

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCCEN

Faculté des Sciences

Département de Chimie

Laboratoire des substances naturelles et bioactives

MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Option : Molécules Bioactives : Synthèses et Applications

Présenté Par : M^{elle} BOUZIANE CHAHRAZED

**Titre Etude de l'interaction de la phospholipase A2 et flavanones
isolées de l'Inule Visqueuse par modélisation moléculaire**

| | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|------------|-----------------------|
| Présidents | Saïd Ghalem/Boufeldja Tabti | Professeur | Université de Tlemcen |
| Examineurs : | Hocine Allali | Professeur | Université de Tlemcen |
| | Mourad Bendahou | Professeur | Université de Tlemcen |
| | Mohammed El Amine Dib | MCA | Université de Tlemcen |
| | Nouria Merad | MCA | Université de Tlemcen |
| | Nassim Djabou | MCA | Université de Tlemcen |
| Directeur de mémoire | Meriem Merad-Benyarou | MCA | Université de Tlemcen |

Le 29 Mai 2014

Dédicaces

Dédicaces

Je dédie ce travail :

- ✚ A mes très chers parents pour leurs sacrifices.*
- ✚ A mon fiancé Younes et toute sa famille.*
- ✚ A mon frère Bouziane.*
- ✚ A tous ceux, qui de près ou de loin m'ont aidé à mener à bon terme la réalisation de ce travail.*

Remerciements

*Le présent travail a été réalisé au sein de laboratoire LASNABIO (Laboratoire des substances naturelles et Bioactives) dans l'équipe de modélisation moléculaire de la faculté des sciences, Département de chimie, de l'université de Tlemcen, pour cela je tiens à remercier son directeur Monsieur le professeur **S.GHALEM**.*

*Tout d'abord et en particulier je tiens à exprimer mon profond respect à Madame Le docteur **M.BENJAROU** Maître de conférence à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen et je la remercie pour son aide précieux.*

*J'adresse également mes remerciements à Monsieur le **Dr Mohammed El Amine DIB**, le responsable du master MBSA de son aide et ses encouragements.*

*Mes remerciements vont également aux : **Pr. Hocine ALLALI**, **Pr. Boufeldja TABTI**, **Pr. Mourad BENDAHOU**, **Dr. Nassim DJABOU** et **Dr Nouria MERAD**.*

*Je tiens à remercier la doctorante de modélisation moléculaire madame **LALOUT SOUFI Wassila** pour ces conseils et ces aides précieuses.*

Liste des figures

| | |
|---|-----------|
| Figure 1. Exemple de réaction catalysée par les PLA2 | 6 |
| Figure 2. Squelette de base flavonoïdes et numérotation adoptée | 11 |
| Figure 3. Voies de biosynthèse des flavonoïdes | 15 |
| Figure 4. Les différentes classes de flavonoïdes | 18 |
| Figure 5. Structure des flavanones | 21 |
| Figure 6. 1kvo non simplifiée (744 résidus, 5722 atomes) | 33 |
| Figure 7. 1kvo simplifiée (124 résidus, 1899 atomes) | 33 |
| Figure 8. Acides aminés du site actif | 34 |
| Figure 9. Variation de l'énergie potentielle de la 1KVO seule en fonction du temps | 37 |
| Figure 10. Variation de l'énergie potentielle flavanone-1 en fonction du temps | 38 |
| Figure 11. Variation de l'énergie potentielle flavanone-2 en fonction du temps | 38 |
| figure 12. variation de l'énergie potentielle flavanone-3 en fonction du temps | 38 |
| Figure 13. Site actif de chaque complexe formé | 41 |
| Figure14. Dimensions de la cavité enzymatique | 42 |

Liste des tableaux

Tableau 1 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes

Tableau 2 : Optimisation des substrats

Tableau 3 : Le score de docking moléculaire pour les trois flavanones

Tableau 4 : Distances entre les acides aminés du site actif et groupe des flavanones

Tableau 5 : Bilan des énergies d'interaction en (Kcal/mol)

Liste des abréviations

NO : oxyde nitrique
iNOS : oxyde nitrique synthase inducteur
AIS : anti-inflammatoires stéroïdiens
AINS : anti-inflammatoire non stéroïdiens
PAL2 : phospholipase A2
cPLA2 : phospholipase A2 cytosolique
sPLA2 : phospholipase A2 sécrétoire
UV : ultra violet
AS : aurone synthase
CHI : chalcone isomérase
CHS : chalcone synthase,
DFR : dihydroflavonol 4-réductase
FHT : flavanone 3-hydrolase
FLS : flavonol synthase
FNSI/FNSII : flavone synthase
IFS : isoflavone synthase
LDOX : leucoanthocyanidin dioxygénase
LCR : leucoanthocyanidin reductase
MQ : mécanique quantique
MM : mécanique moléculaire
DM : dynamique Moléculaire
MVD : Molegro Virtuel Docker
RMN : résonance magnétique nucléaire
VCD : dichroïsme circulaire vibrationnel
DFT: density functional theory (théorie de la fonctionnelle de la densité)
VDW : Van Der Waals
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
IR : infra rouge
OPLS : Optimized Potentials for Liquid Simulations
GROMOS : Groningen Molecular Simulation Program Package
CHARM (Bio+) : Chemistry at HARvard Macromolecular
SPASIBA : Spectroscopic Potentiel Algorithm for Simulating biomolecular conformational Adaptability
Emo : Energy Of Molecule
MM2, MM3, MM4 : champs de force d'Allinger

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION | 1 |
| Références | 3 |
| Chapitre I : INFLAMMATION-PHOSPHOLIPASE PLA2 | |
| I- Introduction | 4 |
| II- Inflammation | 4 |
| II-1 Les causes de l'inflammation | 4 |
| II-2 Les anti-inflammatoire | 5 |
| II-2-1 Les anti-inflammatoires stéroïdiens | 5 |
| II-2-2 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens | 5 |
| II-2-3 Les anti-inflammatoires naturels à base de plantes | 6 |
| III- Phospholipase « PAL2 » | 6 |
| III-1 Phospholipase–inflammation | 8 |
| Références | 9 |
| Chapitre II : FLAVONOIDES | |
| I. Structure et origine des flavonoïdes | 5 |
| II. Localisation | 12 |
| III. Distribution | 12 |
| IV. Biosynthèse des flavonoïdes : | 14 |
| V. Les différentes classes de flavonoïdes | 16 |
| VI. Propriétés des flavonoïdes | 19 |
| Références | 22 |
| Chapitre III : MODELISATION MOLECULAIRE | |
| I-1- Mécanique moléculaire | 24 |
| I-1-1- Champ de force | 24 |
| I-1-2- Différents champs de force en mécanique moléculaire | 25 |
| I-2- Dynamique Moléculaire | 26 |
| I-3- Docking Moléculaire | 28 |
| Références | 30 |
| Chapitre : RESULTATS ET DISCUSIONS | |
| Introduction | 32 |
| I- Préparation de l'enzyme | 32 |
| I-1- Visualisation tridimensionnelle des molécules | 33 |
| II. Préparations des ligands | 34 |
| III. Minimisation de l'énergie | 35 |
| III-1 <i>Optimisation de la phospholipase 1KVO</i> | 35 |
| III-2 Optimisation des substrats | 35 |
| IV. Dynamique Moléculaire | 36 |
| IV-1 Dynamique moléculaire de la phospholipase 1KVO | 37 |
| IV-2 Dynamique moléculaire des inhibiteurs | 38 |
| V. Docking des substrats et construction des complexes | 39 |
| VI . Énergie d'interaction | 43 |
| Références | 44 |
| CONCLUSION | 45 |

INTRODUCTION

Depuis toujours, les plantes médicinales ont été utilisées pour prévenir ou soigner diverses maladies et les médicaments actuels ont, pour la majorité d'entre eux, une origine naturelle.

La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques, toujours à la recherche de nouveaux composés actifs, se tournent de plus en plus vers l'identification et la caractérisation de molécules issues de matrices naturelles et s'inspirent de leur structure moléculaire pour imaginer de nouveaux médicaments.

Les flavonoïdes sont des composés naturels [1], qui peuvent être rencontrés dans une large variété de fruits et légumes consommés quotidiennement par l'être humain [2].

En plus de leur rôle dans la pigmentation des végétaux, certains de ces composés présentent des activités biologiques d'intérêts, telles que des actions antiradicalaires et antioxydantes.

Leur grande variété de structure (9000 composés identifiés [3-4-5] et d'activités biologiques (antioxydante, anti-allergique, anti-virale, anti-inflammatoire et inhibitrice) font des flavonoïdes un objet d'étude particulièrement complexe.

Des études ont montré que certains flavonoïdes comme : quercétine, myricétine, l'apigénine et la chrysin ont des effets anti-inflammatoires par l'action inhibitrice des enzymes responsables du métabolisme de l'acide arachidonique.

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[6].

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).

Notre travail consiste à étudier l'inhibition de la phospholipase PAL2 enzyme impliquée dans l'inflammation avec une série de flavanones qui ont été isolées à partir de la plante *Inula Viscosa* . Cette étude [7] a pour but de déterminer l'interaction de l'enzyme

INTRODUCTION

PAL2 avec les flavonoïdes choisies. Pour cela nous nous sommes tournés vers les approches de la modélisation moléculaire.

Avec le développement des outils informatiques dans les 20 dernières années, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire (assemblage ou arrimage moléculaire) a rapidement investi le domaine de la recherche en biologie. Celui-ci peut être défini comme la recherche du meilleur appariement entre deux molécules. Le docking moléculaire sert à prédire et à reproduire les interactions protéine-ligand [8-10] comme il peut servir à l'optimisation de molécules et au criblage de base de données. En pharmacie, la découverte et la mise au point de nouvelles substances médicamenteuses peut passer par le criblage de bases de données avec des millions de composés pour une même protéine cible, ce qui ne serait pas réalisable en biologie classique [11].

En général, la cible est une protéine et le ligand peut être une petite molécule organique ou une protéine.

L'objectif du présent travail est d'étudier l'interaction phospholipase - flavanones par le programme Molégro5.5 dont on s'intéresse à déterminer le mode d'interaction du complexe (phospholipase PAL2- inhibiteur) pour la fixation de l'inhibiteur à l'enzyme, avec une meilleure complémentarité et en calculant l'énergie d'interaction du complexe formé. Le complexe qui a l'énergie d'interaction la plus faible présentera une meilleure activité et par la suite une meilleure inhibition. Ces résultats aideront probablement au développement d'un outil thérapeutique efficace pour lutter contre l'inflammation.

