitz, F. Guarieri, W.C. Still., *J. Am. Chem. Soc*, P117. **1995**.
- [12] M.J. Dudeck, H.A. Scheraga, *J. Comput.Chem*, 121. **1990**.
- [13] E. Leontidis, J.J. Pablo, M. Laso, U.W. Suter, *Adv. Plym. Sci*, 283. **1994**.
- [14] C.W. Von Der Lieth, T. Kozar, W.E. Hull, *Theochem. J. Mol. Struct*, 225. **1997**.
- [15] A. Hinchliffe, "Modelling Molecular structures", John Wiley and Sons, New York, **1994**.
- [16] G. Vergoten, Cours du Modelisation moleculaire , Universite des Sciences et Technologies de Lille. **1987**.

Les organismes vivants sont constitués essentiellement de macromolécules formées de longues chaînes d'atomes qui adoptent, en se repliant, une structure spatiale bien définie.

Une molécule est un ensemble d'atomes. La taille d'un atome est environ d'une dizaine de nanomètre, soit un dix milliardième de mètre. Pour comprendre quelles sont les propriétés d'une molécule, il est notamment nécessaire de connaître les atomes qui la composent, ainsi que les liaisons qui existent entre eux.

Les protéines sont des polymères d'acides aminés liés les uns aux autres dans un ordre précis [1].

Présentes chez les organismes vivants et essentiels à leur fonctionnement, ces macromolécules complexes et variées sont spécifiques à chaque espèce vivante et à chaque organe. Chaque cellule en fabrique en moyenne 15 000 sortes différentes, et un corps humain, près de 100 000, soit 50% du poids d'un être vivant.

Les protéines sont des molécules organiques complexes représentant un composant important des organismes vivants. Elles agissent comme des enzymes dans différentes réactions chimiques au sein de notre corps, l'ADN seraient inopérants en leur absence [2].

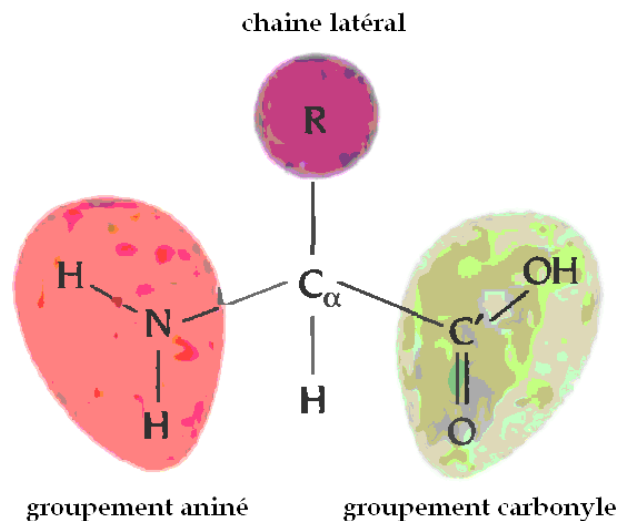
Elles sont aussi importantes dans le processus de défense immunitaire et sont souvent l'élément clé dans beaucoup de maladies. Par conséquent, leur étude a une énorme importance dans la compréhension du fonctionnement du corps humain et dans la lutte contre les maladies mortelles. À cause de la très grande complexité des protéines, (la taille moyenne d'une protéine est de plusieurs milliers d'atomes), un traitement informatique est nécessaire pour analyser leur structure.

### I- Acides Aminés :

Les acides aminés sont des acides carboxyliques qui portent une fonction amine. Les protéines de toutes les espèces sont constituées de seulement vingt acides aminés différents [3]. Ils sont tous constitués d'un atome de carbone (figure 1) lié à :

- . Un groupement carboxylique  $-\text{COOH}$ .
- . Une fonction amine  $-\text{NH}_2$ .
- . Un atome d'hydrogène.
- . Une partie variable R.

Dans la nature, les acides les plus courants sont les 2-aminoacides, appelés les aminoacides.



**Figure 1** : Structure générale des acides aminés.

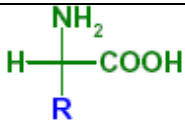
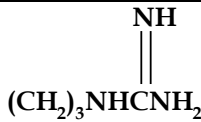
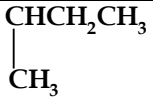
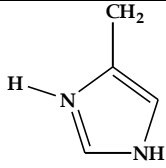
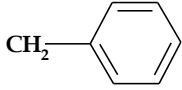
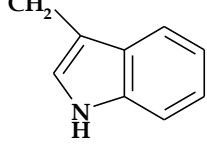
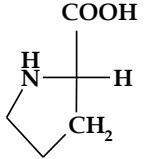
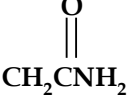


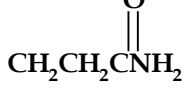
Tous les acides aminés naturels adoptent la configuration S (sauf la glycine), et appartiennent à la série L.

La différence entre ces vingt acides aminés se situe au niveau de leur radical, en effet on dénombre vingt radicaux différents [4]. Ces groupements spécifiques sont dits « chaîne latérale » et selon lesquels, on peut classer les acides aminés comme suit :

- . Ceux dont les radicaux sont basiques (arginine, histidine, lysine).
- . Ceux dont les radicaux sont acides (acide aspartique, acide glutamique).
- . Ceux qui possèdent les radicaux non chargés (glutamine, sérine, thréonine).

CHAPITRE IV : Acides Aminés, Peptides, Protéines et Enzymes

**Tableau:** Principaux acides aminés [5].

							
R	Nom	Code à trois lettres	Code à une lettre	R	Nom	Code à trois lettres	Code à une lettre
H	Glycine	Gly	G	CH <sub>2</sub> SH	Cystéine	Cys	C
CH <sub>3</sub>	Alanine	Ala	A	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	Méthionine	Mét	M
CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Valine	Val	V	(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	Lysine	Lys	K
CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Leucine	Leu	L		Arginine	Arg	R
	Isoleucine	Ile	I		Histidine	His	H
	Phenylalanine	Phe	F		Tryptophane	Trp	W
	Proline	Pro	P	CH <sub>2</sub> COOH	Acide aspartique	Asp	D
CH <sub>2</sub> OH	Serine	Ser	S		Asparagine	Asn	N
	Tréonine	Thr	T	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Acide glutamique	Glu	E
	Tyrosine	Tyr	Y		Glutamine	Gln	Q

**I-1 Propriétés physiques :**

Les acides aminés (AA) sont des solides blancs cristallisés qui se décomposent avant de fondre (ils perdent l'acide carboxylique).

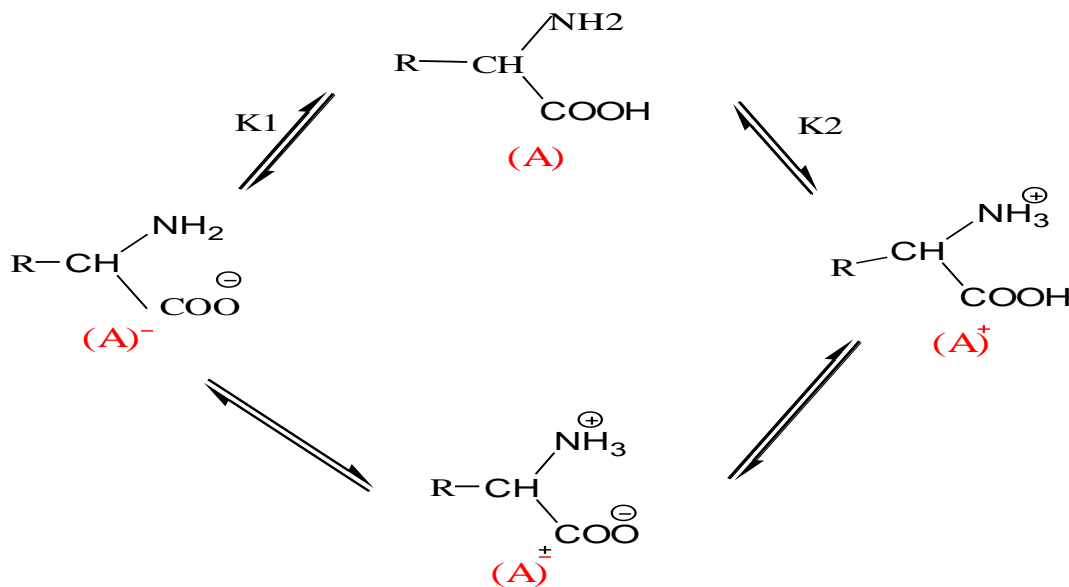
La solubilité des AA est en rapport avec leurs structures polaires et dépend de plusieurs facteurs :

- . La nature de la chaîne R.
- . Le pH de la solution.
- . La nature des ions présents dans la solution.

Pouvoir rotatoire : les solutions d'acides aminés sont optiquement actives. Les aminoacides naturels appartiennent à la série L (les formes D sont exceptionnelles, on les retrouve surtout chez les bactéries) [6].

**I-2 Propriétés chimiques :**

Tous les aminoacides possèdent au moins deux groupes ionisables.

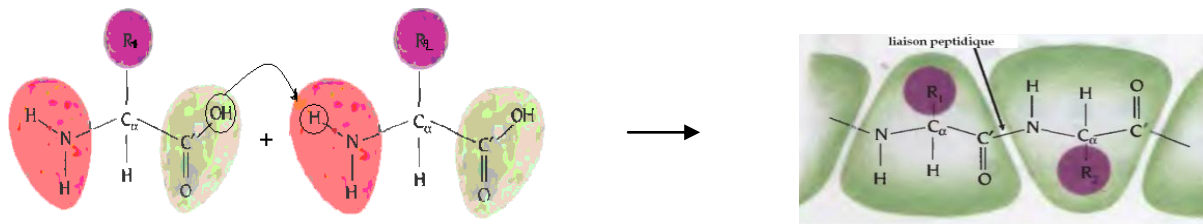


Le point isoélectrique ou isoionique : est un pH intermédiaire où l'acide aminé est neutre et n'a aucune charge [7]. Ce pH est calculé par :  $\text{pH} = (\text{pK}_1 + \text{pK}_2)/2$ .

**II- Les peptides :**

Les acides aminés peuvent se lier les uns aux autres par une liaison peptidique (figure 2) qui se fait entre le groupement acide d'un acide aminé et le groupement amine de l'autre. Au cours de la réaction, une molécule d'eau est éliminée ; il s'agit donc d'une réaction de condensation [8].





**Figure 2** : Fragment d'un polypeptide illustrant la liaison peptidique

- **Structure de la liaison peptidique :**

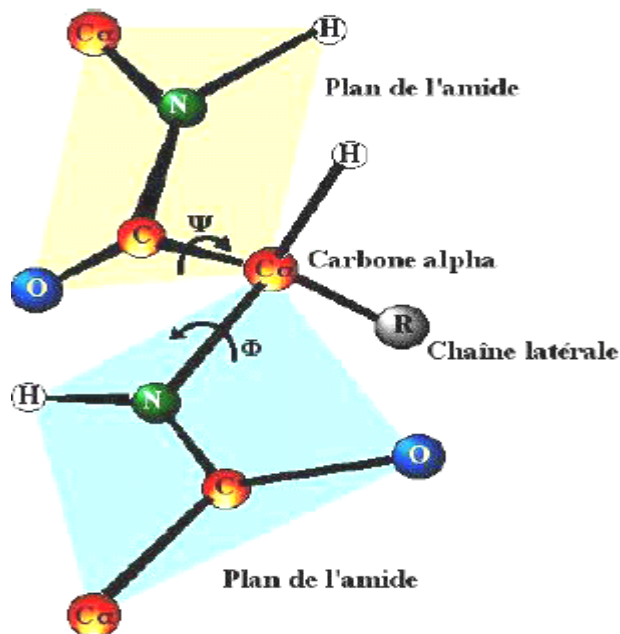
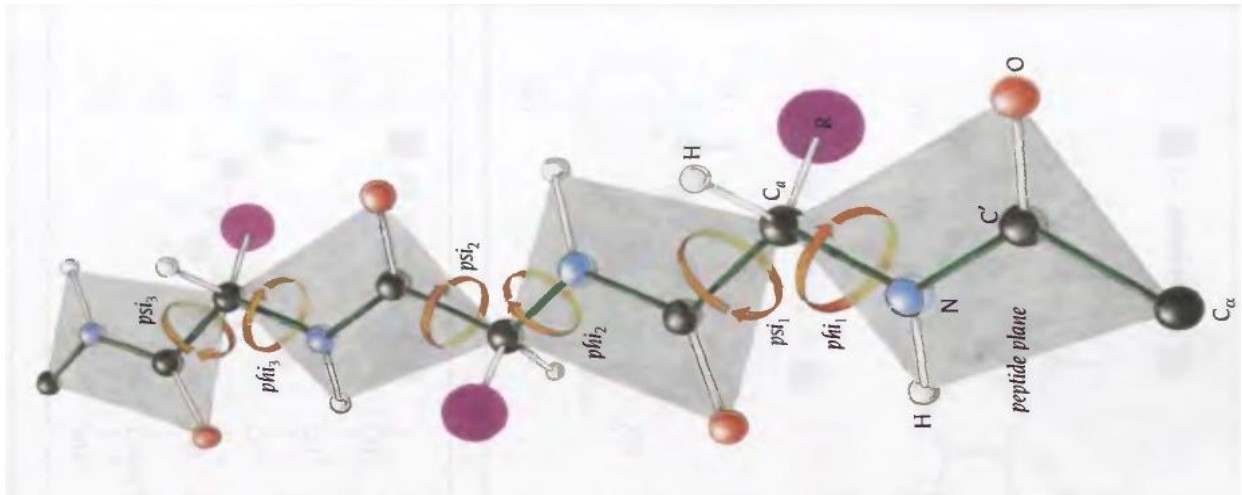
Le plan rigide de la structure peptidique (figure 3) interdit la rotation des atomes des fonctions acide et amine. Les seules liaisons dont l'orientation reste libre sont celles qui entourent chacun des carbones asymétriques porteurs des radicaux des acides aminés.