INTRODUCTION

Références:

- [1] Harbone J. B., Baxter H., Handbook of Natural Flavonoids, , 2, **1999** .
- [2] George J. Volikakis, Constantinos E. Efstathiou, Fast screening of total flavonols in wines, tea-infusions and tomato juice by flow injection/adsorptive stripping voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 551, 124-131, **2005**.
- [3] Seikel M.K., Geissman (Ed), The chemistry of Flavonoid Coumpounds, *Pergamon Press*, New York, **1962**.
- [4] Williams C.A., Harbone J.B., Haborn J.B. (Ed)., The Flavonoids-Advances in Research Since 1986, *Chapman and Hall*, London, **1994**.
- [5] Markham K.R., Techniques of Flavonoids Identification, *Academic Press*, London,**1982**.
- [6] AYACHI HICHAM , Analyse de l'interaction Ribonucléase-Kanamycine par modélisation moléculaire, mémoire de Magister, Université Abou-Bakr Belkaid de Tlemcen, **2011**.
- [7]Victoriano Hernández, M.Carmen Recio, Salvador Máñez, Rosa M. Giner, José-Luis Ríos, Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism, *Life Sciences* 81, 480–488, **2007**.
- [8] Wodak S.J., Janin J., Computer analysis of protein-protein interactions. *J. Mol. Biol*, 124, 323-342, **1978**.
- [9] Salemme F.R., An hypothetical structure for an intermolecular electron transfer complex of cytochromes c and b5, *J. Mol. Biol*, 102, 563-568, **1976**.
- [10] Sari S., Medjahed W., Kajima Mulengi J., Ghalem S., Approach of the Interaction Enzyme-Substrate by Molecular Modelling, *Asian Journal of Chemistry*, 19(3), **2007**.
- [11] ABDELLI Imane, Etude de la Structure de la β -Secretase et de ses Interactions avec des inhibiteurs par Modélisation Moléculaire : Cas de la Maladie d'Alzheimer, thèse de de Doctorat, Université Abou-Bakr Belkaid de Tlemcen, **2012**.

I- Introduction :

Un grand intérêt en phytothérapie comme est une source potentielle de produits phytopharmaceutiques qui a créé le besoin d'examiner les facteurs communs responsables de maladies et troubles du corps. Cet avis est un facteur commun dans l'inflammation et la médecine à base de plantes. Ces dernières sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les douleurs diverses ou symptômes liés à l'inflammation. Bien que les mécanismes d'action précis de nombreux médicaments à base de plantes n'ont pas encore été déterminée, certains d'entre eux se sont révélés exercer un anti-inflammatoire et / ou des effets antioxydants dans une variété de cellules dans les organes humains et animaux.

Il est de plus en plus de preuves pour indiquent que les cellules du système nerveux à la fois périphériques et centraux jouent un rôle important dans la chronique inflammatoire et ces constituants sont avérés être un protecteur efficace contre divers médiateurs pro-inflammatoires. Ces médiateurs ont donc été soupçonnés d'être la base fonctionnelle de maladies et de troubles. La diversité structurelle de ces plantes médicinales est une source précieuse des nouveaux composés [1].

II- Inflammation :

L'inflammation est un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à une agression subie. Celle-ci peut être d'origine extérieure comme une blessure, une infection, un traumatisme ou provenir de l'intérieur de l'organisme lui-même comme c'est le cas dans des pathologies auto-immunes. L'inflammation n'est pas synonyme d'infection mais l'infection peut être cause d'inflammation

Ces réactions ont pour but la défense de l'organisme et l'inflammation lorsqu'elle est visible se manifeste classiquement par 4 signes cliniques :

- ❖ Une rougeur,
- ❖ Une douleur,
- ❖ Une tuméfaction,
- ❖ Une augmentation de la chaleur

II-1 Les causes de l'inflammation [2] :

- ❖ L'inflammation peut être causée par des agressions :
 - Physiques (comme le chaud, le froid, les radiations ionisantes),
 - Chimiques (occasionnées par des composés acides ou basiques, des toxines bactériennes).
- ❖ Elle peut être la conséquence d'une infection (en rapport avec la présence dans l'organisme d'organismes vivants pathogènes tels que bactéries, virus, parasites ou champignons).

INFLAMMATION-PHOSPHOLIPASE (PLA2)

- ❖ Elle peut être provoquée par une réaction immunitaire secondaire à la réintroduction dans l'organisme d'un antigène (allergie) tel qu'un antibiotique.
- ❖ Elle est enfin souvent la conséquence d'une nécrose tissulaire, elle-même secondaire à de nombreuses causes, par exemple une occlusion artérielle.

Au cours de l'inflammation, des produits bactériens déclenchent la production d'une grande quantité d'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages et d'autres cellules sous l'action d'oxyde nitrique synthase inducteur (iNOS) [3] bien que la libération de (NO) est très importante pour maintenir la dilatation des vaisseaux sanguins (vasodilatation) mais des fortes concentrations peuvent conduire aux dommages oxydatifs[4] car une fois que le NO est formé il se peut qu'il va réagir avec l'anion superoxyde conduisant à la formation de peroxyde nitrite qui provoque l'endommagement des macromolécules cellulaires. Cependant une production en excès de NO durant une inflammation chronique résulte au développement du cancer [5].

II-2 Les anti-inflammatoire :

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui par définition, s'opposent au mécanisme de l'inflammation. On distingue les anti-inflammatoires stéroïdiens, dérivés de la cortisone et les non stéroïdiens qui en sont dépourvus et les anti-inflammatoires naturels à base de plantes. Ils ont des qualités anti-inflammatoires donc, mais aussi analgésiques, et antipyrétiques. Ils sont utilisés pour certains rhumatismes inflammatoires chroniques et ponctuellement pour les douleurs, la fièvre, les états grippaux. Les deux molécules les plus connues sont l'aspirine et l'ibuprofène. Les anti-inflammatoires peuvent avoir des effets secondaires, notamment gastro-intestinaux et doivent être utilisés avec grande prudence chez les personnes ayant eu un ulcère ou à risque de saignements.

II-2-1 Les anti-inflammatoires stéroïdiens [6]:

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée selon un cycle nyctéméral par le lobe antérieur de l'hypophyse.

II-2-2 Les anti-inflammatoires non stéroïdiens [6] :

Les anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-pyrétique et antalgiques. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS sur le marché mondial.

INFLAMMATION-PHOSPHOLIPASE (PLA2)

II-2-3 Les anti-inflammatoires naturels à base de plantes [6] :

Le nombre de composés phytochimiques, trouvé dans le règne végétal est très vaste, et leur spectre d'activité est tout aussi grand. Certains de ces composés phytochimiques ont des propriétés anti inflammatoire. Beaucoup sont présumés agir en bloquant les voies de la cyclooxygénase et la lipoxygénase ainsi que par d'autres mécanismes

Des études ont montré que certains flavonoïdes comme : quercétine, myricétine, l'apigénine et la chrysin ont des effets anti-inflammatoires par l'action inhibitrice des enzymes responsables du métabolisme de l'acide arachidonique [7].

D'autres études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations, ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires. D'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine [8]. Les flavones et les flavonols sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) [9].

III- PHOSPHOLIPASE « PAL2 » :

En dehors de leurs fonctions digestives ou métaboliques, les phospholipases A2 (PLA2) sont essentiellement connues pour leur rôle dans la biosynthèse de médiateurs lipidiques, qui nécessite la libération de précurseurs tels que l'acide arachidonique.

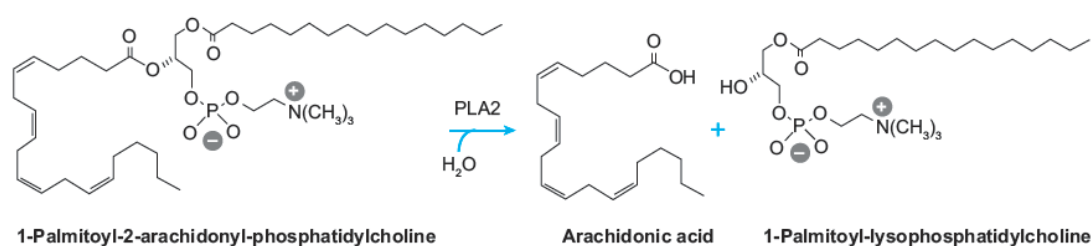


figure1 : Exemple de réaction catalysée par les PLA2

S'il existe un consensus sur le rôle et la régulation de la PLA2 cytosolique (cPLA2), la fonction réelle de la PLA2 de type II, ou PLA2 « sécrétoire » (sPLA2) produite en réponse à des *stimuli* inflammatoires, reste largement inconnue. Une étude récente propose que la sPLA2 agirait préférentiellement sur des microvésicules émises par des cellules ayant perdu leur asymétrie phospholipidique. Parmi les phospholipides devenant ainsi accessibles à cette PLA2 extracellulaire, l'acide phosphatidique, synthétisé par deux voies majeures de

INFLAMMATION-PHOSPHOLIPASE (PLA₂)

signalisation cellulaire, apparaît comme un précurseur potentiel de l'acide lysophosphatidique, médiateur phospholipidique doué de diverses activités biologiques. Ces nouvelles données, ainsi que la découverte récente d'un récepteur de PLA₂ sécrétées, ouvrent des perspectives intéressantes dans divers domaines de physiopathologie et de pharmacologie[10].

Les phospholipases représentent une super famille d'enzymes ubiquitaires chez les organismes eucaryotes supérieurs appartenant à la classe des estérases. On distingue deux sous- classes :

- Les phosphodiéstérases regroupant les phospholipases C et D.
- Les acylhydrolases rassemblant les phospholipases A₁, A₂ et B.

Les phospholipases A₂ (PLA₂) hydrolysent de manière spécifique la liaison ester en position **sn-2** des glycérophospholipides de la série **L** (sn : numérotation stéréospécifique), libérant d'une part un acide gras et un lysophospholipide, d'autre part [11]. Elles sont impliquées dans diverses réponses cellulaires et biochimiques, comme :

- ❖ La transduction du signal.
- ❖ La défense vis- à- vis des agents pathogènes.
- ❖ L'agrégation plaquettaire menant à la coagulation sanguine.
- ❖ La digestion des lipides d'origine alimentaire.
- ❖ Le métabolisme des phospholipides membranaires ce qui permet la restructuration des membranes biologiques.

Les phospholipases sécrétées, dans la majorité des cas, requièrent pour leur activité une concentration en calcium de l'ordre du milimolaire. Ce calcium intervient aussi bien dans la fixation du substrat que dans la catalyse.

Selon leur structure primaire les phospholipases ont été classées en plusieurs groupes [12, 13]:

- ❖ les phospholipases A₂ de groupe I (PLA₂-I) possédant 7 ponts disulfure avec un pont caractéristique entre les cystéines 11 et 77. Ce groupe rassemble essentiellement les PLA₂ pancréatiques de mammifères.
- ❖ Les phospholipases de groupe II (PLA₂- II) caractérisé par un pont disulfure entre les cystéines 50 et C- terminal. Ce groupe englobe les PLA₂ sécrétées non pancréatiques de mammifères.
- ❖ Les phospholipases de groupe III possédant une chaîne polypeptidique de 128 acides aminés avec 4 à 5 ponts disulfure. Ce groupe réunit les PLA₂ des venins d'abeille *Apis mellifera*, et du lézard *Heloderma suspectum* [14].

INFLAMMATION-PHOSPHOLIPASE (PLA₂)

Plus récemment d'autres groupes de PLA₂ ont été décrits. Chez l'homme, les PLA₂-V, PLA₂-X [24] et PLA₂-XII constituent de nouveaux groupes de PLA₂ sécrétés.

III-1 Phospholipase –inflammation :

Phospholipases A₂ a été impliqué dans les diverses conditions pathologiques comme l'arthrite rhumatoïde, les maladies cardio-vasculaires, les désordres et le cancer neurologiques. La communauté scientifique se concentre sur la recherche des inhibiteurs puissants et sélectifs de chaque classe de PLA₂ afin d'identifier les nouveaux agents médicinaux. Aujourd'hui, seul un inhibiteur le lipoprotéine associé de PLA₂ (LpPLA₂) a atteint les jugements cliniques pour le traitement de l'athérosclérose [14].

INFLAMMATION-PHOSPHOLIPASE (PLA2)

Références :

- [1] E. O. Iwalewa^{1,2}, L. J. McGaw¹, V. Naidoo¹ and J. N. Eloff ^{1*}, Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions, *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (25), pp. 2868-2885, 28 December, **2007**.
- [2] Charles Duyckaerts Pierre Fouret Jean-Jacques Hauw, *Anatomie pathologique*, Université Pierre et Marie Curie, **2002-2003**.
- [3] Hämäläinen M., Nieminen R., Vuorela P., Heinonen M. et Moilanen E.. Antiinflammatory effects of flavonoids : genistein, kaempferol, quercetin and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*. (1) : 1-10. **2007**.
- [4] Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E. C., Boelens P. G., Van Norren K. et Van Leeuwen P. A. M. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition*., 74 : 418-425, **2001**.
- [5] [Tsai T. H., Tsai P. G. et Ho S. C. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used species. *Journal of food science*., 70 (1) : C93-C97, **2004**.
- [6] FERRADJI Ayoub, Activités antioxydante et anti-inflammatoire des extraits alcooliques et aqueux des feuilles et des baies Pistacia lentiscus, mémoire de Magister, Université Ferhat Abbas –Setif, **2011**.
- [7] Victoriano Hernández, M.Carmen Recio , Salvador Máñez, Rosa M. Giner, José-Luis Ríos, Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism, *Life Sciences* 81,480–488,**2007**.
- [8] González-Gallego J., Sánchez-Campos S. et Tuñón M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutrición hospitalaria*, 22 (3) : 287-293, **2007**.
- [9] Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B. Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research*., 7 (3) : 1089-1099, **2008**.
- [10] Olivier Fourcade, Marie-Françoise Simon, François Leballe, Bernadette Gaigé, Frédérique Gaits, *Synthèse, médecine/sciences* ; 12 : 323-32, **1995**.
- [11] Ikram JEMEL, La phospholipase A2 sécrétée de groupe X : Maturation protéolytique et Rôles fonctionnels, Thèse de doctorat, L'Université de Nice-Sophia-Antipolis-France, **2009**.

INFLAMMATION-PHOSPHOLIPASE (PLA₂)

[12] Kramer, R. M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E. P., Tizard, R., and Pepinsky, R. B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂, *J. Biol.Chem.* 264, 5768-5775., **1989**.

[13] Seilhamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J. A., Kloss, J., and Johnson, L. K. Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritis synovial fluid, *J. Biol. Chem.* 264, 5335-5338, **1989**.

[14] Victoria Magrioti, George Kokotos, Phospholipase A₂ inhibitors for the treatment of inflammatory diseases: a patent review (2010-present), *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 23, (3) 333-344, **2013**.

FLAVONOÏDES

Ces dernières années, nous avons assisté à un regain d'intérêt des consommateurs pour, les produits naturels. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en oeuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale. Parmi ces, nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants, tels que les flavonoïdes, ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé [1].

Les flavonoïdes sont des pigments naturels répandus le règne végétal où ils interviennent comme filtre UV et comme agent de protection contre des organismes pathogènes. Ils sont apportés au niveau de l'organisme grâce à la consommation des fruits, des légumes, des céréales et de boissons.

Les flavonoïdes interviennent dans le mécanisme d'oxydo-réduction. L'oxydoréduction est le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie et pour notre organisme, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP (Une molécule qui fournit de l'énergie nécessaire aux réactions chimiques des cellules).

I- Structure et origine des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des membres d'une classe des composés naturels avec l'occurrence répandue dans le règne des végétaux. Ils font partie de la classe des polyphénols [2-4], principaux métabolites secondaires des plantes. Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, présentent le même élément structural de base (sauf exceptions : chalcones, aurones, isoflavones), à savoir quinze atomes de carbone constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3 (noyau 2-phényl-1-benzopyrane) (figure 2).

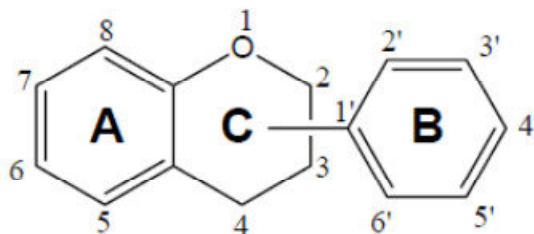


Figure 2 : Squelette de base flavonoïdes et numérotation adoptée [5]

FLAVONOÏDES

II- Localisation :

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants [6].

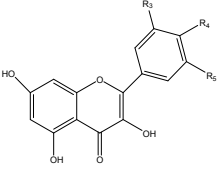
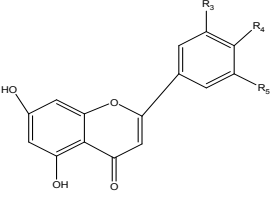
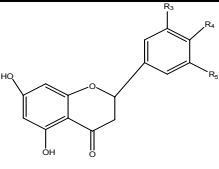
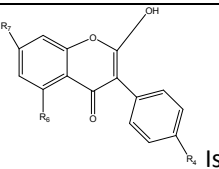
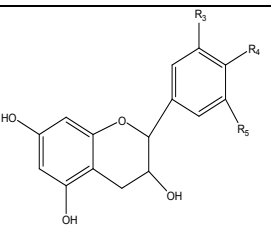
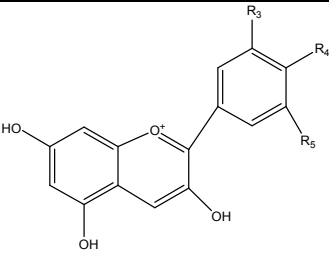
Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles, la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique[7].

III- Distribution :

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois et pollens.

FLAVONOÏDES

Tableau 1 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes [8,9].

| Flavonoïdes | exemple | Aliments | Caractéristiques |
|---|---|---|---|
|  <p>flavonols</p> | <p>Quercétine Kaempférol</p> | <p>Oignon, poireau, Brocolis, pommes, Chou frisé, Vin rouge, Thé.</p> | <p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.</p> |
|  <p>Flavones</p> | <p>Lutéoline Apigénine</p> | <p>Persil, céleri.</p> | <p>Le groupe le plus abondant des composés phénoliques.</p> |
|  <p>Flavanones</p> | <p>Naringénine Eriodictyol</p> | <p>Fruits du genre citrus.</p> | <p>Le flavanone le plus abondant est la naringénine, isolée pour la première fois à partir des écorces de citrus.</p> |
|  <p>Isoflavones</p> | <p>Genistéine Daidzéine</p> | <p>Graines de soja et produits qui en dérivent.</p> | <p>Ils sont présents dans les plantes sous forme libre ou glycosylée.</p> |
|  <p>Flavan3-ols</p> | <p>Catéchine Epicatéchine Epigallocatechine</p> | <p>Vin rouge, The noire, the Vert, cacao, Chocolat.</p> | <p>Impliqués dans la biosynthèse de proanthocyanidines par des condensations enzymatiques et chimiques.</p> |
|  <p>Anthocyanidines</p> | <p>Cyanidine Delphinidine</p> | <p>Raisins, vin Rouge, Certaines variétés de céréales.</p> | <p>Représentent le groupe le plus important des substances colorées, Ces pigments hydrosolubles contribuent à la coloration des angiospermes.</p> |

IV- Biosynthèse des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide Shikimique. Le précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamatecoenzyme A synthétisé à partir de la phénylalanine. La voie biosynthétique de ces polyphénols est présentée dans la figure 2. Les enzymes intervenant dans la voie de différenciation des classes de flavonoïdes ont été plutôt bien caractérisées.

Tous les flavonoïdes sont formés via un intermédiaire commun : la 2',4,4',6'-tétrahydroxychalcone. Ce précurseur dérive de la condensation de trois molécules d'acétylcoenzyme A, qui correspondront au cycle A, et d'une molécule de 4-hydroxycinnamatecoenzyme A, permettant la formation des cycles B et C. Ce mécanisme est catalysé par la chalcone synthase. La cyclisation de cette chalcone stéréospécifique par la chalcone isomérase forme la (S)-4', 5, 7-trihydroxyflavanone conduisant au squelette de base des flavonoïdes.

Plusieurs enzymes (synthase, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydroxylase, flavonoïde 3',5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyltransférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoïde glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation.

FLAVONOÏDES

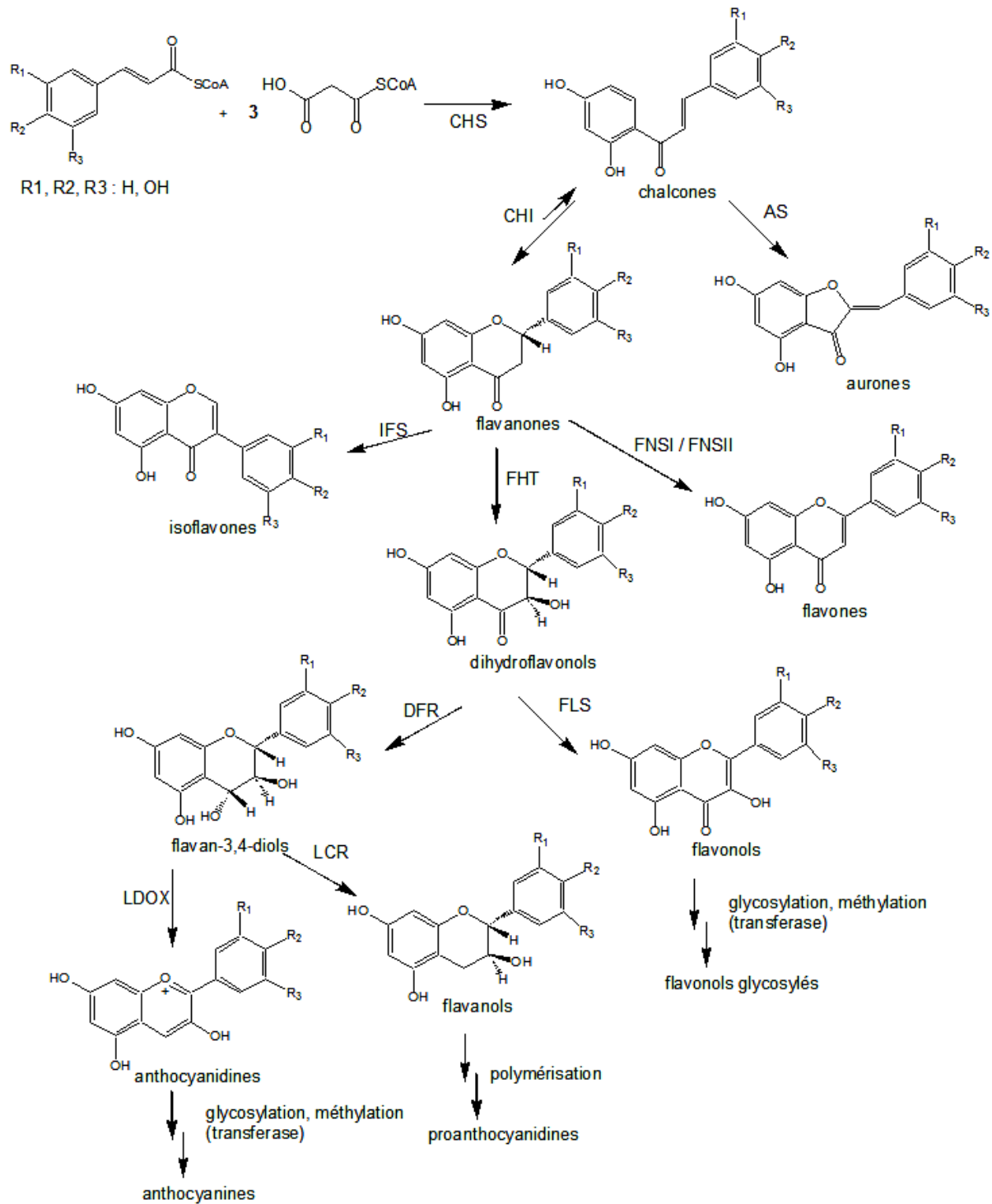
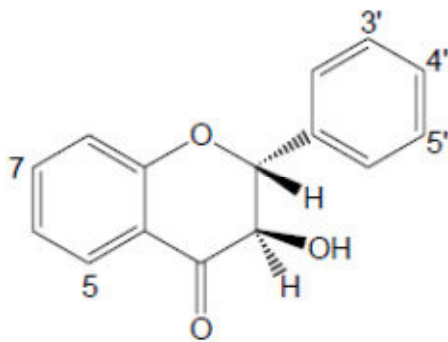
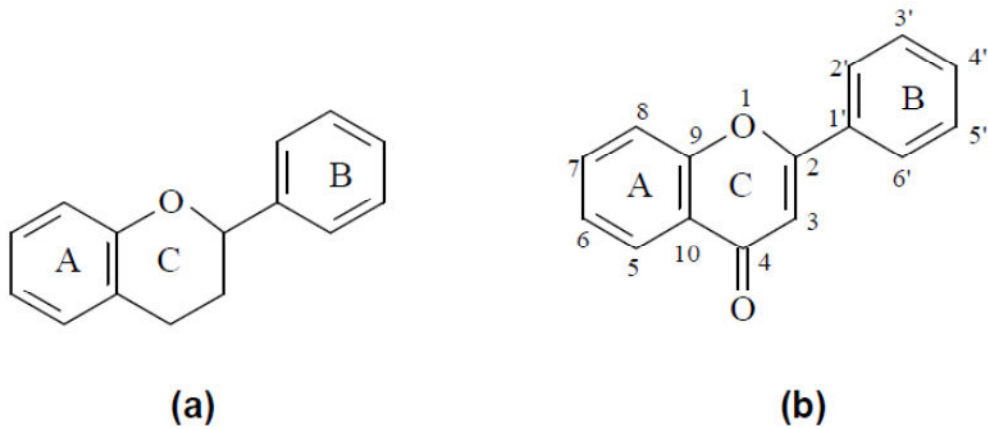