La liaison ( $C_{\alpha}$ -NH) située à l'extrémité  $NH_2$ -terminale peut tourner librement : l'angle de rotation de cette liaison est appelée l'angle  $\Phi$  (phi).

La liaison ( $C_{\alpha}$ -CO) situé à l'extrémité COOH-terminale peut tourner librement : l'angle de rotation de cette liaison est appelé angle  $\Psi$  (psi).

La liaison peptidique (NH-CO) est de caractère partiellement double dont la rotation est restreinte, l'angle de rotation de cette liaison est appelé angle  $\omega$  (oméga) et adoptera généralement la valeur de  $180^\circ$  (trans) ou parfois de  $0^\circ$  (cis). Les angles  $\Phi$  et  $\psi$  demeurent eux aussi habituellement près de  $180^\circ$  (trans) mais avec un peu plus de variation que l'angle  $\omega$ , grâce à leur caractère de liaison simple. La structure secondaire d'une protéine dépend de la valeur de ces deux angles, pour chaque acide aminé, en fonction des liaisons hydrogènes qui unissent les atomes (carbonyle et amine) des liaisons peptidiques [9].

Les peptides sont des composés naturels ou synthétiques qui résultent de l'enchaînement d'un nombre limité d'acides aminés par des liaisons peptidiques.



**Figure 3 :** Degré de liberté de la rotation de la liaison peptidique.

### III- Protéines :

Les protéines représentent plus de la moitié de la masse d'une cellule, à l'exclusion de l'eau, et sont responsables de la plupart, des fonctions intra et inter cellulaires. Elles gèrent par exemple la réplication de l'ADN et le maintien des équilibres chimiques. Ces fonctions sont fortement liées aux formes spatiales que prennent les protéines dans le milieu cellulaire [10].

Les protéines forment la classe la plus nombreuse et la plus diversifiée des molécules biologiques, elles constituent plus de 50% du poids sec des cellules. Cette

abondance reflète le rôle ubiquitaire des protéines dans pratiquement tous les aspects structuraux et fonctionnels de la cellule. Les protéines sont les agents des fonctions biologiques ; elles expriment aussi l'information génétique.

Les protéines sont de grosses molécules ou macromolécules qu'interviennent dans de nombreuses fonctions organiques. Elles sont constituées d'acides aminés (ou résidus) liés entre eux par des liaisons peptidiques entre le groupe  $\alpha$ -carboxylique d'un acide aminé et le groupe  $\alpha$ -aminé de l'acide aminé suivant. Une protéine est donc une chaîne d'acides aminés, appelée chaîne polypeptidique, pouvant contenir jusqu'à des dizaines de milliers de résidus. Ces chaînes de résidus ont une structure flexible ce qui leur permet de se replier en une forme appelée structure native [11].

Plusieurs techniques expérimentales permettent d'obtenir la structure 3D des protéines : la diffraction des rayons X sur des cristaux de protéines, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cryomicroscopie. Ces méthodes nous fournissent les coordonnées spatiales des atomes constituant les protéines. Plus de 29000 structures ont été résolues à ce jour et sont disponibles via la Protein Data Bank [12].

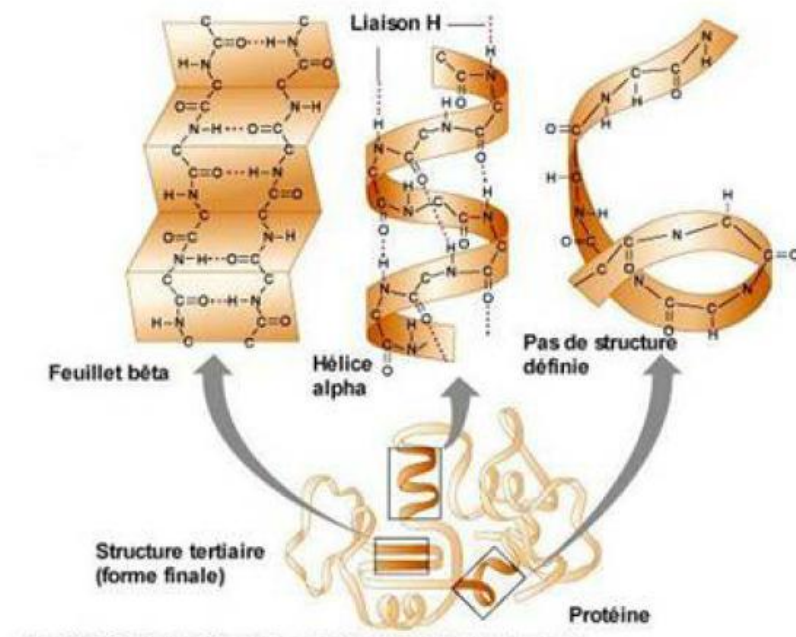
### III-1 Pourquoi modéliser les protéines ?

En un mot, parce qu'elles sont le moteur derrière les processus biochimiques. En effet, qu'il s'agisse d'un processus normal tel que la croissance d'une plante ou d'un processus anormal à l'origine d'une maladie, il y a fort à parier que celui-ci est dû à la présence d'une protéine. En conséquence, les protéines représentent des cibles tout à fait intéressantes dans le cadre de traitements médicamenteux [13].

Les structures cristallines des protéines sont disponibles pour seulement une fraction de protéines connues. Avec ces structures, nous pouvons visualiser la protéine et comprendre son fonctionnement.

**III-2 Structures des protéines :**

- **Structure primaire :** elle correspond à l'ordre selon lequel les divers acides aminés sont unis les uns aux autres par des liaisons peptidiques.
- **Structure secondaire :** est un premier niveau de repliement adopté par des portions de la protéine, résultant d'interaction entre des acides aminés voisins de la chaîne. On distingue deux structures principales ; L'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$ .
- **Structure tertiaire :** correspond à la façon selon laquelle celle-ci se dispose dans l'espace. Les protéines fibreuses présentent une conformation très ordonnée, tandis que les autres protéines, telles que les enzymes, se replient sur elles-mêmes de manière à former des structures fortes complexes.
- **Structure quaternaire :** concerne les protéines qui sont constituées d'un certain nombre de sous-unités protéiques [14].



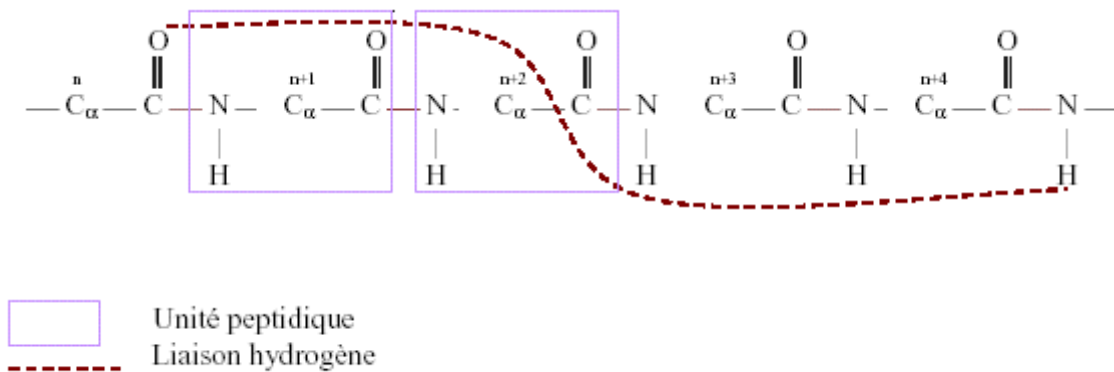
**Figure 4 :** Motifs de structure protéique.

Le problème principal de la prédiction de structures est de prédire la structure d'une protéine à partir de sa séquence d'acides aminés. Ce problème est extrêmement difficile à résoudre et est reconnu comme l'un des grands défis de la bio-informatique actuelle [15,16].

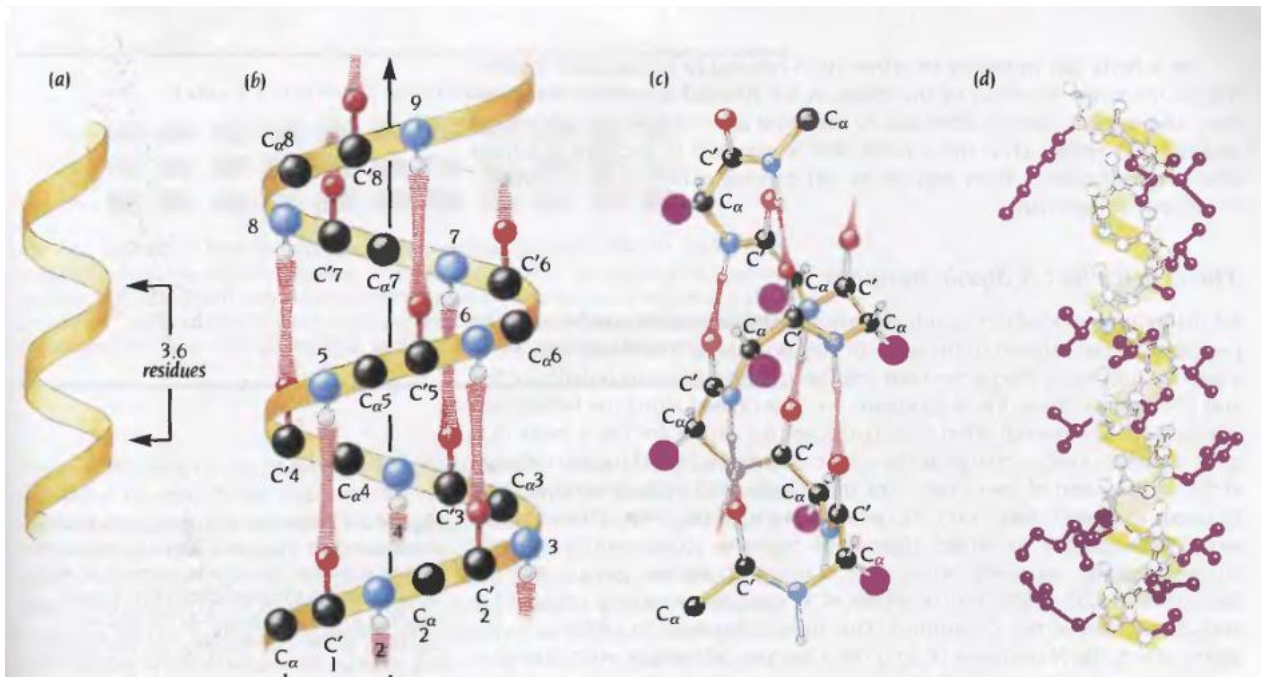
**III-2-i- Hélice  $\alpha$  :**

Résulte de l'enroulement de la chaîne protéique de façon à ce que les liaisons peptidiques qui en constituent l'épine dorsale aient la possibilité de former des liaisons hydrogènes entre elles. L'hélice  $\alpha$  est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les résidus. Ces liaisons sont formées entre l'atome H d'un azote peptidique et l'atome d'oxygène d'un groupement carbonyle distant de 4 résidus dans la structure primaire.

Dans une hélice $\alpha$ , chaque résidu est relié au précédent par une translation de  $1.5\text{\AA}$  le long de l'axe par rotation de  $100^\circ$  ; ce qui donne environ 3.6 résidus par tour d'hélice et un pas de  $5.4 \text{\AA}$  [17].