Figure 3. Voies de biosynthèse des flavonoïdes [4], [10]. AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomerase, CHS : chalcone synthase, DFR : dihydroflavonol 4-reductase, FHT : flavanone 3-hydroxylase, FLS : flavonol synthase, FNSI/FNSII : flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidin dioxygenase, LCR : leucoanthocyanidin reductase

FLAVONOÏDES

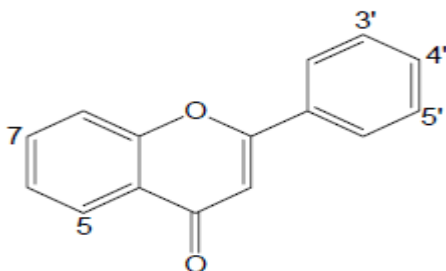
V- Les différentes classes de flavonoïdes :

Les flavonoïdes existent sous différentes classes et ceci en fonction du degré d'oxydation et d'insaturation du cycle C [11-12].



| Flavonoïde | substitution | | | | | |
|------------|--------------|---|----|----|----|----|
| | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| Taxifoline | OH | | OH | OH | OH | |
| Fusetine | | | OH | OH | OH | |

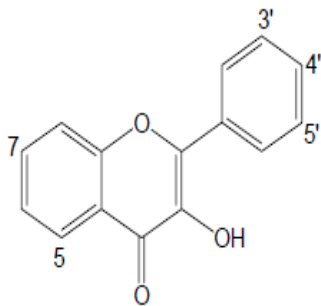
Dihydroflavonols



| Flavonoïde | substitution | | | | | |
|------------|--------------|---|----|----|----|----|
| | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| Apigénine | OH | | OH | | OH | |
| Chrysin | | | OH | | | |
| Lutéoline | OH | | OH | OH | OH | |

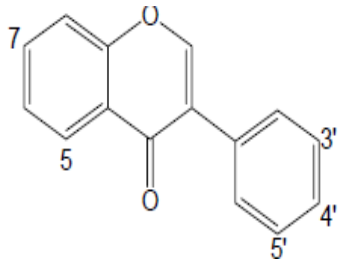
Flavone

FLAVONOÏDES



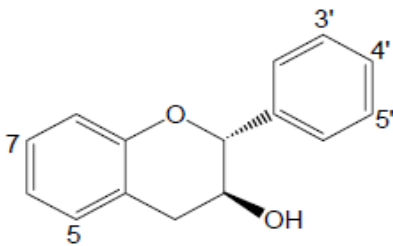
| Flavonoïde | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
|-------------|----|---|----|----|----|----|
| Kaempferole | OH | | OH | | OH | |
| Myricétine | | | | | | |
| Quercétine | OH | | OH | OH | OH | OH |
| | OH | | OH | OH | OH | |

Flavonols



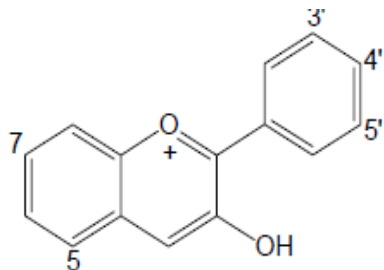
| Flavonoïde | substitution | | | | | |
|------------|--------------|---|----|----|----|----|
| | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| Daidzéine | | | OH | | OH | |
| Génistéine | OH | | OH | | OH | |

Isoflavones



| Flavonoïde | substitution | | | | | |
|-----------------|--------------|---|----|----|----|----|
| | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| catéchine | OH | | OH | OH | OH | |
| Gallocathéchine | OH | | OH | OH | OH | OH |

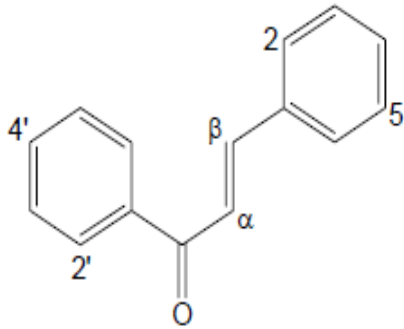
Flavanols



| Flavonoïde | substitution | | | | | |
|---------------|--------------|----|----|----|----|----|
| | 3 | 5 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| Pelargonidine | OH | OH | OH | | OH | |
| Cyanidine | OH | OH | OH | OH | OH | |
| Delphinidine | OH | OH | OH | OH | OH | OH |

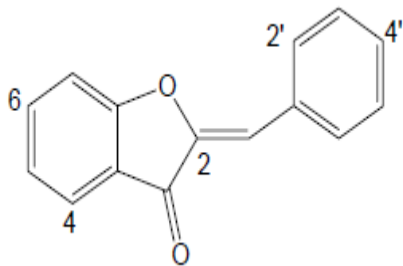
Anthocyanes

FLAVONOÏDES



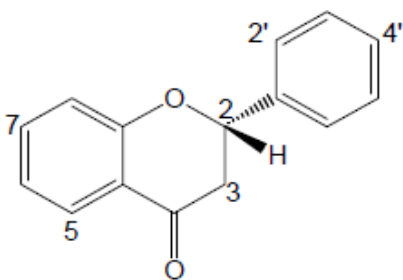
Chalcone

| Flavonoïde | 2' | 3' | 4' | 5' | 6' | 4 |
|--------------|----|----|-----|----|----|----|
| Davidéginine | OH | | OH | | | OH |
| Asebogénine | OH | | OMe | | OH | OH |



Aurones

| Flavonoïde | substitution | | | | | |
|--------------|--------------|----|-----|----|----|----|
| | 4 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| Leptosidine | | OH | OMe | OH | OH | |
| Maritimétine | | OH | OH | OH | OH | |



Flavanones

| Flavonoïde | substitution | | | | | |
|-------------|--------------|---|----|----|-----|----|
| | 5 | 6 | 7 | 3' | 4' | 5' |
| Eriodictyol | OH | | OH | OH | OH | |
| Hesperitine | OH | | OH | OH | OMe | |
| Naringénine | OH | | OH | | OH | |

Figure 4. Les différentes classes de flavonoïdes

Pour chaque classe de flavonoïde, les molécules diffèrent entre elles par le nombre et la position des groupements hydroxyle, la présence de substituant sur la génine (flavonoïde non substitué) et le degré de polymérisation. Les formes les plus rencontrées sont issues d'une

FLAVONOÏDES

hydroxylation, alkylation (méthylation ou prénylation), glycosylation et acylation soit sur la génine, soit sur un groupe hydroxyle d'un ose. Les flavonoïdes sont essentiellement hydroxylés en position 5, 7, 4' et éventuellement en position 3.

Cette grande diversité de structures fait des flavonoïdes l'une des plus grandes familles de substances naturelles. En effet, les techniques d'analyse récentes ont permis d'identifier plus de 8000 flavonoïdes [13-16].

VI- Propriétés des flavonoïdes :

Propriétés anti-inflammatoires des flavonoïdes et effets sur le système immunitaire [17] :

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires [7,8,18] et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [5]. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T [19,20]. Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes B ou T peut être variable: en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'explication est encore inconnue.

L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) [19,20]. Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes [21]. La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles ce qui va promouvoir l'inflammation.

D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose [22]. Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles [23]. Les flavonoïdes inhibent également l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'hispiduline, une méthoxyflavone, diminue par exemple l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMPc à la suite d'une inhibition des phosphodiésterases. En effet, l'accumulation d'AMPc plaquettaire semble interférer avec la mobilisation de Ca^{2+} impliqué dans l'agrégation de ces cellules

On peut citer d'autres propriétés des flavonoïdes :

- ✚ Propriétés antivirales et antibactériennes:
- ✚ Propriétés anti-cancérogènes:

FLAVONOÏDES

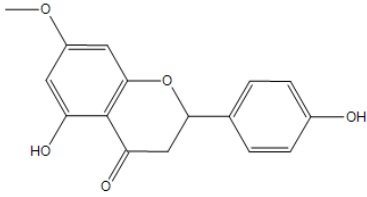
- ✚ Propriétés anti-oxydantes et impact sur la peroxydation
- ✚ Lipidique Propriétés pro-oxydantes des flavonoïdes
- ✚ Propriétés anti-ulcéreux:
- ✚ D'autres effets Biologiques :Les flavonoïdes peuvent aussi empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase[24] . Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez des animaux diabétiques.[26,27]. Certains flavonoïdes peuvent entraver l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires [28].

Pour notre étude on choisit des flavanones(figure5)qui ont été isolés d '**Inule visqueuse** (*Dittrichia viscosa* (L.) Greuter 1973, syn. *Inula viscosa*) .C est une plante vivace de la famille des Astéracées (anciennement Composées). Le nom Inule vient de l'ancien nom de l'**Aunée**, probablement par déformation du grec *hélénion*. L'Inule visqueuse est fréquente en région méditerranéenne, où elle fleurit à la fin de l'été et au début de l'automne. Elle affectionne les anciennes cultures (friches), les décombres, les bords des routes et des chemins, formant d'abondantes touffes vertes à capitules jaunes ; elle est considérée comme assez envahissante. Elle est l'un des quelques représentants du genre *Dittrichia*, auquel appartiennent aussi *Dittrichia graveolens* (l'inule fétide) et *Dittrichia crithmoides* (l'inule maritime). Dans les anciennes flores, elle apparaît sous le nom de genre d'Inula.

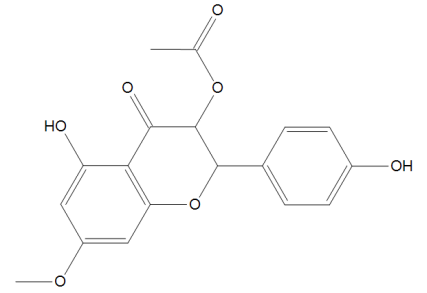
L'Inule visqueuse est une plante à racine pivotante, toute glanduleuse-visqueuse, à odeur agréable (selon certains, désagréable pour d'autres), ligneuse à sa base (forte racine pivotante lignifiée pouvant atteindre 30 cm de long).

Les trois structures des flavanones extraites de l'inule visqueuses [28], utilisées comme inhibiteurs sont représentées dans la figure 5.

FLAVONOÏDES

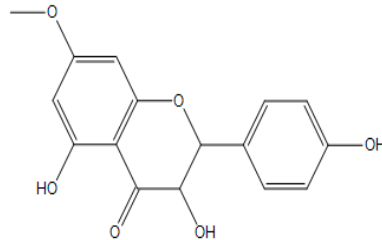


Inule Visqueuse



(3*R*)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-4-oxochroman-3-yl acetate
3-Acetyl-7-Methylaromadendrin

5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxychroman-4-one
Sakuranetin



(3*R*)-5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-4-oxochroman-3-yl acetate
7-O-Methylaromadendrin

Figure 5. Structures des flavanones

FLAVONOIDES

Références :

- [1] Imane Abdelli, Etude de la Structure de la β -Secretase et de ses Interactions avec des inhibiteurs par Modélisation Moléculaire : Cas de la Maladie d'Alzheimer, thèse, de Doctorat, Université de Tlemcen, **2012**.
- [2] Hahlbrock K., Flavonoid. In *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise: Secondary Plant Products*, E.E. Academic Press: New York, 7, **1981**.
- [3] Winkel-Shirley B., Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, 126 (2), 485-493, **2001**.
- [4] Winkel-Shirley B., Biosynthesis of flavonoids and effects stress. *Curr.. Plant Biol*, 5 (3), 218-223, **2002**.
- [5] Cook N., Samman S., Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76, **1996**.
- [6] Middleton.E.J. Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int.J. Pharmacol.* 34 (5): 344-348, **1996**.
- [7] Mookerjee.B.K, Lee.T.P, Logue.G.P, Lippes.H.A, Middleton.E. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo.Res.* 213: 511-20, **1986**.
- [8] Galati.E.M, Monforte.M.T, Kirjavainen.S, Forestieri.A.M, Trovato.A, Tripodo.M.M. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco.* 40(11): 709-12, **1994**.
- [9] Read, M. A. Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents *Vascular. Am. J.Pathol.* 147(2): 235-7, **1995**.
- [10] Forkmann G., Martens S., Metabolic engineering and applications of flavonoids, *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 155-160, **2001**.
- [11] Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A A., Capasso F., Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 65 (4), 337-353, **1999**.
- [12] Hollman P. C. H., Katan, M. B., Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability, *Food and Chemical Toxicology*, 37 (9-10), 937-942, **1999**.
- [13] Manach C., Scalbert A., Morand C., Remy C., Jiménez L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(5), 727-747, **2004**.
- [14] Markham K.R., Techniques of flavonoids identification, New York :Academic Press: London, **1982**.
- [15] Harborne J.B., Williams C.A., Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry*, 55(6), 481-504, **2000**.

FLAVONOIDES

- [16] Markham K.R., Bloor S.J.,. Analysis and identification of Flavonoids in Practice. In Flavonoids, in health and disease, Rice-Evance , C.A, Packer, L, Eds,Marcel Dekker: New York, 1- 34, **1998**.
- [17] BENGUERBA ADLEN, Etude Phytochimique et de la Phase Butanolique de L'espèce *Inula crithmoides* L. thèse de MAGISTER(En CHIMIE ORGANIQUE) Option PHYTOCHIMIE , **2008**.
- [18] Da silva.E.J.A, Oliveira.A.B, Lapa.A.J. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm.Pharmacol.* 46(2): 118-22, **1994**.
- [19] Mookerjee.B.K, Lee.T.P, Logue.G.P, Lippes.H.A, Middleton.E. The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo.Res.* 213: 511-20, **1986**.
- [20] Namgoong.S.Y, Son.K.H, Chang.H.W, Kang.S.S, Kim.H.P. Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci.* 54(5): 313-20, **1994**.
- [21] Middleton.E.J, Drzewiecki.G. Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol.* 33(21): 3333-8, **1984**.
- [22] Ward.J. Free Radicals, antioxidants and preventive geriatrics. *Austr. J.Physic.* 23(7): 1297-301, **1994**.
- [23] Limasset.B, Le doucen.C, Dore.J.CH, Ojasoo.T, Damon.M, De paulet.A. C.Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 46(7): 1257-71, **1993**.
- [24] Chaudhry.P.S, Cabrera.J, Juliani.H.R, Varma.S.D. Inhibition of humanlens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol.* 83:32, **1995**.
- [25] Ong.K.C, Khoo.H.E. Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol.* 29:121-126.196, **1997**.
- [26] Ong.K.C, Khoo.H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* 67: 1695-1705, **2000**.
- [27] Hertog.M.G, Feskens.E.J, Hollman.P.C, Katan.M.B, Kromhout.D.D. antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study.*Lancet.* 342:1007-1011, **1993**.
- [28] Victoriano Hernández, M.Carmen Recio □, Salvador Máñez, Rosa M. Giner, José-Luis Ríos, Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism, *Life Sciences* 81,480–488, **2007**.

Contrairement au domaine classique de la chimie, la chimie computationnelle et la modélisation moléculaire sont relativement nouvelles. Malgré leurs récentes, ces méthodes sont de plus en plus utilisées. On classe les méthodes actuelles de calcul en plusieurs catégories selon le niveau de théorie qu'elles utilisent ou bien selon le type de calcul qu'elles réalisent. On distingue la **mécanique quantique (MQ)** et la **mécanique moléculaire (MM)** qui sont les deux approches limites par rapport au **modélisation de Monte Carlo**, les deux utilisant une approche de mécanique moléculaire pour explorer l'espace conformationnel des molécules et analyser leur **optimisations de géométrie** des molécules, les calculs de diverses **propriétés chimiques** ou les calculs de **recherche conformationnelle**. On peut utiliser chacune de ces approches aux différents niveaux de la théorie utilisée. Ces méthodes permettent de fournir des informations qui ne sont pas fournies par l'expérience et jouent donc un rôle complémentaire à celui de la biochimie expérimentale [1].

I. -1- Mécanique moléculaire :

Les méthodes de mécanique moléculaire (MM) utilisent les lois de la physique classique pour la prédiction des structures et de leurs propriétés, comme l'énergie. Au même titre que les méthodes de MQ, les méthodes de MM utilisent une alternative à l'approximation de Born-Oppenheimer, mais les électrons ne sont pas explicités dans le calcul. Cette simplification assume que les électrons dans la molécule sont répartis dans leur distribution optimale, et seuls les positions des noyaux sont prise en considération pour la résolution du problème chimique particulier. La molécule est alors mécaniquement simplifiée à un ensemble de masses auxquelles des charges ont été attribuées. Ces masses interagissent entre eux par des forces classiques, décrites par des fonctions d'énergie potentielle. Les effets électroniques sont simplifiés, et inclus dans le champ de forces pour certains atomes spécifiques.

I -1-1- Champ de force :

Un champ de force utilise généralement un ensemble d'équations pour définir comment l'énergie potentielle du système varie en fonction de la position des atomes. Le champ définit aussi les propriétés « chimiques » pour chaque atome (en prenant en compte son environnement chimique), telles que la charge partielle, l'hybridation ou le rayon de Van der Waals. En fin, le champ de force définit les paramètres spécifiques, telles que les longueurs, les angles et les torsions de liaison, les barrières de rotation des angles définies par les constantes de force. Ces valeurs sont généralement importées à partir de données expérimentales ou de calcul *ab initio*.

Le théorème fondamental de la MM est que l'énergie potentielle totale (E_{tot}) peut être considérée comme la somme de plusieurs contributions (1) :

$$E_{tot} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{tors} + E_{VdW} + E_{elstat} + E_{cross} \quad (1)$$

$E_{stretch}$ est la fonction d'énergie pour l'étirement d'une liaison entre deux atomes, généralement définie par une fonction d'oscillateur harmonique, E_{bend} est la fonction d'ouverture d'un angle (généralement harmonique), E_{tors} représente la fonction pour la variation des torsions, i.e. les rotations autour des liaisons, E_{VdW} , E_{elstat} et E_{cross} représentent les fonctions pour les interactions de Van der Waals, électrostatiques et les termes croisés. Les interactions de Van der Waals sont décrites, par exemple, par le potentiel de Lennard-Jones [2], les interactions électrostatiques par une simple loi de Coulomb, et les interactions croisées représentent les interactions spécifiques, comme l'étirement-flexion ou torsion-tension.

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 [3]. 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 [4] de macromolécule [4], de nucléotides [5] ou encore de complexes organométallique [4]. Il est donc dans un premier temps important de vérifier si le champ choisi est adapté au système à étudier.

I-1-2- 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 [6] :

- Champs de force contenant uniquement les termes harmoniques.
- Champs de force utilisant les termes d'ordre supérieur (cubique, quadratique,...).
- Champs de force suggérés par *Allinger et col.* [7] 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. [8-10]. Il a été conçu au début pour les molécules simples (alcane, alcène, alcyne non conjugués, amines...), mais

ses versions améliorées MM3 (1989) [11] et MM4 (1996) [12] 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 [13].

- GROMOS :

GROMOS (Groningen Molecular Simulation Program Package), est écrit par Van Gunsteren [14] et 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 [15-18], 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 modifié de Urey-Bradley-Shimanouchi [19] et le champ de force.

AMBER. Il permet de trouver les structures, les énergies de conformation et les fréquences vibrationnelles au minimum énergétique d'une molécule [20].

- EMO :

Le programme Emo (Energy Of Molecule), est développé par B. Blaise [21-24], 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 décrit par Kollman [25]. 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.

I. 2- Dynamique Moléculaire :

La dynamique moléculaire (DM) est la méthode la plus fréquemment utilisée pour la simulation de systèmes réels. Le principe de base de cette méthode est l'échantillonnage de

MODELISATION MOLECULAIRE

l'espace conformationnel du système étudié par l'intégration des équations du mouvement de Newton pour tous les atomes présents dans le système. Les simulations de dynamique moléculaire consistent à calculer les positions et les vitesses d'un système d'atomes [26]. Elles sont très importantes pour la recherche du comportement structural des biomolécules en fonction du temps. En utilisant la DM, on peut étudier la flexibilité ou la rigidité des biomolécules, mesurer les interactions intermoléculaires entre la protéine et les ligands ou d'autres biomolécules, calculer l'énergie libre ou bien étudier l'effet du solvant sur la structure des biomolécules. Ainsi, au contraire de la mécanique moléculaire, la dynamique moléculaire produit des conformations qui dépendent moins de la structure initiale.