**Figure 5 :** Schéma des liaisons hydrogènes des principales hélices polypeptidiques.

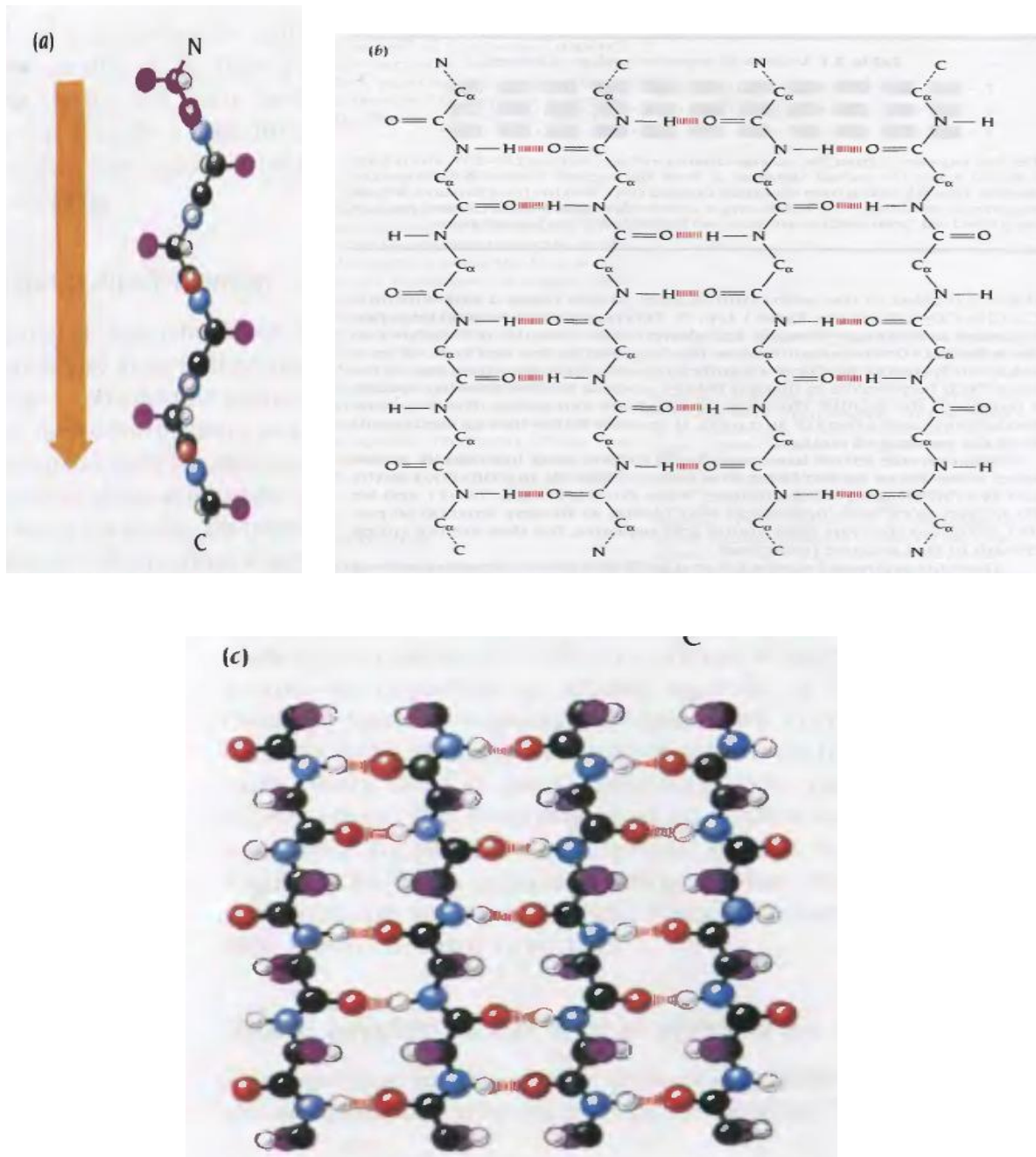


**Figure 6** : L'hélice  $\alpha$  est un des éléments majeurs de structure secondaire dans les protéines. Dans la chaîne principale les atomes N et O forment des liaisons d'hydrogènes colées l'un à l'autre dans hélices  $\alpha$ . **(a)** diagramme de l'hélice  $\alpha$  est fréquemment illustré de cette façon. **(b)** Le même comme **(a)** mais avec positions approximatives pour atomes de chaîne principale et liaisons hydrogènes incluses. La flèche dénote la direction du groupement terminal N au groupement terminal C. **(c)** diagramme schématique d'une hélice  $\alpha$ . Les atomes d'oxygène sont en rouges et les atomes d'azote sont en bleus. Des liaisons hydrogènes entre O et H-N est en rouge et les chaînes de côté sont représentées en violet. **(d)** modèle de boule et de tige d'une hélice  $\alpha$  dans la myoglobine. Le plan de la chaîne principale est on jaune; les chaînes de côté sont en violet.

### III-2-ii- Feuillet $\beta$ :

Résulte de la superposition de deux chaînes protéiques antiparallèles et qui se sont en outre plissées de manière à constituer un angle entre les plans des groupes peptidiques. Ici aussi, l'assemblage se maintient grâce à l'existence de liaisons hydrogène, mais, cette fois, entre des chaînes peptidiques différentes [18].





**Figure 7** : Illustrations Schématiques de feuillet  $\beta$  antiparallèle. Feuillet  $\beta$  est le deuxième élément majeur de structure secondaire dans des protéines. Le feuillet  $\beta$  est tout antiparallèle ou tout parallèle ou mélangée comme illustré dans les figures suivantes. **(a)** la conformation prolongée d'un feuillet  $\beta$  . On montre des chaînes de côté comme des boules violettes. L'orientation de feuillet  $\beta$  est la même que dans la figure **(b)** et **(c)**. Feuillet  $\beta$  est schématiquement illustré comme une flèche, de N à C terminal. **(b)** l'illustration schématique modèle de liaison hydrogène dans un feuillet  $\beta$  antiparallèle. Les atomes NH et O de la chaîne principale dans un feuillet  $\beta$  est

collé à un autre feuillet  $\beta$  par des liaisons d'hydrogène. **(c)** modèle de boule et de tige du feuillet  $\beta$  de **(b)**. Les atomes d'oxygène sont en rouges; les atomes d'azote sont en bleus. L'atome hydrogène dans N-H...O et les atomes de carbones sont en blanc. Dans la chaîne principale,  $C_\alpha$  est en noir. Les chaînes de côté sont illustrées par un atome violet.

### III- 3 Le repliement des protéines :

Les radicaux des acides aminés ont des propriétés chimiques différentes. Certains sont hydrophobes, d'autres hydrophiles, certains s'ionisent négativement et d'autres positivement. Certains radicaux peuvent former des liaisons chimiques plus ou moins fortes avec d'autres radicaux. Il peut donc y avoir dans une chaîne d'acides aminés des interactions entre les radicaux. Certains se repoussent et d'autres se rapprochent et forment des liens chimiques. La chaîne d'acides aminés aura donc tendance à se replier sur elle-même pour adopter une structure tridimensionnelle précise [19].

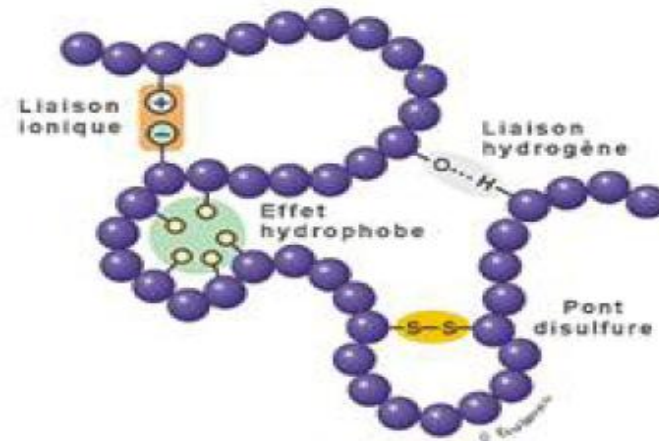
Les forces qui stabilisent la forme pliée :

- Liaisons hydrogènes intramoléculaire
- Entropie de déshydratation.
- Interactions hydrophobes.
- Ponts salins.
- Interactions dipolaires.

Les forces qui déstabilisent la forme pliée :

- Liaisons hydrogènes avec l'eau.
- Perte d'entropie configurationnelle.





**Figure 8 :** Illustration de différent type de force qui influence la structure des protéines.

### III-4 Fonctions des protéines :

Les fonctions des protéines résultent de la forme précise par celles-ci dans le milieu cellulaire. Ces fonctions peuvent être liées à l'activité de catalyse, de reconnaissance, de changement de conformation ou même d'une combinaison des trois. Ceci explique que certaines protéines possèdent plusieurs fonctions. Dans ce cas comment définir la fonction d'une protéine ? P.Bork et collaborateurs proposent par exemple trois niveaux de description des fonctions : phénotypique, cellulaire et moléculaire ; mais il n'existe pas, à l'heure actuelle, de définition unique des fonctions des protéines [20].

## IV- Enzymes :

### IV-1 Introduction :

Dans les systèmes biologiques ; c'est à dire à des températures en général inférieur ou égale à 37°C, les réactions chimiques du métabolisme se produisent rarement spontanément, mais sont le plus souvent catalysées par des protéines particulières que l'on appelle des enzymes.

Le mot enzyme vient des racines grecques *en* (dans) *zume* (levain). Les premières enzymes identifiées ont été extraites des levures, ces microorganismes responsables de la transformation du glucose en alcool.

Dans les cellules, les enzymes permettent aux réactions de se produire avec peu d'énergie. Souvent, la seule énergie cinétique des molécules à la température ambiante est suffisante pour que la réaction se produise. La plupart des réactions qui

se déroulent dans les cellules ne pourraient pas s'y produire sans les enzymes appropriées [21].

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseur cellulaire. Elles sont constituées des milliers d'acides aminés liés en une chaîne linéaire. Ces acides aminés diffèrent dans leur nature chimique, sont liés entre eux par des liens covalents appelés liens PEPTIDIQUES. Un catalyseur est une substance qui modifie la vitesse d'une réaction chimique mais qui se retrouve inchangée à la fin de la réaction. En termes plus techniques, un catalyseur est une substance qui abaisse l'énergie d'activation d'une réaction chimique.

Actuellement plusieurs milliers d'enzymes sont connues, la séquence des acides aminés de près de trois milles d'entre elles a été élucidée. Nombre d'entre elles sont utilisées industriellement (biotechnologies, lessives, jus de fruits, production de sucre à partir d'amidon, traitement des peaux, des fibres textiles etc.) et d'autres sont de merveilleux outils dans la recherche biomédicale.

### **IV-2 Site actif :**

Le site actif d'une enzyme est la région privilégiée de l'enzyme qui interagit avec le substrat. Les acides aminés du site actif peuvent être divisés en deux groupes :

- Ceux qui interviennent à la reconnaissance spatiale du substrat, en formant avec lui des liaisons non- covalentes (site de fixation).
- Ceux qui participent à la transformation chimique du substrat en produit (site catalytique).

Les autres acides aminés sont nécessaires soit au maintien de la conformation tridimensionnelle active de l'enzyme, soit au maintien de l'enzyme vis- à- vis d'autres protéines.

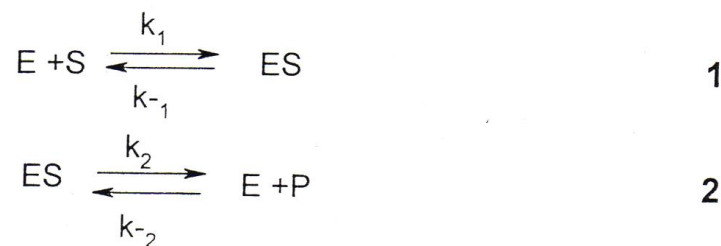
L'insertion des fragments (atomes) dans le site actif est basée sur le principe de complémentarité stérique et électronique entre ligand et récepteur.

### **IV-3 Cinétique Enzymatique :**

La cinétique est la science qui a pour objet l'étude de la vitesse des réactions chimiques. La cinétique enzymatique englobe le rôle biologique des catalyseurs enzymatiques et les mécanismes qui permettent leur activité catalytique. Avec la cinétique enzymatique, on cherche à déterminer la vitesse maximale de la réaction que l'enzyme catalyse et à mesurer son affinité pour les substrats et les inhibiteurs.

La connaissance précise de la cinétique enzymatique est indispensable pour la conception rationnelle d'un nouveau médicament et le succès de son action pharmacologique [22].

La cinétique enzymatique a fait l'objet d'études au début des années 1900. Leonor Michaelis et Maud L. Menten ont proposé en 1913 [23] une théorie générale sur l'action enzymatique compatible avec les résultats expérimentaux. Leur modèle cinétique est basé sur la formation du complexe enzyme- substrat selon les étapes suivantes :

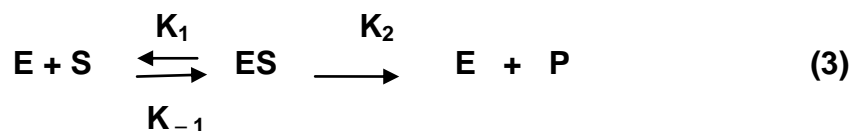


Avec  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  et  $k_{-2}$  sont des constantes de vitesse.

Michaelis et Menten résolurent le système réactionnel en posant les hypothèses simplificatrices suivantes :

- les mesures de cinétique seront toujours faites pour des concentrations de produit très faibles : c'est la mesure de la vitesse initiale ( $v_i$ ) pour  $[P] = 0$  et  $[S] = [S]_0$ . Où  $[S]_0$  est la concentration du substrat à l'instant initial.
  - La concentration totale du substrat  $[S]_0$  est grande devant celle de l'enzyme  $[E]_0$ .
- Dès l'addition de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe, on parle d'hypothèse du pré-équilibre.

Le schéma réactionnel s'écrit ainsi :



#### IV-4 Comment fonctionnent les enzymes ?

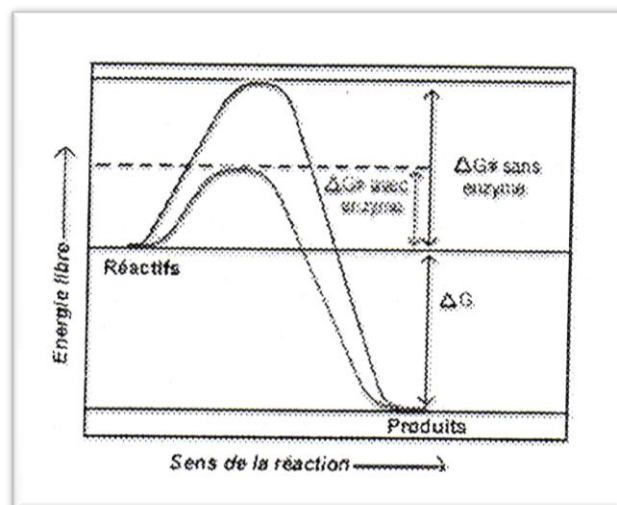
Les enzymes accélèrent des réactions chimiques qui peuvent se produire naturellement, mais à des vitesses beaucoup plus lents. Une des caractéristiques des enzymes est qu'elles ne sont pas utilisées ou transformées durant une réaction chimique. Elles peuvent donc servir plusieurs fois. Le principe d'action est basé sur le fait que la plupart des réactions endothermiques nécessitent un apport d'énergie afin de démarrer. Cette énergie initialement requise est appelée l'ENERGIE

D'ACTIVATION. Alors qu'on peut amorcer une réaction en apportant de l'énergie, une enzyme agit plutôt en se liant aux réactifs de façon à faciliter leur réaction et ainsi abaisser l'énergie d'activation requise. La température de l'environnement cellulaire est alors suffisante pour faire franchir le seuil de l'énergie d'activation aux réactifs et les faire réagir.