Les champs de forces utilisés sont les mêmes que ceux employés dans les méthodes de minimisation. La dynamique moléculaire introduit donc la dimension du temps dans l'étude des molécules. L'évolution temporelle ou trajectoire d'une molécule est décrite par la résolution des équations du mouvement de Newton :

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

Où :

\vec{F}_i : Vecteur force agissant sur l'atome i , m_i est la masse d'atome, \vec{a}_i est son accélération, t est le temps, \vec{r}_i sont les coordonnées Cartésiennes de l'atome (position de l'atome i).

La force F_i agissant sur l'atome i se calcule à partir de l'énergie potentielle totale (E) d'interaction de la molécule:

$$\vec{F}_i = \frac{d\vec{E}}{d\vec{r}_i}$$

L'intégration des équations de mouvement est rendue possible par l'utilisation d'algorithmes comme celui de Verlet.

Une simulation de dynamique moléculaire se réalise généralement en quatre étapes :

- 1- Une étape de minimisation de la structure initiale destinée à éliminer les contacts stériques.
- 2- Une étape dite de thermalisation au cours de laquelle les vitesses des atomes sont augmentées progressivement afin d'atteindre la température finale choisie.
- 3- Une étape d'équilibration pendant laquelle les vitesses ne sont plus modifiées. L'énergie cinétique se répartit sur toute la molécule afin d'atteindre son état d'équilibre.
- 4- Enfin, pendant la dernière étape, appelée dynamique productive, les coordonnées et les vitesses sont sauvegardées pour une analyse de la dynamique.

Deux points importants doivent être pris en compte:

La température d'une molécule ou agitation thermique correspond en réalité à l'énergie cinétique des atomes de la molécule puisque :

$$E_{cinétique} = \frac{1}{2} \sum m_i v_i^2 = \frac{3}{2} N K_b T$$

Ou :

v_i^2 : Valeur de la moyenne carrée de la vitesse.

N : Nombre d'atomes du système.

K_b : Constante de Boltzmann.

T : Température absolue.

I. 3- Docking Moléculaire :

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre deux molécules. De même, la découverte de nouvelles drogues activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "amarrage moléculaire" ou "docking", ont été développées. Il est à noter que les substrats et les inhibiteurs sont définis par le terme générique de "ligand", tandis que le terme "récepteur" est utilisé pour la cible sur laquelle le ligand va se fixer, que ce soit une enzyme ou un récepteur protéique.

Afin d'obtenir le minimum global d'énergie d'interaction entre le ligand et le récepteur, la plupart des méthodes d'amarrage moléculaire repose donc sur des minimalisations d'énergie, des recuits simulés, des calculs de Monte-Carlo, de complémentarité de surface, d'énergie libre ou encore sur des algorithmes génétiques. Parmi tous les programmes d'amarrage moléculaire qui ont déjà prouvé leur efficacité, comme GOLD [27], FlexX [28] ou bien DOCK [29], AutoDock) [30]. Nous avons choisi d'utiliser Molegro Virtuel Docker (MVD) [31,32].

R. Thomsen et al [33] ont fait une comparaison entre 4 logiciels de docking et ils ont montré que le MVD est le plus précise (MVD: 87%, Glide: 82%, Surflex: 75%, FlexX: 58%).

MODELISATION MOLECULAIRE

Molegro Virtuel Docker (MVD) permet d'imposer au système l'exploration de l'espace conformationnel en autorisant certains degrés de liberté au ligand, tout en maintenant fixe le récepteur.

En fin, 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 [34].

Toutes les méthodes de « Docking Moléculaire » 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] Imane Abdelli, Etude de la Structure de la β -Secretase et de ses Interactions avec des inhibiteurs par Modélisation Moléculaire : Cas de la Maladie d'Alzheimer, thèse, de Doctorat, Université de Tlemcen, **2012**.
- [2] C. Audouze. Vers une parallelisation par bandes en chimie quantique, Laboratoire de Mathematique, UMR CNRS 8628, Universite Paris-Sud, P8 .**2003**.
- [3] H. Dugas. Principes de base en modélisation moléculaire, Aspects théorique et pratiques, Chapitre3 introduction aux méthodes de minimisation d'énergie ,quatrième édition, Libraire de L'Université de Montréal. **1996**.
- [4] B. Donald, K. Boyd, B. Lipkowitz, Molecular Mechanics. The Method and Its Underlying Philosophy. *Chem. Educ* , P59. **1982**.
- [5] E. Schrodinger, *Ann.Phys.Leipzig*, P 76. **1926**.
- [6] S.M. Mekelleche .Cours de post-graduation; option; chimie théorique: **2000-2001**.
- [7] P. Chaquin, Manuel de chimie théorique, application à la structure et la réactivité en chimie moléculaire, P190. **2000**.
- [8] J.E. Williams, P. Von, R. Schleyer., *Physic-Chemistry*, P19, **1968**.
- [9] U. Burkert , N.L. Allinger, "Molecular Mechanics", *J.A.C.S.*, Washington, P45. **1982**.
- [10] 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**.
- [11] 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**.
- [12] D. Liotta, Advances in Molecular Modeling, *Ed. JAI Press*, P1. **1988**.
- [13] F. Jensen, Introduction to Computational Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester. **1999**.
- [14] G. Monard, Introduction à la Modélisation Moléculaire, Formation continue CNRS-Nancy. **2003**.
- [15] J.P Brown, N.L. Allinger, in: K.B. Boyd (Eds.) reviews in computational chemistry, *VCH*, New York, P2. **1991**.
- [16] J.R. Maple, in: P.v.R. Schleyer (Ed.), "Encyclopedia of Computational Chemistry", Wiley, Chichester, 1015. **1998**.
- [17] J. Goodman, "Chemical Applications of Molecular Modelling ", Royal society of Chemistry, Cambridge, P78, **1998**.
- [18] U. Brkert, N.L. Allinger, "Molecular Mechanics", ACS Monograph, *ACS, Washington, D. C*, P177. **1982**.

- [19] P. Comba, T.W. Hambley, "Molecular Modeling of Inorganic Compounds", VCH, New York, **1995**.
- [20] K.B. Lipkowitz, Abuses of molecular mechanics: Pitfalls to avoid. *J. Chem.*, 1070-1075. **1995**.
- [21] S. Diego, Discover, user guide, ed. Biosym/MSI. **1995**.
- [22] 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**.
- [23] U. Dinur, A. Hagler, Reviews in computational Chemistry, (K. B. Lipkowitz, D.B. Boyd, Eds). VCH, Weinheim. 99. **1991**.
- [24] N.L. Allinger, K. Chen, J.A. Katzenellenbogen, S.R. Willson, G.M. Anstead, *J. Comp. Chem.*, 747. **1996**.
- [25] N.L. Allinger, *Adv. Phys. Org. Chem*, 1. **1976**.
- [26] J.A. McCammon, S.C. Harvey; "Dynamics of Proteins and Nucleic Acids" Cambridge, **1987**.
- [27] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen; "Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation", *J Mol Biol.*, 245, 43-53, **1995**.
- [28] M. Rarey, S. Wefing, T. Lengauer; "Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins", *J Comput Aided Mol Des.*, 10(1), 41-54, **1996**.
- [29] I.D. Kuntz, J.M. Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin; "A geometric approach to macromolecule-ligand interactions", *J Mol Biol*, 161(269-288), **1982**.
- [30] D.S. Goodsell, A.J. Olson; "Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing", *Proteins.*, 8, 195-202, **1990**.
- [31] Molegro Virtual Docker v. 5.1. Molegro ApS. Aarhus, Denmark. (Version d'essai), **2012**.
- [32] <http://www.molegro.com>.
- [33] R. Thomsen, M. Christensen; "MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking". *J Med Chem*, 49, 3315-3321. [[PubMed](#)], **2006**.
- [34] D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson; "Efficient unbound docking of rigid molecules", **2002**.

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 [1].

I. Préparation de l'enzyme :

Le téléchargement de la phospholipase (PAL2) a été fait à partir de la base de données **Bookhaven Protein Data Bank (code d'accès 1KVO)**.

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 (1KVO seule, inhibiteurs).
 - a- Le positionnement des inhibiteurs dans le site actif de la 1KVO, c'est-à-dire le docking moléculaire.
 - b- Une fois que le complexe (1KVO -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 1KVO et les inhibiteurs.

I. 1- 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 part 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 α 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 α et le feuillet β , les logiciels de visualisation et de manipulation des molécules sont actuellement disponibles avec des fonctionnalités conviviales (par exemple : Molegro5.5 [2] et Hyperchem 7.5 version Professionnelle [3]).

La structure tridimensionnelle de la phospholipase 1KVO a été obtenue par diffraction ;2en rayon X avec une résolution de (2.00 Å) [4]. On remarque que la phospholipase 1KVO se cristallise sous la forme d'un monomère (figure 6), avec 744 résidus et 5722 atomes.

Avec l'effet réducteur de la modélisation moléculaire, nous avons simplifié le modèle de l'enzyme en éliminant les molécules d'eau, ceci nous a permis d'obtenir le modèle suivant: (figure 7).Ce modèle comporte les acides aminés formant le site actif (figure 8).

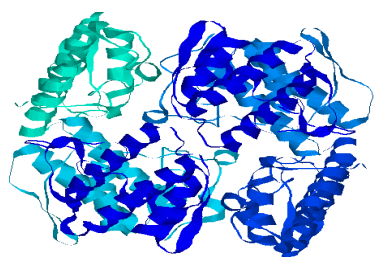


figure 6 :1kvo non simplifiée
(744 résidus, 5722 atomes)

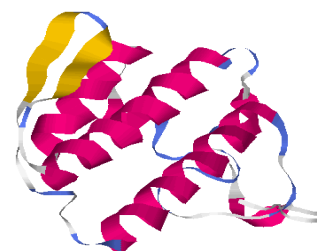


figure 7 :1kvo simplifiée
(124 résidus, 1899 atomes)

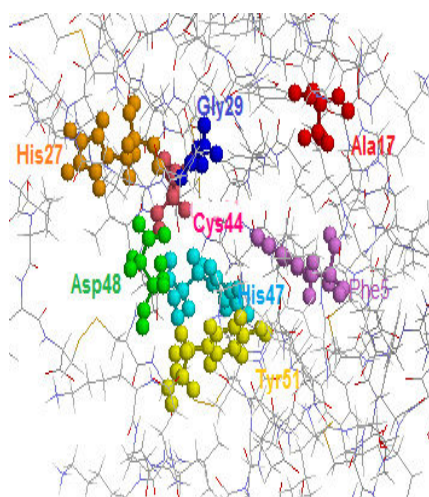


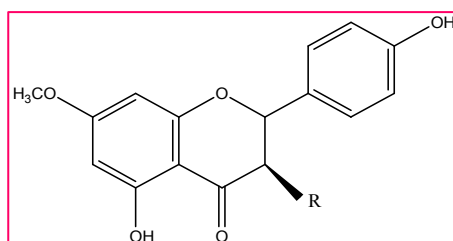
Figure 8 : Acides aminés du site actif

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.

Les inhibiteurs utilisés dans notre travail sont les flavanones qui ont été isolés de l'inule *visqueuse* [5].



(1) R= H Sakuranetin

(2) R= OH 7-O-Methylaromadendrin

(3) R= OCOCH₃ 3-Acetyl-7-Methylaromaden

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. [2]. 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 phospholipase A2 seule, les ligands et les complexes.

III-1 *Optimisation de la phospholipase 1KVO :*

L'optimisation de la géométrie de la phospholipase **1KVO** a été effectuée à l'aide du **champ de forces Amber99 [6] 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 : $E_{opt} = -660.6749 \text{ Kcal/mol}$

III-2 **Optimisation des substrats:**

La construction et l'optimisation des ligands ont été effectuées à l'aide de deux logiciels :

- le logiciel Hyperchem7.5 version professionnelle du champ de forces Amber99 [6].
- Gaussian défini l'interface graphique. On peut graphiquement interpréter[7] :

Résultats et discussions

- ✚ structures moléculaires optimisées.
- ✚ orbitales moléculaire.
- ✚ La densité électronique.
- ✚ Les surfaces peuvent aussi être vues comme des contours.
- ✚ Charges atomiques et moments de dipôle.
- ✚ Animation des modes normaux correspondant à fréquences vibrationnelles
- ✚ IR, Raman, RMN, VCD et d'autres spectres.
- ✚ Informations stéréo chimiques moléculaires.

L'optimisation moléculaire des molécules : Nos inhibiteurs ont été optimisé par la méthode DFT, et en utilisant 6-31G*comme base.

-Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 2 suivant :

| <i>Inhibiteurs</i> | <i>Flavanone-1</i> | <i>Flavanone-2</i> | <i>Flavanone-3</i> |
|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| E _{opt} (Kcal/mol) (Hyperchem7.5) | 13.005 | 14.243 | 17.788 |
| E _{opt} (u.a) (Gaussian) | -994.277 | -1069.109 | -1221.721 |

On a utilisé le programme ORIGIN 6.0 [8] pour dessiner les cartes d'énergie.

Origin est un logiciel de traitement et d'analyse de données scientifiques pour environnement Microsoft Windows développé par OriginLab. Il permet notamment de tracer des graphes 2D et 3D et possède des fonctions d'analyse de pics. Il est aussi capable d'importer des fichiers de divers formats tels que Excel, ASCII, Mathematica ou SigmaPlot, et d'exporter les graphes sous format JPEG, GIF, Tiff etc.

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

Résultats et discussions

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.

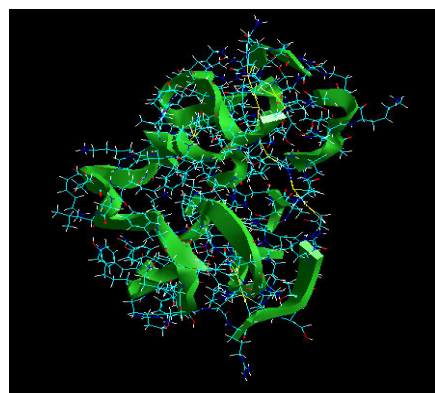
En générale, l'algorithme de la plus grande pente ou «steepest descent» est utilisé au début, pendant 100 à 200 pas. Après l'algorithme de gradient conjugué ou «Conjugate Gradient» peut être utilisé pour compléter la minimisation jusqu'à la convergence. La convergence dans l'algorithme de «Steepest Descent» 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 phospholipase 1KVO seule, les ligands seuls.

IV-1 Dynamique moléculaire de la phospholipase 1KVO :

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 [9].



phospholipase 1KVO

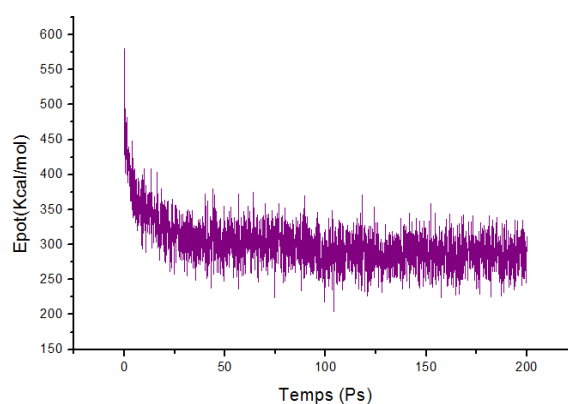
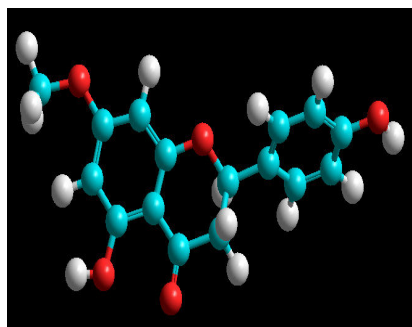


Figure 9 : variation de l'énergie potentielle de la 1KVO seule en fonction du temps

IV-2 Dynamique moléculaire des inhibiteurs :

a/flavanone-1



flavanone-1

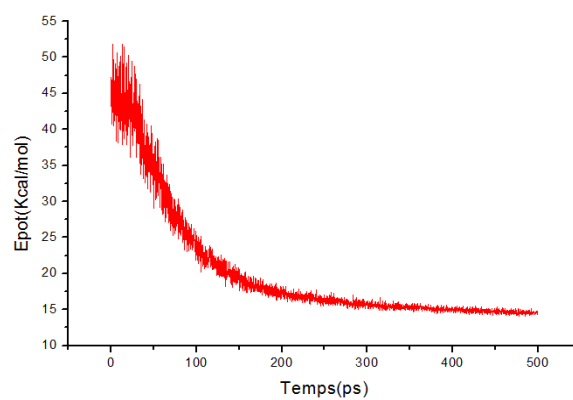
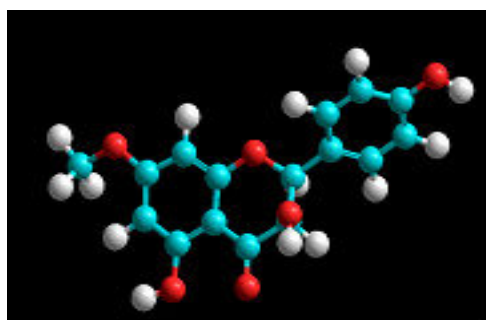


Figure10 : variation de l'énergie potentielle flavanone-1 en fonction du temps

b/flavanone-2



flavanone-2

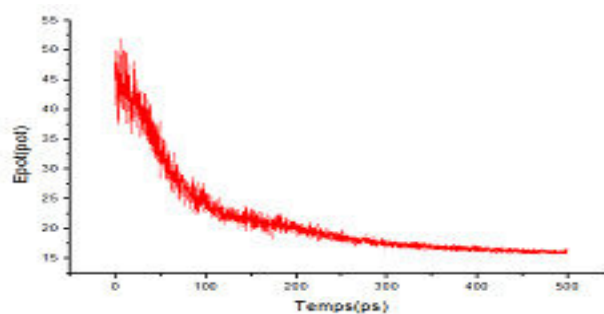
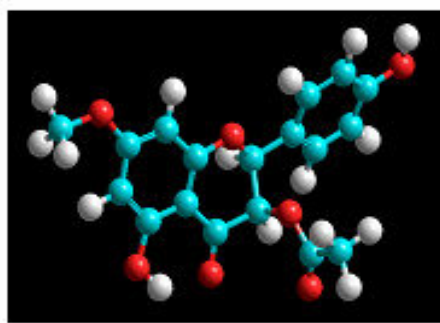


Figure11 : variation de l'énergie potentielle flavanone-2 en fonction du temps

c/flavanone-3



flavanone-3

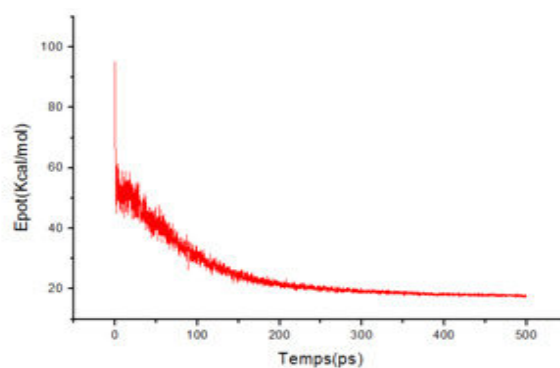


Figure12 : variation de l'énergie potentielle flavanone-3 en fonction du temps

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 **phospholipase 1KVO**. Pour ce faire, nous avons utilisé le module Docking Moléculaire à l'aide de logiciel molegro [2].

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.

MVD effectue souple accueil de ligand, de sorte que la géométrie optimale du ligand sera déterminée lors de l'amarrage. Molegro dockers virtuelles explorer toute la gamme de ligand flexibilité conformationnelle avec flexibilité partielle de la protéine. Procédure d'accueil est composée de trois éléments interdépendants :

- a) L'identification de site de liaison.
- b) un algorithme de recherche d'échantillonner efficacement l'espace de recherche (l'ensemble des positions possibles et les conformations de ligand sur la surface de la protéine) et
- c) Une fonction de score ou de l'énergie calcul software [10].

L'analyse de l'énergie d'interaction protéine-ligand (énergie de liaison hydrogène) a été calculée afin d'obtenir une meilleure compréhension des différences entre le mode de liaison de chaque composé et les facteurs moléculaires responsables de l'activité les meilleurs poses amarrés à la région du site actif de la protéine sont présentées dans (tableau 1) et on 'a observe que le flavanone-3 présent une meilleure complémentarité avec la phospholipase (PAL2) (en termes d'énergie négative), comme indiqué dans le Tableau 3.

Résultats et discussions

Tableau3 : le score de docking moléculaire pour les trois flavanones :

| Inhibiteurs | Mol dock score (Kj/mol) | H-Bond | Interaction des résidues d'acides aminés de la phospholipase A2 |
|--------------|-------------------------|--------|---|
| flavanone-1 | -91.247 | 0 | Tyr51,Gly29,His27,Asp48,His47, Phe5,Ala17 |
| flavanone -2 | -95.483 | -4.634 | Tyr51,Gly29,His27,Asp48,His47 , Phe5,Ala17 |
| flavanone -3 | -99.798 | -2.5 | Tyr51,Gly29,His27,Asp48,His47 , Phe5,Ala17,Cys44 |

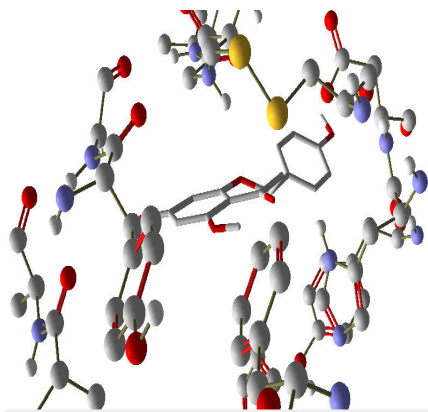
Nous avons mesuré les distances entre les groupements R des flavanones, et ceux des chaînes latérales des acides aminés constituant le site actif et éventuellement d'autres groupements de la chaîne principale de l'enzyme responsables d'interaction (pouvant engendrer une conformation favorable à une complémentarité importante d'où une activité conséquente). Les distances mesurées varient entre 2.478 Å⁰ et 3.100 Å⁰ pour l'ensemble des complexes étudiés.

Les interactions comprises entre 2.5Å⁰ et 3.5Å⁰ sont considérées comme fortes et celles comprises entre 3.1Å⁰ et 3.55Å⁰ sont supposées moyennes. Les interactions supérieures à 3.55Å⁰ sont faibles ou absentes [11].