### IV-5 Catalyse enzymatique :

Les enzymes sont de bons catalyseurs car elles peuvent augmenter la vitesse de réaction d'un facteur allant de  $10^4$  à  $10^6$ . Elles ne modifient pas la position de l'équilibre de la réaction mais seulement la vitesse d'inter- conversion entre substrat et enzyme.

Un catalyseur a pour effet d'abaisser l'énergie d'activation en favorisant la stabilité de l'état de transition. Les énergies des réactifs et des produits restent inchangées, ce qui explique pourquoi le rapport à l'équilibre de ces diverses molécules ne varie pas.



**Figure 9 :** Représentation de la catalyse enzymatique.

- Catalyse acide-base: dans les sites actifs des enzymes, il y a des groupements acides carboxyliques ou aminés qui sont donneurs ou accepteurs de protons. Ceci permet donc de réaliser des réactions catalysées par les bases ou les acides.
- Catalyse covalente: des groupements tel que les thiols ou les aminés sont des nucléophiles susceptibles d'attaquer les groupements électrophiles de

substrat pour former des intermédiaires covalents hautement réactifs, ceux-ci peuvent être attaqués à nouveau par de l'eau de façon à libérer le produit.

- Catalyse par la chymotrypsine: cette enzyme coupe la liaison peptidique des chaînes latérales aromatiques. Cette spécificité est due à la présence de groupements hydrophobes sur la chaîne. Le substrat est maintenu en place par l'interaction entre la poche hydrophobe et la chaîne latérale aromatique [24].

### IV-6 Le complexe enzyme – substrat :

Une fois que le substrat s'est rapproché de l'E, on constate une restriction des possibilités de rotation et de translation du substrat. Ceci est dû à des interactions faibles entre enzyme et substrat. Ces interactions sont nécessaires à la réaction. En effet, les réactions intramoléculaires sont accélérées lorsque les mouvements internes des molécules sont bloqués. De plus, les enzymes favorisent l'orientation des molécules de substrat: en effet, lorsque le substrat se fixe sur l'enzyme, ceci provoque un changement conformationnel qui amène les groupements fonctionnels du site actif dans une position favorable à la catalyse. Il y a donc création d'interactions faibles entre E et S. Cette adaptation induite permet également la formation d'interactions faibles supplémentaires qui vont stabiliser l'état de transition.

La formation initiale d'un complexe enzyme - substrat E-S (NON covalent) fût suggérée d'après les observations suivantes :

**a.** Le haut degré de spécificité de la reconnaissance d'un substrat par une enzyme. Pour l'expliquer, Emil Fisher suggéra en 1894 que cette reconnaissance résulte d'une très forte complémentarité des structures (mais aussi de la nature chimique des groupements réactionnels) du substrat et de l'enzyme qui le fixe, comme le sont une clé et la serrure ; dans laquelle elle entre.

**b.** La formation de la courbe dite de saturation : vitesse initiale de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat ( $v_i = f([S])$ ) [25].

**c.** Le fait que les substrats protègent souvent les enzymes de l'inactivation. L'hypothèse "clé -serrure", bien qu'extrêmement satisfaisante, ne peut rendre compte de certaines observations :

**a.** par exemple, certains composés qui ressemblent chimiquement à un substrat mais qui ont des groupements moins volumineux ne sont pas catalysés, bien qu'ils doivent encore mieux s'insérer dans le site actif

**b.** Il existe un mécanisme enzymatique à deux substrats appelé "fixation ordonnée" pour lequel un substrat B ne peut se fixer que si le substrat A l'est déjà. Or, selon l'hypothèse "clé - serrure", le substrat B devrait se fixer d'emblée.

### **IV-7 Spécificité de l'association protéine - ligand, site actif :**

*Quels sont les facteurs qui expliquent l'extrême spécificité de la reconnaissance entre une protéine et un ligand ?*

**a.** Toutes les protéines se replient dans une conformation dite native et c'est dans cette conformation qu'elles acquièrent leur activité biologique (leur pouvoir de catalyseur dans le cas des enzymes). Ce repliement aboutit à une structure tridimensionnelle unique de la protéine.

**b.** Cette structure globale de la macromolécule permet à une région particulière, (souvent enfouie au sein de la protéine), d'adopter elle aussi une structure spatiale qui est reconnue par le ligand spécifique de la protéine (et, le cas échéant, par un petit nombre de molécules dont la structure est proche de celle du ligand).

**c.** Le site actif est constitué d'un petit nombre d'acides aminés, qui le plus souvent ne sont pas proches dans l'enchaînement de la chaîne polypeptidique. Ces acides aminés sont caractérisés par une chaîne latérale dont à la fois la nature chimique (groupement ionisable ou polarisable) et la structure (encombrement stérique) sont particulières.

**d.** La stéréochimie qui résulte de cet agencement unique des acides aminés qui constituent le site actif est la cause de la stéréospécificité de reconnaissance entre ces acides aminés et le (ou les) ligand(s).

**e.** Les enzymes ne fixent pas seulement un ligand (un substrat) ; elles le transforment en un produit lors d'une réaction chimique. Certains acides aminés du site actif ont pour fonction, non pas de fixer le substrat, mais de fournir les groupements chimiques nécessaires à la réaction catalysée par l'enzyme. Dans le cas des enzymes, on distingue donc au sein du site actif, les acides aminés qui constituent le site de fixation (ces acides aminés n'ont pas de fonction chimique impliquées dans la réaction) et les acides aminés qui constituent le site catalytique.

On peut citer divers types d'association entre une protéine et un ligand : les complexes enzymes - substrat, enzyme - régulateur (inhibiteur, activateur ...), antigène - anticorps, histones - ADN et protéines - hormones.

### Références:

- [1] T.E. Creighton. Proteins: structures and molecular properties. Edition W.H. Freeman, 2eme Edition, P45, **1993**.
- [2] V. Muñoz, Protein folding, misfolding and aggregation: classical themes and novel approaches. Edition Royal Society of Chemistry, P89, **2008**.
- [3] S. Karger, *Journées médicales Nestlé*. Acides aminés. Edition AG, **1954**.
- [4] L.M. Prescott, J.P. Harley, A. Donald. Microbiologie. Edition De Boeck Supérieur, P156, **2002**.
- [5] G. Karp. Biologie cellulaire et moléculaire. Edition De Boeck Supérieur, **2004**.
- [6] L. Stryler, J. M.Berg, J.L. Tymoczko. Biochimie. Edition Flamation Médecine, Scientifiques (6ème édition) chapitre 2, P16, **2008**.
- [7] L.P Graham, Chimie pharmaceutique (traduction de la 2<sup>ème</sup> édition), P20, **2003**.
- [8] American Peptide Society. Peptides: the wave of the future : proceedings of the Second International and the Seventeenth American Peptide Symposium. Edition American Peptide Society, P415, **2001**.
- [9] Y. Shimonishi. Peptide science, present, and future. Edition Gulf Professional Publishing, P72, **1999**.
- [10] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, and P.E. Bourne. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 235-242. **2000**.
- [11] C. Branden, J. Tooze. Introduction to protein structure. Edition Garland Publishing. **1999**.
- [12] H.J. Greenberg, W.E. Hart, G. Lancia, Opportunities for combinatorial optimization in computational biology. *INFORMS Journal on Computing*, 16, **2004**.
- [13] T.H. Gordon, J.C. Wooley. Computational challenges in structural and functional genomics. *IBM Systems Journal*, 265-296. **2001**.
- [14] T. Lengauer. Computational biology at the beginning of the post-genomic era. In R. Wilhelm, editor, Informatics : 10 Years Back - 10 Years Ahead, Lecture Notes in Computer Science, Springer- Verlag, 341-355. **2001**.
- [15] J.C. Setubal and J. Meidanis. Introduction to Computational Molecular Biology. Edition PWS Publishing Company, P68, **1997**.
- [16] C. Branden. J. Tooze, Introduction to Protein Structure, Second Edition, Chapitre 2, edition Garland Pub. P76, **1999**.

- [17] H. Reginald. M. Garrett, C. Grisham, *Biochimie*. Edition De Boeck superieur Chapitre 6, P159. **2000**.
- [18] H. Reginald. M. Garrett, C. Grisham, *Biochimie* (traduction de la 2<sup>ème</sup> édition américaine, 427- 435. **2000**.
- [19] L. Michaelis, M.L. Menten, Die Kinetik der ïnvertinwirkung *Biocheui.* , 333-369. **1913**.
- [20] E. Golemis. Protein-protein interactions: a molecular cloning manual. Edition CSHL Press, **2002**.
- [21] J. Wallach. Les enzymes, Edition Nathan de Paris, *Vol 161*, P128 , **1997**.
- [22] J. Stolkowski. Les enzymes, Edition Presses universitaires de France, vol 434, P98, **1983**.
- [23] L. Penasse. Les enzymes: cinétique et mécanisme d'action, Edition Masson, Volume 2 de Maîtrises de biologie, **1974**.
- [24] P. Monsan. Les Enzymes: Production et utilisations industrielles, Edition Gauthier-Villars, Volume 3 de Biochimie appliquée, **1982**.
- [25] V. Henri. A. Hermann, Lois Générales de l'Action des Diastases, Edition Librairie Scientifique, Paris, **1903**.



### **Introduction :**

La discussion que nous allons engager est basée sur les énergies d'interactions et les distances entre certains groupements de la chaîne latérale de l'enzyme et ceux des ligands.

Par conséquent l'optimisation des interactions de Van Der Waals de type attractif a lieu lorsque les géométries du site actif de liaison de l'enzyme et celle du substrat deviennent davantage complémentaires (modèle clé- serrure). Il est à noter qu'une parfaite complémentarité de forme entre l'enzyme et le substrat est très rare.

Il faut signaler que tant que les atomes du substrat et de l'enzyme ne sont pas trop proches, les interactions de type de Van der Waals restent de nature attractive et certainement vont stabiliser le complexe formé. Il existe des situations défavorables dans lequel nous avons un très grand espace « vide » entre l'enzyme et le substrat.

Cette situation peut engendrer un changement conformationnel qui se produit afin de pouvoir accommoder l'établissement d'une nouvelle interaction entre enzyme et le substrat. Une interprétation possible suggère la création d'une grande différence entre ces deux entités du point de vue énergétique. Ceci ne peut être compensé par la formation d'une nouvelle interaction.

### **I. Préparation de l'enzyme :**

Le téléchargement de la Ribonucléase a été fait à partir de la base de données **Bookhaven Protein Data Bank (code d'accès 2BNH)**.

Les calculs effectués pour cette étude sont :

- 1-Un calcul de mécanique moléculaire (optimisation de la géométrie moléculaire).
- 2- Un calcul de dynamique moléculaire effectuée pour toutes les structures de départ (2BNH seule, inhibiteurs).
  - a Le positionnement des inhibiteurs dans le site actif de la 2BNH, c'est-à-dire le docking moléculaire.
  - b Une fois que le complexe (2BNH-Inhibiteur) est formé, celui-ci va

adopter la conformation la plus stable correspondant au niveau énergétique le plus faible, et c'est cette conformation qui sera recherchée lors des simulations par dynamique moléculaire effectuée pour tous les complexes formés.

La discussion des résultats de calcul a été basée sur les résultats de l'énergie d'interaction obtenus entre la 2BNH et les inhibiteurs.

### **Visualisation tridimensionnelle des molécules**

Depuis longtemps la modélisation moléculaire occupe une place primordiale dans la recherche en chimie, l'évolution des ordinateurs ces dernières décennies est devenu une partie intégrante de la vie du scientifique avant 1984, peu de scientifiques utilisaient un ordinateur personnel ; il était réservé au chimiste très expérimenté d'utiliser des programmes complexes difficile à maîtriser. La possibilité de visualiser de grosses molécules biologiques par ordinateur est très intéressante parce qu'il est très difficile de parler par exemple de la structures d'une hélice  $\alpha$  et des interactions qui en assurent la stabilité sans l'observer véritablement. Donc la visualisation tridimensionnelle de la structure moléculaire est nécessaire à la compréhension des processus biologiques.

L'hypothèse concernant l'importance de la forme des molécules avait été émise dès 1946. Pauling et Astbury en 1951 proposent des modèles théoriques de structures secondaires hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$ , les logiciels de visualisation et de manipulation des molécules sont actuellement disponibles avec des fonctionnalités conviviales (par exemple : Hex4e [1], Rasmol version 2.6 [2] et Hyperchem 7.5 version Professionnelle [3]).

- **Rasmol**

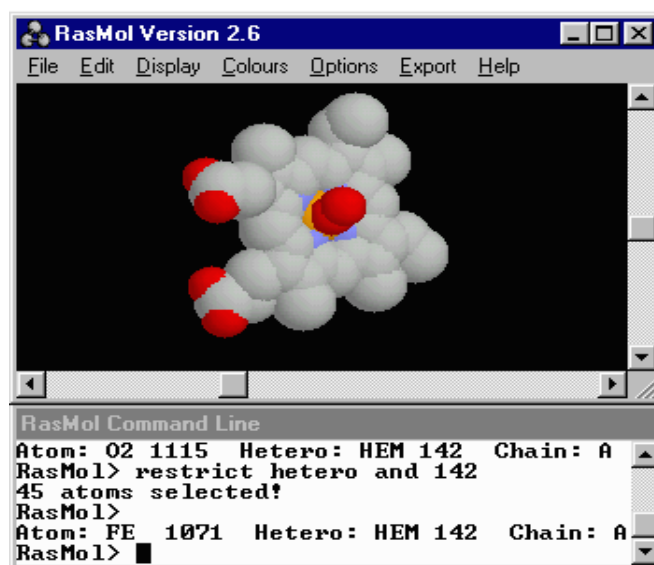
Le logiciel Rasmol :

- Fonctionne sous Windows
- Il est exploitable à partir d'un ensemble de deux fenêtres :  
Une fenêtre donnant l'accès à des macros commandes (menu) et à l'affichage de l'image et une deuxième dans laquelle, à la fois on récupère

des informations (séquence, position, distance...) et on signifie les instructions en utilisant un langage simple de commande.

Il ouvre des fichiers de molécules assez volumineuses (plus de 1000 atomes).

- Un comporte des fonctions d'affichage des informations (nom de la molécule, sa séquence par chaîne, ses structures) qui sont lues dans le fichier PDB.
- Il permet d'avoir différents modes de visualisation du modèle moléculaire : sphères, bâtonnets, sphères et bâtonnets, ruban,...

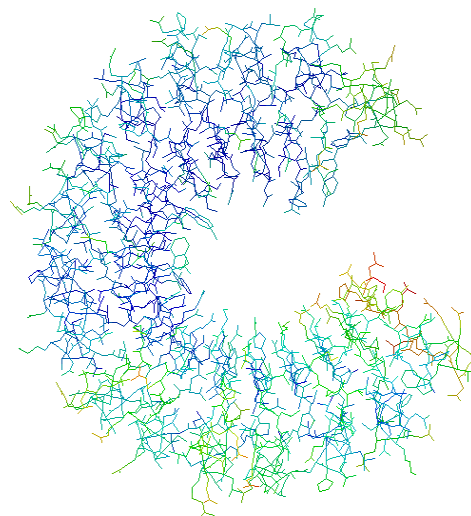
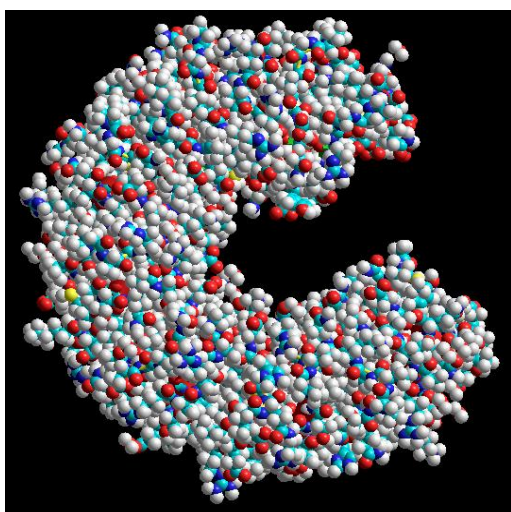


**Figure 1 : Aperçu sur les deux fenêtres de Rasmol.**

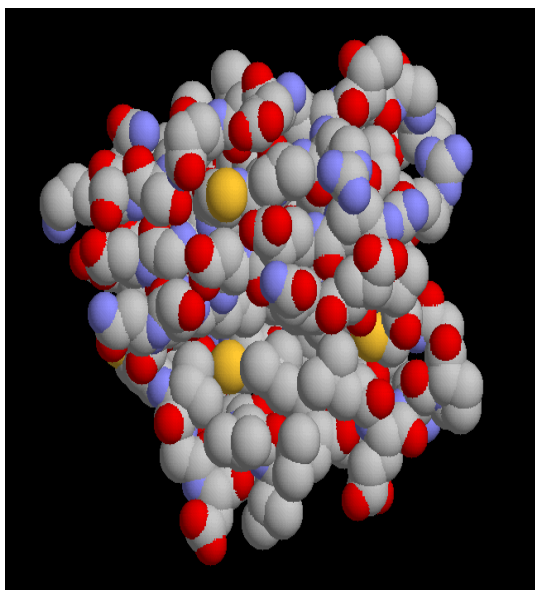
- Tous les éléments composant une molécule sont accessibles en cliquant directement sur l'écran. On peut ainsi les identifier, obtenir des indications sur les distances ou les angles entre atomes.

La structure tridimensionnelle de la Ribonucléase (2BNH) a été obtenue par diffraction en rayon X avec une résolution (2.30 Å) [4]. On remarque que la ribonucléase 2BNH se cristallise sous la forme d'un monomère (figure 2), avec 456 résidus et 3411 atomes.

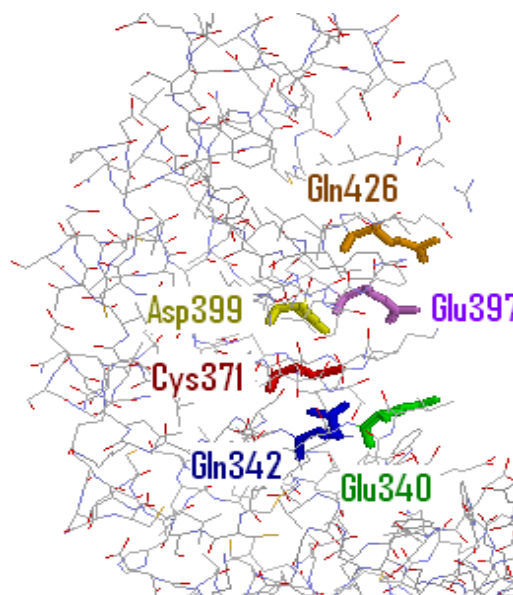
- ❖ Avec l'effet réducteur de la modélisation moléculaire, nous avons simplifié le modèle de l'enzyme on éliminé les molécules d'eau, ceci nous a permis d'obtenir le modèle suivant: (figure 3).Ce modèle comporte les acides aminés formant le site actif (figure4).



**Figure 2** : la forme monomère de la Ribonucléase 2BNH



**Figure 3** : Modèle simplifié de la Ribonucléase 2BNH



**Figure 4** : Acides aminés du site actif

### II. Préparations des ligands :

Il est nécessaire d'attribuer à chaque atome un potentiel, c'est à dire une charge partielle électronique. Ce potentiel va dépendre de l'environnement chimique dans lequel chaque atome est placé et du champ de force qui sera utilisé. L'objectif d'un champ de force est de décrire une classe entière de molécules avec une précision raisonnable. Il représente une des approximations dans la modélisation moléculaire. La qualité d'un champ de force, son application au système d'une part, et sa bonne qualité prédictive des propriétés mesurées lors des simulations, d'autre part, influencent directement sur la validité des résultats.

De là, vient la nécessité d'utiliser le champ de force le plus performant possible et qui soit adapté au type de molécules à modéliser.

### III. Minimisation de l'énergie :

Les méthodes de minimisation ont deux rôles principaux. Le premier à un rôle d'auxiliaire d'autres méthodes, par exemple pour effectuer une analyse et avant d'entreprendre le calcul d'une trajectoire de dynamique moléculaire, il peut s'avérer nécessaire d'optimiser une structure, c'est à dire d'éliminer toutes les interactions stériques fortement défavorables. [1]. Le second rôle est celui de l'exploration dans l'espace conformationnel. Cela permet d'avoir une estimation de la barrière de potentiel entre deux conformations. L'objectif des méthodes de minimisation est extrêmement simple : étant donné une fonction d'une ou plusieurs variables indépendantes, il s'agit de trouver la valeur de la variable pour laquelle la fonction est la plus faible.

La minimisation de l'énergie d'une molécule est faite en deux étapes :

Tout d'abord, une équation décrivant l'énergie du système est exprimée en fonction des coordonnées des atomes. Puis cette équation sera définie et évaluée pour une conformation donnée. Ensuite, la conformation est ajustée à la valeur minimale de cette équation. Un minimum peut être trouvé après un ajustement, ou par contre il peut demander plusieurs milliers d'itérations, dépendant de la nature de l'algorithme utilisé, du type d'équation utilisée et de la taille de la molécule. Au niveau de notre étude, la minimisation a été effectuée sur la Ribonucléase seule, les ligands et les complexes.

### **III-1 Optimisation de la Ribonucléase 2BNH**

L'optimisation de la géométrie de la ribonucléase 2BNH a été effectuée à l'aide du **champ de forces Amber99** [5] implanté dans le logiciel **Hyperchem7.5 version professionnelle**.

La chaîne principale a été maintenue rigide, tandis que les chaînes latérales restent souples. Cette approximation permet aux chaînes latérales des protéines de trouver plus facilement la position dans laquelle les interactions sont les plus favorables.

La valeur de l'énergie d'optimisation est :

$$E_{\text{Opt}} = -5722.1777 \text{ Kcal/mol}$$

### **III-2 Optimisation des substrats:**

La construction et l'optimisation de ligand étaient faites par le programme EMO (Energie d'une Molécule)

-La minimisation de l'énergie stérique de ces ligands a été effectuée en utilisant l'optimisation SCAN, qui permet :

- Un balayage de la surface d'énergie
- D'éliminer les conformères les moins probablement stables
- D'éviter les minima locaux.

-Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau suivant :

**Tableau 1** : Résultats obtenus à l'aide du programme EMO

<b><u>Énergie stérique</u></b> <b>(KJ/mole)</b>	<b><i>Élongation</i></b>	<b><i>Valence</i></b>	<b><i>Torsion</i></b>	<b><i>VDW.</i></b>	<b><i>Électro.</i></b>	<b><i>Solvant</i></b>	<b><i>Totale</i></b>
<b><i>Inhibiteur1</i></b>	13.65	66.76	55.97	175.26	-143.95	00.00	167.68
<b><i>Inhibiteur2</i></b>	17.23	81.87	105.22	197.89	-213.26	00.00	188.96
<b><i>Inhibiteur3</i></b>	18.39	100.62	117.43	229.12	-175.29	00.00	290.26
<b><i>Inhibiteur4</i></b>	14.30	58.73	66.22	148.37	-78.28	00.00	209.34

#### **IV. Dynamique Moléculaire :**

La connaissance à un niveau atomique des aspects structuraux et dynamiques des systèmes organisés est particulièrement importante pour mieux comprendre les fonctions de ces édifices moléculaires complexes. Dans de nombreux cas, l'obtention du détail microscopique par les techniques expérimentales conventionnelles s'avère impossible. Cependant, la véritable évolution des moyens informatiques amorcée depuis une dizaine d'années, et le développement d'algorithmes performants, rendent possible l'étude d'assemblages supramoléculaires de complexité croissante par les méthodes de chimie théorique.

Le principe de la dynamique moléculaire est de fournir de l'énergie cinétique au système pour franchir des barrières énergétiques.

En générale, l'algorithme de la plus grande pente ou «steepest descent» est utilisé au début, pendant 100 à 200 pas. Après l'algorithme de gradient conjugué ou «Conjugate Gradient» peut être utilisé pour compléter la minimisation jusqu'à la convergence. La convergence dans l'algorithme de «Steepest Descent» est lente, mais cette méthode est extrêmement robuste. Cet algorithme est surtout utilisé lorsque les conformations sont éloignées de leur minimum d'énergie. L'algorithme du gradient conjugué est la méthode de choix pour les grands systèmes moléculaires, puisqu'il présente l'avantage de la convergence rapide.

La dynamique moléculaire a été effectuée sur la ribonucléase 2BNH seule, les ligands seules et les complexes.

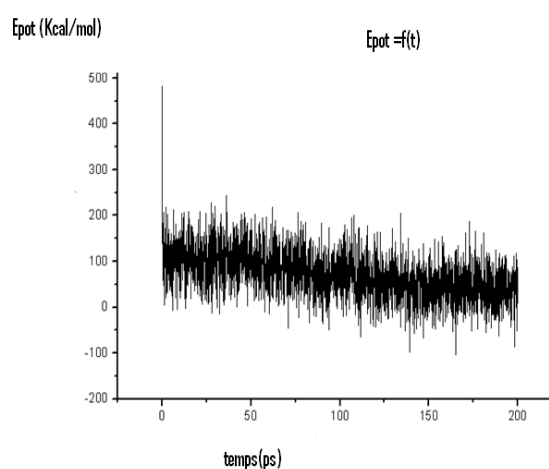
### IV-1 Dynamique moléculaire de la Ribonucléase

Nous avons commencé la dynamique par une initialisation du système : à  $t=0$  nous avons  $r(t)=0$ , c'est-à-dire la structure initiale, précédemment minimisée. Puis nous avons chauffé le système jusqu'à 300 K pendant 1000 pas avec un pas d'intégrations de 1 fs.

A 300 K, il y a une équilibration : les vitesses sont réajustées pour conserver la température constante (il y a échange entre l'énergie cinétique et l'énergie potentielle). Ensuite, il y a production de conformations. Le temps de simulation de la dynamique moléculaire est de 100 ps [6].