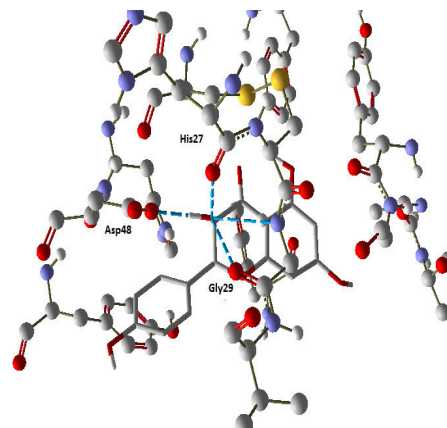
Tableau 4: Distances entre les acides aminés du site actif et groupe des flavanones

| Distances(Å ⁰) | Tyr51 | Gly29 | His27 | Phe5 | Asp48 | His47 | Ala17 |
|----------------------------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| flavanone-1 | - | - | - | - | - | - | - |
| flavanone-2 | - | 3.099 | 3.100 | - | 2.614 | - | - |
| flavanone-3 | - | 2.478 | 2.822 | - | - | - | - |

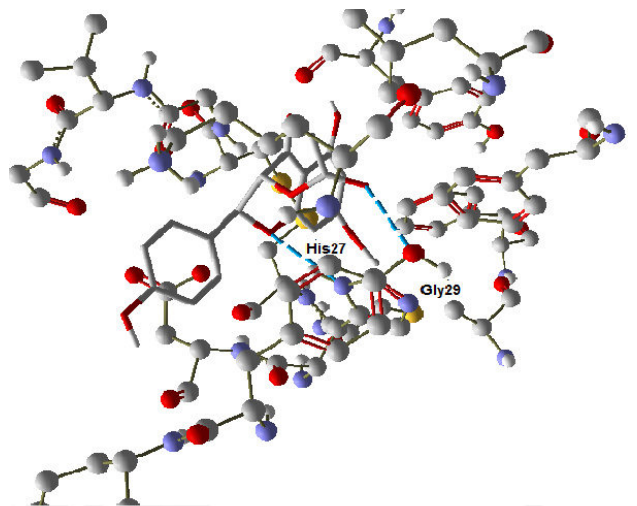
Résultats et discussions



Complexe 1KVO flavanone-1



Complexe 1KVO flavanone-2



Complexe 1KVO flavanone-3

Figure 13. site actif de chaque complexe formé

Les interactions entre les flavanone-2 , flavanone-3 et Gly29, His27 sont représentés dans la région possible pour être un accepteur de liaison hydrogène. Nous avons confirmé que dans les deux modèles d'amarrage Gly29, His27 forme ces types de liaisons hydrogène. Ces interactions amenés à déplacer les inhibiteurs dans les modèles d'accueil de la phospholipase (PAL2). Par conséquent, on peut supposer que ces environnements chargés peuvent jouer un rôle important pour aider les ligands à fixer et à surmonter l'exposition du site de liaison de la phospholipase (PAL2).

Résultats et discussions

VI . 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 de la phospholipase (PAL2)-flavanones 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 flavanones étudiés et la phospholipase (PAL2) sont évaluées à l'aide de la relation suivante :

$$E_{interactions} = (E_{potentielle\ totale\ complexe\ phospholipase\ (PAL2)\text{-}\ flavanones}) - (E_{potentielle\ totale\ phospholipase\ (PAL2)\ seule} + E_{potentielle\ totale\ flavanones})$$

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.

Tableau5 : Bilan des énergies en (Kcal/mol) :

| | $E_{totale\ du\ complexe}$ <i>E-S</i> | $E_{totale\ du\ substrat}$ <i>S</i> | $E_{vdw\ du\ substrat}$ <i>S</i> | $E_{intéra\ de}$ <i>Totale</i> |
|--------------------|--|--|-------------------------------------|-----------------------------------|
| flavanone-1 | -91.20466 | 13.005889 | 16.1349 | 556.421 |
| flavanone-2 | -95.4832 | 14.243325 | 15.7655 | 550.948 |
| flavanone-3 | -99.7988 | 17.788204 | 18.5445 | 543.087 |

Energie stérique de la phospholipase (PAL2) seule= -660.6749 Kcal/mol

En se basant sur l'énergie d'interaction totale, on remarque que le flavanone-3(543.087 Kcal/mol) est plus actif que le flavanone-2 (550.948 Kcal/mol) et le flavanone-1(556.421Kcal/mol) .

D'après ces résultats on peut conclure que la complémentarité est relativement importante pour l'inhibiteur 3 que les autres inhibiteurs.

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 11A° de profondeur, une ouverture de 15.12A° et 9.14A°, cette poche se rétrécit atteignant une largeur de 10.80 A° [12].

Résultats et discussions

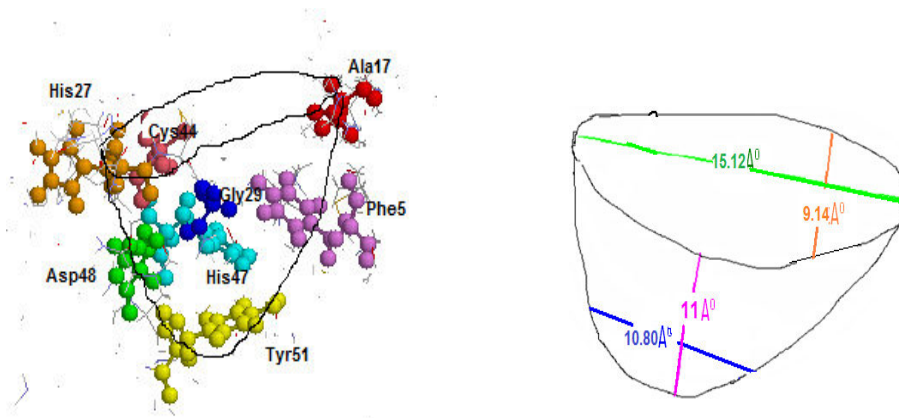
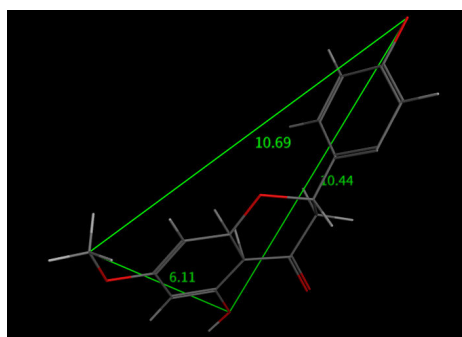
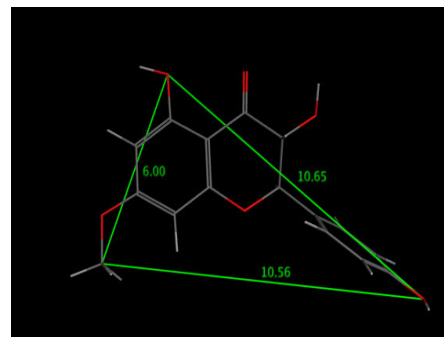


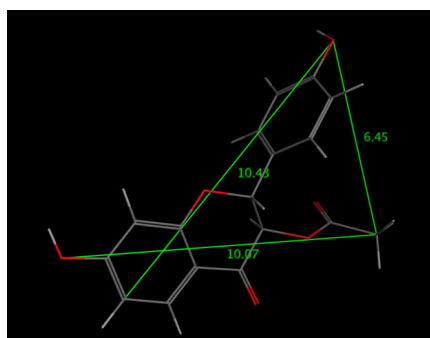
Figure14. Dimensions de la cavité enzymatique



Flavanone-1



Flavanone-2



Flavanone-3

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

En perspective, d'autres outils de modélisation plus performants seront utilisés. Nous envisageons 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] AYACHI HICHAM, Analyse de l'interaction Ribonucléase-Kanamycine par modélisation moléculaire, mémoire de MAGISTER, université de Tlemcen, **2011**.
- [2] <http://www.molegro.com>.
- [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 α -Helical arrays from an Idealized TPR Motif. *Elsevier science Ltd*. Vol.11, 497-508, **2003**.
- [5] Victoriano Hernández, M.Carmen Recio □, Salvador Máñez, Rosa M. Giner, José-Luis Ríos, Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism, *Life Sciences* 81,480–488,**2007**.
- [6] 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**.
- [7] Computational Chemistry, David Young, Wiley Interscience, .Appendix A. A.2.4 pg 336, Gaussian; **2001**.
- [8] 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**.
- [9] Drug Discovery & Development magazine: Vol. 11, No. 2, February, pp. 30-32, **2008**.
- [10] Thomsen R, Christensen MH: MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *J Med Chem*. 49(11):3315–3321, **2006**.
- [11] W. Soufi, M. Merad, F. Boukli, S. Ghalem. The Complementarity Effect for Cdc25 Phosphatase Inhibitors. *Advances in Molecular Imaging*, 17-23. **2011**.
- [12] H.Ayachi, M.Merad, S.Ghalem. Study of interaction between ribonuclease-antibiotic by molecular modeling. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1-5. **2012**.

CONCLUSION

Dans ce mémoire, une étude des interactions moléculaires entre la phospholipase PLA2 et les inhibiteurs isolés de l'inule visqueuse a été réalisée grâce à des outils de modélisation moléculaire

Cette étude comprend quatre chapitres :

Dans le premier chapitre nous avons donné une brève définition sur l'inflammation, et les anti-inflammatoires, ainsi un bref aperçu sur les phospholipase

Au niveau de chapitre II, des généralités sur les flavonoïdes sont apportées en insistant sur les différentes classes de flavonoïdes et un aperçu sur leurs biodisponibilités et leurs implications biologiques.

Dans le troisième 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, 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.

Le chapitre quatre, 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 chaîne 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 stable correspondant 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 implanté dans le logiciel Hyper Chem 75.

A la lumière des résultats obtenus, il ressort que l'introduction 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 des flavanones, et ceux des chaînes latérales des acides aminés constituant le site actif, les énergies totales les énergies de Van der Waals des inhibiteurs. On a trouvé que pour la flavanoone3 est le plus stable car elle représente l'énergie la plus basse.

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

CONCLUSION

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. 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

Par ailleurs, il est envisagé dans le cadre d'un autre travail 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 à été négligé dans notre approche.

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 à une étude d'interaction moléculaire entre la phospholipase PLA2 et les flavanones, Les différents outils de la modélisation moléculaire sont utilisés pour mener à bien ce travail (mécanique moléculaire, dynamique moléculaire et docking moléculaire) où 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, flavanones, PLA2, modélisation moléculaire, MM, DM, Docking 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 a study of molecular interaction between phospholipase PLA2 and the flavanons, the various molecular numerical models are used to conclude this work (mechanical molecular, dynamic molecular and docking molecular) , the docking makes it possible to envisage how a small molecule (drug) can bind to a receptor (protein) of which the structure 3D is known.

Key words: interaction ES, flavanones, PLA2, molecular modeling, MM, DM, Docking molecular.

ملخص:

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

في هذا العمل نهتم بدراسة التفاعل الجزيئي فوسفوليبار لبعض فلفانون باستعمال وسائل النمذجة الجزيئية (الميكانيكا الجزيئية، و الديناميكا الجزيئية والالتحام الجزيئي)

كلمات المفاتيح: التفاعل الجزيئي, فلفانون, فوسفوليبار, النمذجة الجزيئية, الالتحام الجزيئي