**2BNH**

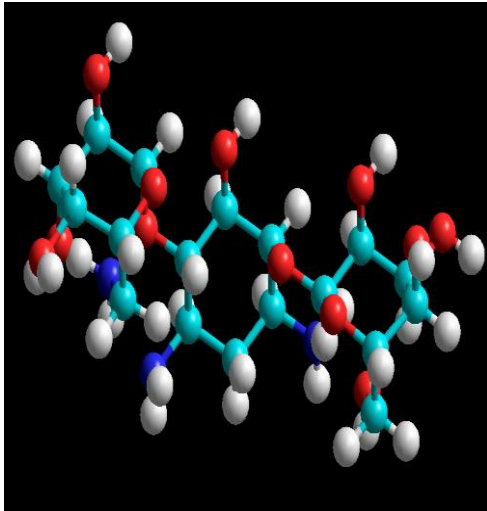


**Figure 5** : variation de l'énergie potentielle de la 2BNH seule en fonction du temps

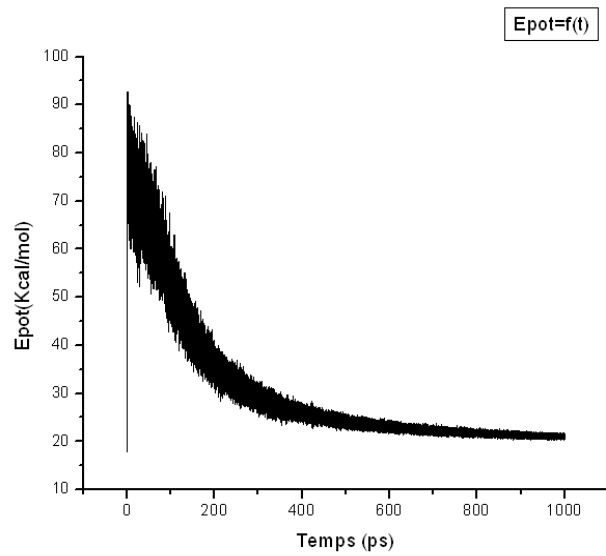


IV-2 Dynamique moléculaire des inhibiteurs :

a / Inhibiteur 1 :

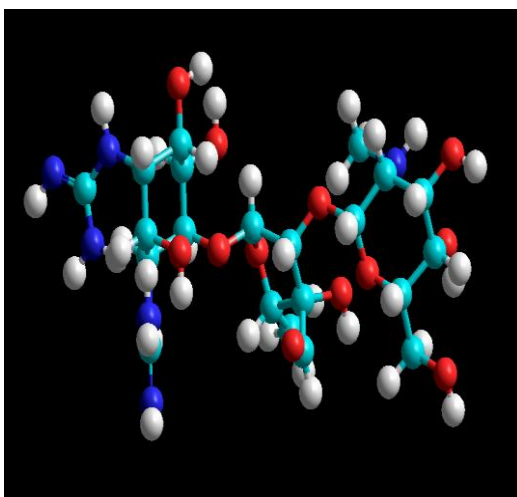


Inhibiteur\_1

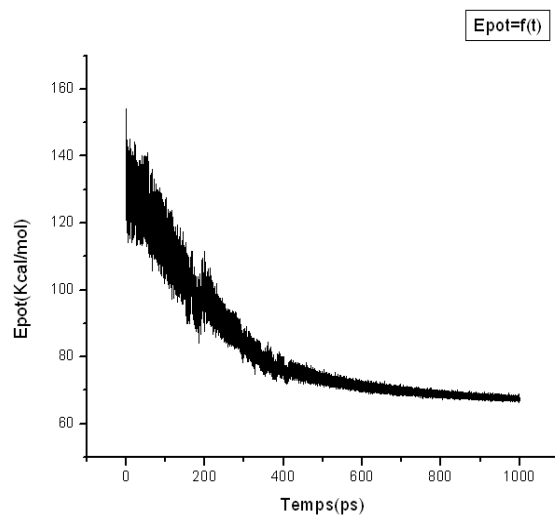


**Figure 6 :** variation de l'énergie potentielle d'inhibiteur\_1 en fonction du temps

b/ Inhibiteur 2 :

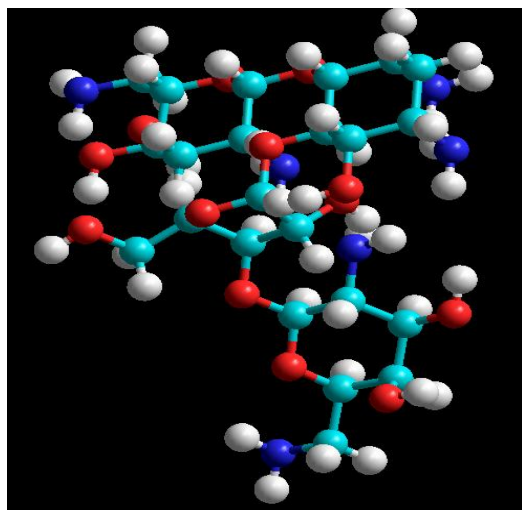


Inhibiteur\_2

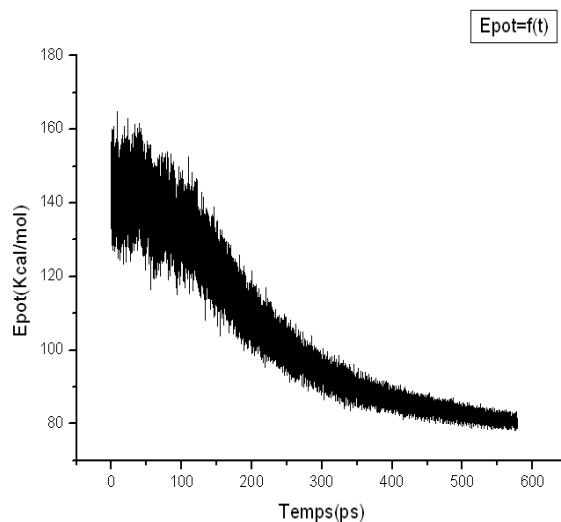


**Figure 7 :** variation de l'énergie potentielle d'inhibiteur\_2 en fonction du temps

c/ Inhibiteur\_3 :

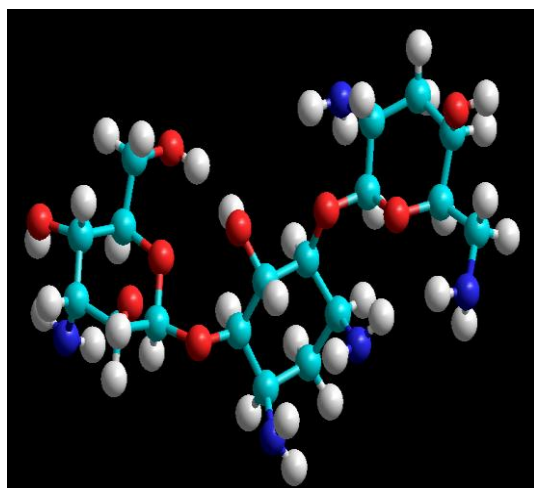


Inhibiteur\_3

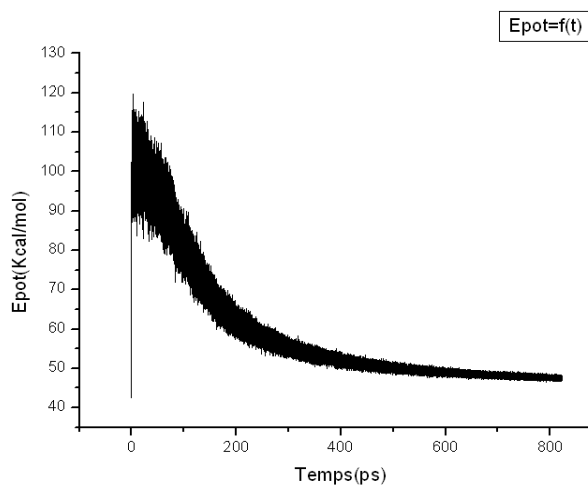


**Figure 8** : variation de l'énergie potentielle d'inhibiteur\_3 en fonction du temps

d / Inhibiteur\_4 :



Inhibiteur\_4



**Figure 9** : variation de l'énergie potentielle d'inhibiteur\_4 en fonction du temps

### **V. Docking des substrats et construction des complexes :**

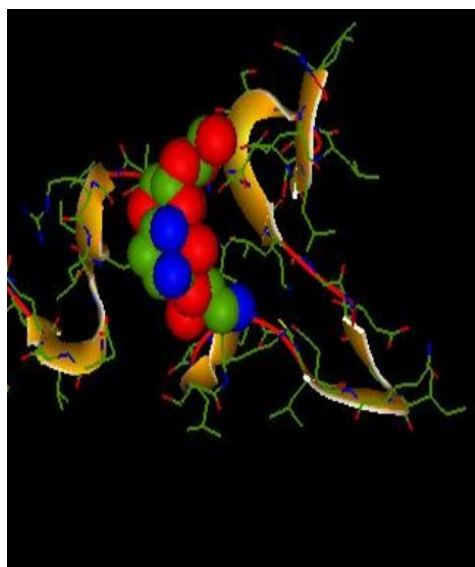
L'étape suivante, après la construction des ligands, et le positionnement de ces molécules dans le site actif de la ribonucléase 2BNH. Pour ce faire, nous avons utilisé le module Docking Moléculaire à l'aide logiciel Hex4 [1].

Une fois que le complexe ligand- récepteur est formé, celui-ci va adapter la conformation la plus stable, c'est à dire avec le niveau énergétique le plus faible.

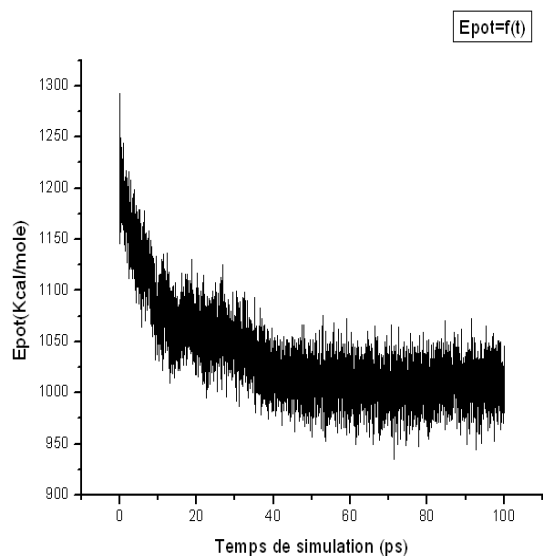
### **VI. Dynamique moléculaire des complexes :**

Une fois tous les complexes formés, nous allons effectuer une optimisation de la géométrie et un calcul de dynamique moléculaire pour chercher la conformation la plus stable.

**Complexe 2BNH inhibiteur 1 :**

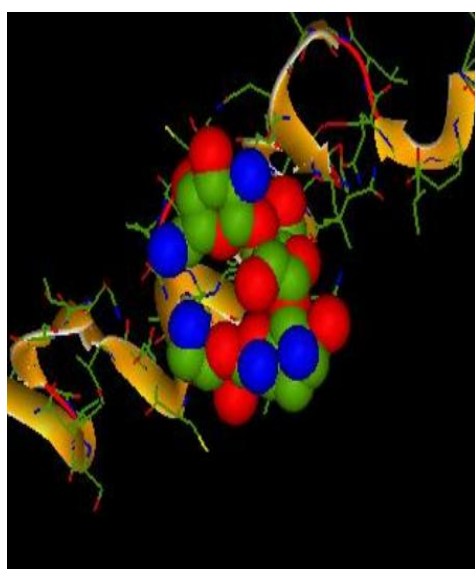


Complexe 2BNH inhibiteur\_1

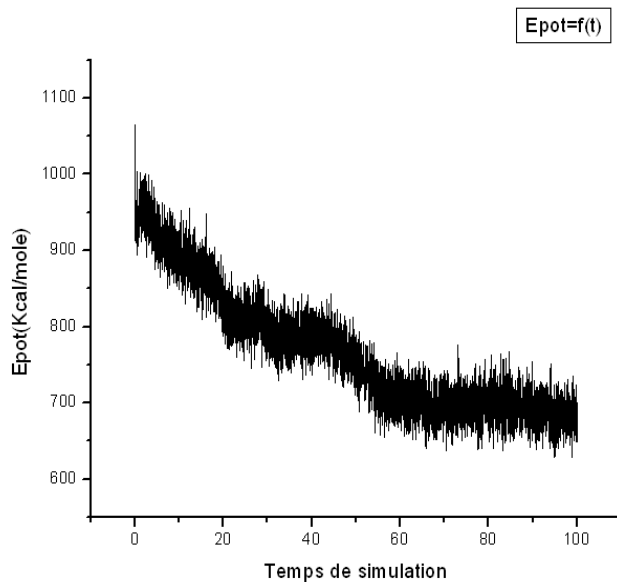


**Figure 10 :** Variation de l'énergie potentielle du complexe\_1 en fonction du temps

**Complexe 2BNH inhibiteur 2 :**

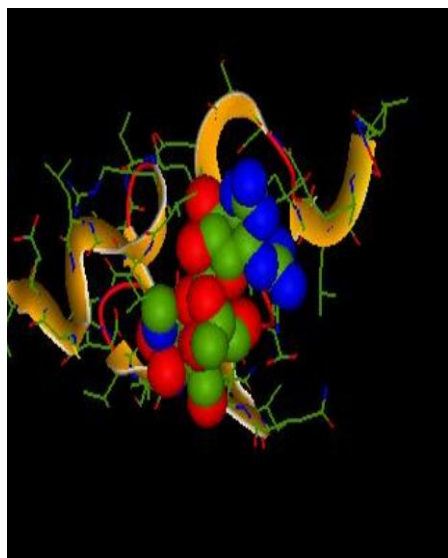


Complexe 2BNH inhibiteur\_2

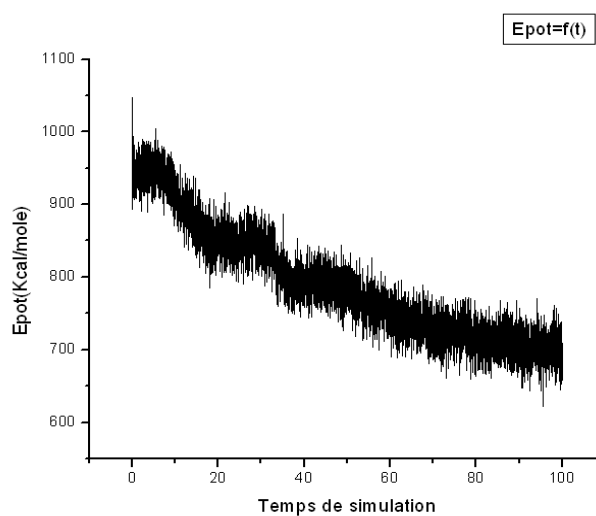


**Figure 11 :** Variation de l'énergie potentielle du complexe 2 en fonction du temps

**Complexe 2BNH inhibiteur 3 :**

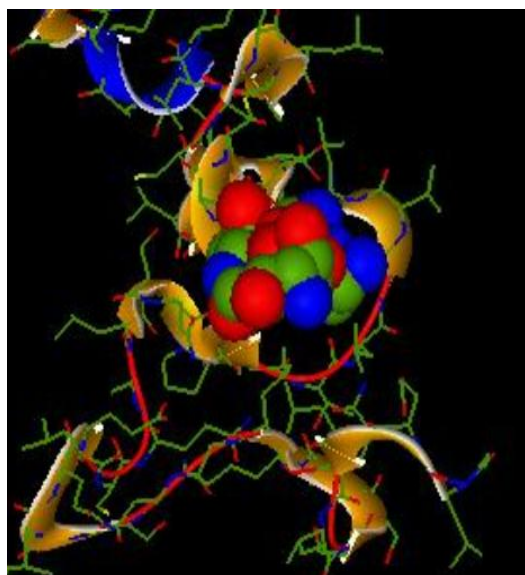


Complexe 2BNH inhibiteur\_3

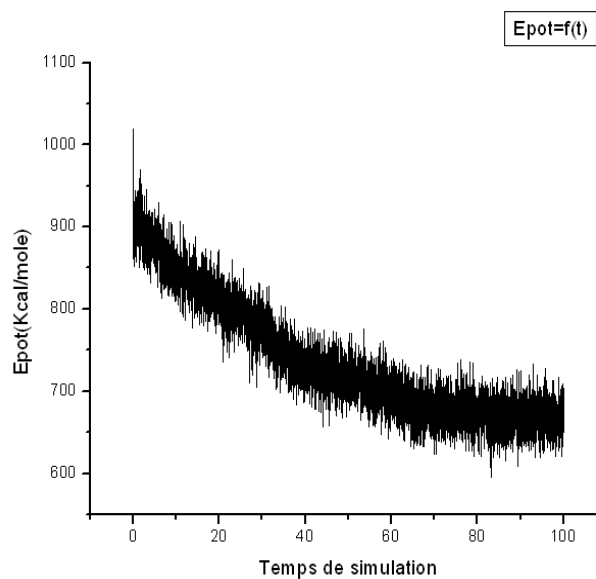


**Figure 12** : Variation de l'énergie potentielle du complexe\_3 en fonction du temps

**Complexe 2BNH inhibiteur 4 :**



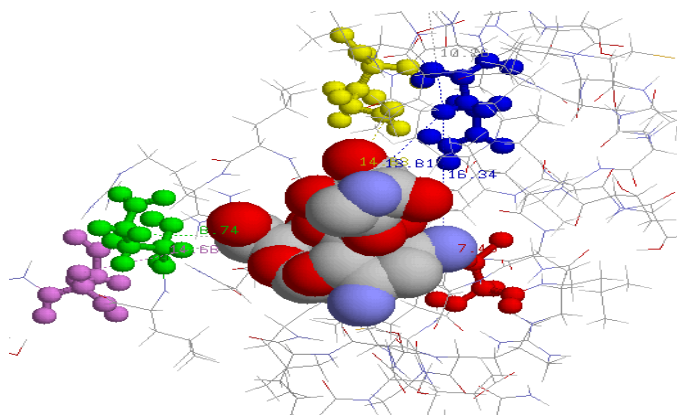
Complexe 2BNH inhibiteur\_4



**Figure 13** : Variation de l'énergie potentielle du complexe 4 en fonction du temps

**VII. Distances séparant les acides aminés du site actif et les groupements des inhibiteurs :**

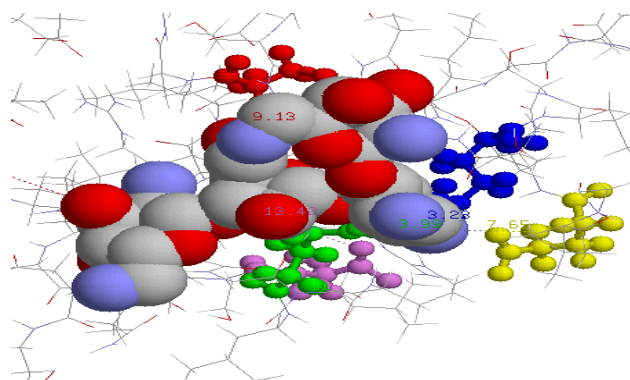
**a. Inhibiteur 1 :**



**Tableau 2 :** Distances mesurées entre l'inhibiteur\_1 et les groupements des chaînes latérales des aminosides responsable d'interaction.

Distances(Å)	Glu397	Asp399	Cys371	Gln342	Glu340
Inhibiteur 1	8.74	14.68	7.49	13.81	14.83

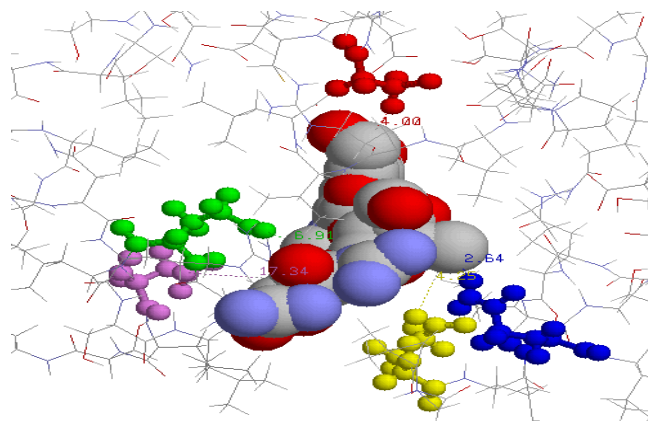
**b. Inhibiteur 2 :**



**Tableau 3 :** Distances mesurées entre l'inhibiteur\_2 et les groupements des chaînes latérales des aminosides responsable d'interaction.

Distances(Å)	Glu397	Asp399	Cys371	Gln342	Glu340
Inhibiteur 2	3.99	13.42	9.13	3.24	7.65

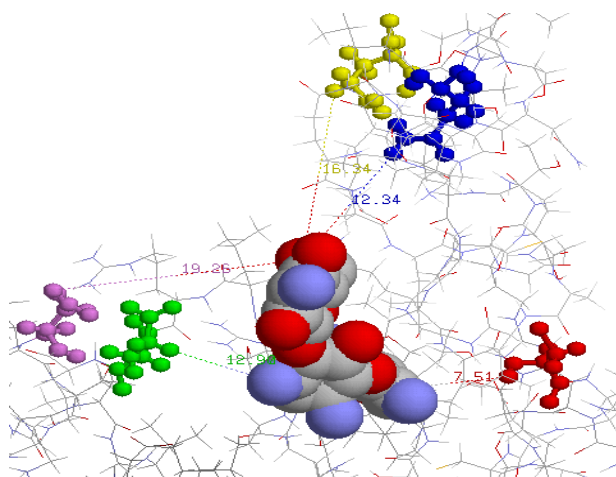
c. Inhibiteur 3 :



**Tableau 4** : Distances mesurées entre l'inhibiteur\_3 et les groupements des chaînes latérales des aminosides responsable d'interaction.

Distances(Å)	Glu397	Asp399	Cys371	Gln342	Glu340
Inhibiteur 3	6.91	17.34	4.00	2.64	4.25

d. Inhibiteur 4 :



**Tableau 5** : Distances mesurées entre l'inhibiteur\_4 et les groupements des chaînes latérales des aminosides responsable d'interaction.

Distances(Å)	Glu397	Asp399	Cys371	Gln342	Glu340
Inhibiteur 4	12.90	19.26	7.51	12.34	16.34

Nous avons mesurés les distances entre les quatre inhibiteurs, et les acides aminés qui constituent le site actif. Les distances mesurées varient entre 2.64 Å et 19.26 Å pour tous les complexes étudiés. Les interactions comprises entre 2.5 Å et 3.1Å sont considérés comme fortes et celles comprise entre 3.1Å et 3.55Å sont supposées moyennes. Les interactions supérieures à 3.55Å sont faibles [7].

### VIII. Énergie d'interaction :

Dans le but d'établir des corrélations entre les énergies d'interaction et les activités, et pour envisager par quel type de forces la nature des interactions ribonucléase 2BNH-substrat est gouvernée, on fait souvent référence à une décomposition de l'énergie potentielle totale de la molécule en plusieurs termes (Énergie électrostatique, Energie de VDW,...).

Les énergies d'interaction entre les différents substrats étudiés et la ribonucléase 2BNH sont obtenues à l'aide de la relation suivante :

$$E_{\text{interactions}} = (E_{\text{potentielle totale complexe ribonucléase 2BNH-substrat}}) - (E_{\text{potentielle totale ribonucléase 2BNH seule}} + E_{\text{potentielle totale Substrat}})$$

Il faut tenir compte également des interactions de Van Der Waals puisque c'est les interactions entre atomes non liés qui stabilisent les complexes Enzyme-Inhibiteur.

**Tableau 6** : Bilan des énergies en (Kcal/mol) :

	$E_{\text{totale du complexe}}$ <i>E-S</i>	$E_{\text{totale du substrat}}$ <i>S</i>	$E_{\text{vdw du complexe}}$ <i>E-S</i>	$E_{\text{vdw du substrat}}$ <i>S</i>	$E_{\text{intéra de}}$ <i>VDW</i>	$E_{\text{intéra de}}$ <i>Totale</i>
<b><i>Inhibiteur_1</i></b>	328.036	167.684	-147.106	175.26	-28.538	807.335
<b><i>Inhibiteur_2</i></b>	60.024	188.957	-127.878	197.89	-31.940	518.050
<b><i>Inhibiteur_3</i></b>	44.184	290.258	-156.934	229.12	-92.226	400.909
<b><i>Inhibiteur_4</i></b>	48.482	209.343	-184.857	148.37	-39.399	486.122

Energie de VDW de la ribonucléase 2BNH seule=-293.828 Kcal/mol

Energie stérique de la ribonucléase 2BNH seule=-646.983 Kcal/mol



En se basant sur l'énergie d'interaction totale, on remarque que l'inhibiteur 3 (400.909 Kcal/mol) est plus actif que l'inhibiteur 4 (486.122 Kcal/mol), plus actif que l'inhibiteur 2 (518.335 Kcal/mol) et plus actif que l'inhibiteur 1 (807.335 Kcal/mol).

Pour l'énergie d'interaction de Van Der Waals (généralement retenue pour expliquer les interactions entre atomes non liés qui stabilisent le complexe Enzyme-Substrat).

L'inhibiteur 3 (-92.226 Kcal/mol) est plus stable que l'inhibiteur 4 (-39.399 Kcal/mol), plus stable que l'inhibiteur 2 (-31.940 Kcal/mol), et plus stable que l'inhibiteur 1 (-28.538 Kcal/mol).

**Tableau 7:** Classement des inhibiteurs

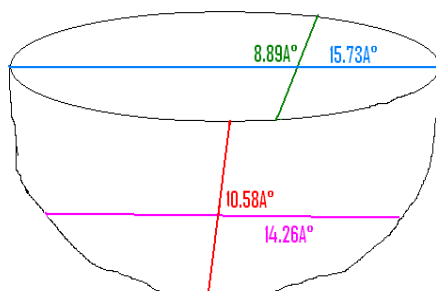
<i>Inhibiteurs</i>	<b>1<sup>er</sup>Classement</b>	<b>2<sup>ème</sup>Classement</b>
<i>Inhibiteur_1</i>	<b>4</b>	<b>4</b>
<i>Inhibiteur_2</i>	<b>3</b>	<b>3</b>
<i>Inhibiteur_3</i>	<b>1</b>	<b>1</b>
<i>Inhibiteur_4</i>	<b>2</b>	<b>2</b>

1<sup>er</sup> Classement : en se basant sur l'énergie d'interaction totale.

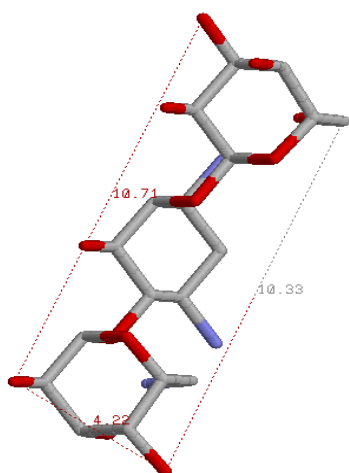
2<sup>ème</sup> Classement : en se basant sur l'énergie d'interaction de Van Der Waals.

L'inhibiteur 3 serait probablement le meilleur pour l'inhibition de la ribonucléase.

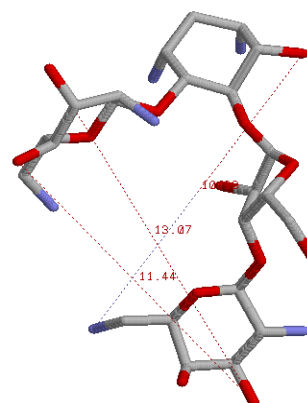
Signalons que nous ne pouvons discuter de complémentarité croissante ou décroissante que dans l'intervalle des dimensions de la poche du site actif, présentant dans notre cas une géométrie de 10.58Å de profondeur, une ouverture de 15.73Å et 8.89Å, cette poche rétrécie atteignant une largeur 14.26Å [8].



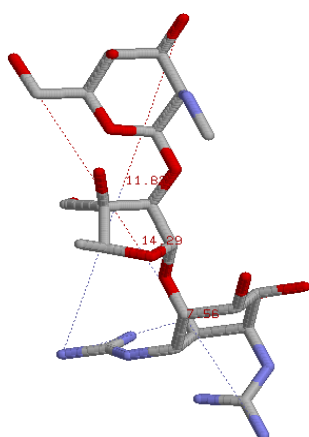
**Dimension de la cavité enzymatique**



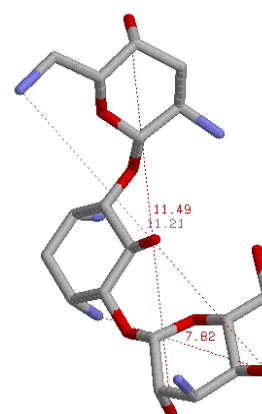
**Inhibiteur\_1**



**Inhibiteur\_2**



**Inhibiteur\_3**



**Inhibiteur\_4**

En tenant compte des différentes contraintes géométriques, l'approche selon les inhibiteurs considérés peuvent influencer la complémentarité et par la suite l'activité.

### Références :

- [1] D. Ritchie. Macromolecular Docking Using Spherical Polar Fourier Correlations, Department of Computing Science, University of Aberdeen, copyright © **1996-2005**.
- [2] H.J. Bernstein. RasMol 2.7.1, Molecular graphics, Biomolecular Structures Group, copyright © **1998-1999**.
- [3] HyperChem (Molecular Modeling System) Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, FL32601; USA, **2005**.
- [4] R.G Ewan, Y. xiong, J. Melanie, L. D'andrea, and Lynne Regan. Design of stable  $\alpha$ -Helical arrays from an Idealized TPR Motif. *Elsevier science Ltd. Vol.11, 497-508, 2003*.
- [5] Société de chimie physique Journal de chimie physique et de physico-chimie biologique, Volume 95, Numéros 4 à 6. Edition Société de chimie physique, **1998**.
- [6] S. Sari, W. Medjahed, J.K. Mulengi, S. Ghalem. Approach of the Interaction Enzyme – Substrate by Molecular modeling. *Asian journal of chemistry. Vol.19, N°.3, 2117-2124. 2007*.
- [7] I. Abdelli, S. Sari, C.Z. Cherif, S. Ghalem. Theoretical Study of the Inhibition of Beta-Secretase. *Asian journal of chemistry. Vol.19, N°.7, 5407-5416, 2007*.
- [8] W. Soufi, M. Merad, F. Boukli, S. Ghalem. The Complementarity Effect for Cdc25 Phosphatase Inhibitors. *Advances in Molecular Imaging, 17-23. 2011*.

## Conclusion Générale

---

Dans ce mémoire, une étude des interactions moléculaires entre la ribonucléase 2BNH et ses inhibiteurs a été réalisée grâce à des outils de modélisation moléculaire.

Cette étude comprend cinq chapitres :

1/ Dans le premier chapitre nous avons donné une bref définition sur les antibiotiques, ainsi leurs classes, leurs mode d'action et les familles les plus courantes.

2/ Dans le deuxième chapitre, nous avons présenté la modélisation moléculaire dont nous avons définie en détails les notions suivantes: la mécanique quantique, la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire et le docking moléculaire [1], se sont les méthodes de base de la modélisation moléculaire. Comme nous avons définie aussi la notion du champ de force qui représente l'une des approximations en modélisation moléculaire.

3/ Dans le chapitre III, nous avons donné un aperçu sur l'analyse conformationnelle [2], qui demeure une méthode permettant de calculer l'énergie relative associée à la conformation d'une molécule, dans le but de trouver le plus de minima possible [3].

4/ Le chapitre IV, des notions sur les acides aminés, peptides et protéines sont apportées en insistant sur les différentes structures (primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire) [4]. L'importance des différents types d'interactions est signalée. Ces dernières maintiennent les différentes conformations engendrant des activités conséquentes.

. 5/ Le chapitre V, est consacré aux résultats obtenus ainsi que la discussion et l'interprétation de ces derniers est basée sur les énergies d'interactions , les distances entre certain groupements de la chaine latérale de l'enzyme et ceux de substrat

Ce travail nous a permis de faire un classement et aussi de visualiser les interactions établies entre ligand et l'enzyme.

Dans le but de déterminer les interactions protéine-ligand, nous avons effectué des calculs de dynamique moléculaire à partir des structures des complexes pour rechercher la conformation la plus stable correspondante à l'énergie la plus faible qu'adopte le complexe formé. A fin de générer les trajectoires des différents systèmes, nous avons utilisé le champ de force AMBER [5] implanté dans le logiciel Hyper Chem 75.

## Conclusion Générale

---

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que l'interaction des groupements encombrants engendre un réarrangement conformationnelle au sein de la poche du site actif qui probablement augmentera la complémentarité et par conséquent l'activité.

Nous avons mesuré les distances entre les groupements R de chaque inhibiteur et ceux des chaînes latérales des acides aminés constituant le site actif, les énergies totales et les énergies de Van Der Waals. On a trouvé que l'inhibiteur\_3 (streptomycine) est le plus stable.

En perspective, d'autres outils de modélisation plus performants seront utilisés.

Il est à noter que la connaissance moléculaire des complexes enzyme-substrat est hautement difficile, et que notre contribution à la compréhension des processus reste certainement à compléter par l'utilisation des logiciels beaucoup plus performants que ceux que nous avons utilisés [6].

Un autre aspect dont il faut tenir compte et qu'on ne peut le quantifier, est le paramètre RMSD (Root Mean Square Deviation) entre deux conformations supposées.

Par ailleurs, il est envisagé dans le cadre d'un autre magister une étude par homologie qui consiste en la construction de modèles tridimensionnels à partir des données de séquences et il faut tenir compte également de l'effet de solvant qui a été négligé dans notre approche.

### **Références:**

- [1] D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Efficient unbound docking of molecules, **2002**.
- [2] G. Keseru, I. Kolossvary, Molecular Mechanics and Conformational Analysis in Drug Design, Department of Chemical Information Technology, Technical University of Budapest, Blackwell Science Ltd, **1999**.
- [3] I. Kolossvary, W. Guida, *J.Am.Soc*, P118, **1996**.
- [4] R. Garrett, C. Grisham, Biochimie, De Boeck University, chapitre 4, P81. **2000**.
- [5] D.A. Case, D.A. Pearlman, J.W. Caldwell, T.E. Cheatham. W.S. Ross, C.L. Simmerling, T.A. Darden, K.M. Merz, R.V. Stanton, A.L. Cheng, J.J. Vincent, M. Crowley, V. Tsui, R.J. Radmer, Y. Duan, J. Pitera, I. Massova, G.L. Seibel, U.C. Singh, P.K. Weiner, P.A. Kollman, , programme Amber 6, University of California, San Francisco, **1999**.
- [6] J.M. Sauder, W.J. Arthur, L.R. Dunbrack, *J. Mol. Biol*, modelling of substrate specificity of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein, 241-248. **2000**.

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Références.....	10
<b>CHAPITRE I : LES ANTIBIOTIQUES</b>	
I. Définition.....	12
II. Histoire des antibiotiques.....	12
III. Classification des antibiotiques.....	14
IV. Mode d'action des antibiotiques.....	14
V. Famille des antibiotiques.....	16
Références.....	21
<b>CHAPITRE II : LES METHODES DE LA MODELISATION MOLECULAIRE</b>	
Introduction.....	25
I. Méthodes Quantiques .....	26
I.1. Méthode de Hartree-Fock-Roothaan .....	27
I.2. Méthodes semi-empiriques .....	27
II. Mécanique Moléculaire .....	28
II.1. Champ de force en mécanique moléculaire.....	29
II.2. Différents champs de force en mécanique moléculaire.....	32
III. Dynamique Moléculaire.....	33
III.2. Principe de la dynamique moléculaire.....	34
III.3. Un calcul de dynamique moléculaire.....	35
IV. Docking moléculaire (Arrimage).....	36
Références .....	38
<b>CHAPITRE III : ANALYSE CONFORMATIONNELLE</b>	
I. Minimisation de l'énergie stérique .....	41
II. Méthodes de minimisation.....	43
II.1. Méthode de minimisation steepest descent.....	43
II.2. Méthode de minimisation conjugate gradient.....	43
II.3. Méthode de minimisation de Newton Raphson.....	44
II.4. Méthode du recuit simulé.....	44
II.5. Méthode du simplex.....	44
II.6. Conjugaison des différentes méthodes de minimisation.....	45
III. Analyse conformationnelle.....	45
Références.....	49
<b>CHAPITRE IV : ACIDES-AMINES, PEPTIDES, PROTEINES ET ENZYMES</b>	
I. Acides aminés .....	51
I.1. Propriétés physiques.....	53
I.2. Propriétés chimiques.....	53
II. Peptides.....	53
Structure de la liaison peptidique.....	54
III. Protéines.....	55
III.1. Pourquoi modéliser les protéines ?.....	56
III.2. Structure des protéines.....	57
III.2.i. Hélice $\alpha$ .....	58
III.2.ii. Feuillet $\beta$ .....	59

III.3. Repliement des protéines.....	61
III.4. Fonctions des protéines.....	62
IV. Enzymes.....	62
IV.1. Introduction.....	62
IV.2. Site actif.....	63
IV.3. Cinétique enzymatique.....	63
IV.4. Comment fonctionnent les enzymes ?.....	64
IV.5. Catalyse enzymatique.....	65
IV.6. Complexe enzyme- substrat (E-S).....	66
IV.7. Spécificité de l'association protéine- ligand.....	67
Références.....	68
<b>CHAPITRE V : APPLICATION, RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	
Introduction.....	70
I. Préparation de l'enzyme.....	70
II. Préparation des ligands.....	74
III. Minimisation de l'énergie.....	74
III.1. Optimisation de la ribonucléase 2BNH.....	75
III.2. Optimisation des substrats.....	75
IV. Dynamique moléculaire .....	76
IV.1. Dynamique moléculaire de la ribonucléase 2BNH.....	77
IV.2. Dynamique moléculaire des substrats.....	78
V. Docking des substrats et construction des complexes.....	80
VI. Dynamique moléculaire des complexes.....	80
VII. Distances séparant les acides aminés du site actif et les groupements des inhibiteurs...	83
VIII. Energie d'interaction.....	85
Références.....	88
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	
Références.....	91



## Résumé :

La connaissance des enzymes est capitale, car ce sont elles qui catalysent la plupart des réactions chimiques des organismes vivants. L'altération des enzymes par des inhibiteurs spécifiques permet de bloquer les voies biochimiques. Seul un site particulier de la protéine enzymatique entre en contact avec son substrat : c'est le site actif. Celui-ci est encore divisible en deux régions particulières. Le site de fixation permet à l'enzyme de « s'accrocher » à la molécule, et de positionner cette dernière de façon optimale, tandis que le site catalytique déclenche le processus réactionnel.

Notre travail consiste en une étude d'interaction moléculaire entre la ribonucléase 2BNH et les substrats. Les différents outils de la modélisation moléculaire sont utilisés pour mener à bien ce travail (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire et docking moléculaire) ou le docking permet de prévoir comment une petite molécule (drogue) peut se lier à un récepteur (protéine) dont la structure 3D est connue.

**Mots clés :** interaction E-S, conformations, modélisation moléculaire.

## Abstract:

The knowledge of the enzymes is capital, because it is catalyze the majority of the chemical reactions of the living organisms. The deterioration of the enzymes by specific inhibitors makes it possible to block the biochemical ways, only a particular site of enzymatic protein comes into contact with its substrate: it is the active site, This one is still divisible in two particular areas. The site can fixing; it possible the enzyme "to cling" to the molecule, and to position the latter in an optimal way, while the catalytic site starts the reactional process.

Our work consists with a study of molecular interaction between ribonuclease 2BNH and the substrates, the various molecular numerical models are used to conclude this work (mechanical molecular, dynamic molecular and docking molecular) or the docking makes it possible to envisage how a small molecule (drug) can bind to a receiver (protein) of which the structure 3D is known.

**Key words:** interaction ES, conformations, molecular modeling.

ملخص:

إن المعرفة المعمقة للإنزيمات مهمة لأنها مسؤولة عن تحفيز اغلب التفاعلات الكيميائية في الأنظمة الحية تثبيط هذه الإنزيمات الخاصة يسمح بكبح وعرقلة المسارات بيوكيميائية، فقط جزء خاص من البروتين يدخل في الاتصال مع المادة بواسطة مثبطات المعرقة (جزء نشيط)

في هذا العمل نهتم بدراسة التفاعل الجزيئي بين أنزيم الريبونكلياز وبعض الكوابح باستعمال وسائل النمذجة الجزيئية (الميكانيكا الجزيئية، و الديناميك الجزيئية والالتحام الجزيئي)

كلمات المفاتيح التفاعل الجزيئي, بنية, النمذجة الجزيئية.