REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCEN

MEMOIRE

Présenté à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN CHIMIE

Spécialité : Chimie Théorique Computationnelle Par :

M^lle Benaissa Soumia

Sur le thème

Etude de l'inhibition de l'enzyme 5-lipoxygènase par glucosinolates de brassicaceae par modélisation moléculaire: cas de l'inflammation

---

Soutenu publiquement le à Tlemcen devant le jury composé de :

Mr Sidi Mohamed MEKELLECHE	Professeur	Université de Tlemcen	Président
MmeWafaa BENCHOUK	Maître de Conférences A	Université de Tlemcen	Examinateur
MmeBellifaKhadidja	Maître de ConférencesB	Université de Tlemcen	Examinateur
MmeKhebichatNaouel	Maître de ConférencesB	ESSA-Tlemcen	Encadreur

Laboratoire de Thermodynamique Appliquée et Modélisation Moléculaire (LATA2M), N° 53 BP 119, 13000 Tlemcen – Algérie

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents Abderahme et Halima

Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A mes sœurs (Fatima, Nacira, Yamina et Zahra) et mes frères (Ahmed, Boumediene et Mohamed).

A toute ma famille.

A ma belle-famille et mon fiancé Sid Ahmed.

A mes collègues de promotion de master CTC chaque un a son nom.

A tous mes enseignants depuis le primaire.

A toutes les personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé.

A mes chères amies Rabha, Meriem, Sarah, Asma.....

Benaissa Soumia...

Remerciements

***E**n tout premier lieu, je remercie **ALLAH** le tout puissant, de m'avoir donné la capacité et le courage pour arriver à ce stade, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.*

***C**e mémoire a été effectué au laboratoire de recherche « Thermodynamique Appliquée et Modélisation Moléculaire **LATA2M** » de département de chimie, faculté des sciences à l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen.*

***C**e travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mme **Khebichat Naouel** maitre de conférences classe B, à l'école supérieure en sciences appliqués de Tlemcen. J'aimerais la remercier pour l'autonomie qu'elle m'a accordée, sa gentillesse, sa patience et ses conseils qui m'ont permis de réalisé ce travail*

***J**e suis honoré et il m'est bienfaisante d'adresser mes remerciements les plus vifs à notre responsable de la spécialité de master **CTC** Monsieur **Sidi Mohamed MEKELLECHE**, Professeur à l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen qui j'ai tiré un infini revenu de son savoir, par ses conseils éclairés et sa vision objective et rationnelle de la problématique ainsi que sa disponibilité caritative* et qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens à adresser mes vifs remerciements et l'expression de mon profond respect à ***Mme Wafaa BENCHOUK***, Maitre de Conférences classe A à l'Université A. Belkaïd de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle nous a fait

en acceptant d'examiner notre travail. *Que* ***Mme Bellifa Khadidja*** *maître de conférences classe B à l'Université Abou-Bekr.* Pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner notre travail

E*ncore un grand merci à Monsieur* ***Allali Hocine*** *et* ***Mme Chemouri Hafida*** *qui m'ont donné de précieuses conseils pour réaliser ce travail.*

É*galement je voudrais associer à ces remerciements toutes les personnes qui m'ont aidé dans les différentes étapes de cette étude.*

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE

Référence :.....2

CHAPITRE I: LES METHODES DE LA MODELISATION MOLECULAIRE

I. Méthodes quantiques :.....3

II. Mécanique moléculaire :.....5

1. Energie potentiel en mécanique moléculaire (champ de force) :.....5

1.1-Energie d'interaction entre atomes liés :.....6

2 - Energie d'interaction des atomes non-liés :.....8

III. Dynamique moléculaire :.....9

1. principe :.....9

2. Un calcul de dynamique moléculaire :.....10

IV. Le docking moléculaire :.....13

1. Application de docking :.....13

3. Les outils de docking moléculaire :.....16

4. Les étapes du docking :.....16

5. Algorithmes de docking :.....17

6. les fonctions de score :.....18

Référence :.....20

CHAPITRE II: LA 5-LIPOXYGENASE, LINFLAMMATION, ZILEUTON ET LES GLUCOSINOLATES

I. La 5-lipoxygénase :.....25

1. Le gène de la 5-LOX :.....26

2. La nomenclature internationale de l'enzyme 5-LOX :.....27

3. La structure générale de la 5-LOX :.....27

4. Le site actif :.....28

II. L'inflammation :.....29

1.1. Inflammation aiguë.....30

1.2. Inflammation chroniqu :.....30

1.3. Médiateurs de l'inflammation :.....31

1.4. Biosynthèse des eicosanoïdes :.....31

2.L'asthme :.....32

III. Zileuton :.....36

1. Définition :.....37

2. Effet indésirables :.....38

IV. Glucosinolates :.....38

1- Introduction.....39

2. Structure des glucosinolates :.....44

3. Biosynthèse :.....45

4. Classification des glucosinolates :.....47

References:.....49

CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION

I. Introduction.....55

1-Protocol de calcul :.....55

2. Les programmes utilisés.....56

4. Traitement des inhibiteurs :.....60

II. Doking moléculaire.....61

1. Résultats.....61

III. Dynamique Moléculaire :.....63

IV. Analyse des résultats :.....64

Reference:.....66

1. Conclusion :.....67

2- Perspectives :.....67

Résumé:.....67

LISTE DES ABREVIATIONS

5-HPETE : acide de 5 (S) -hydroperoxy-6-trans-cis-8, 11,14-eicosatétraénoïque

5-LOX : 5-lipoxygénase

AA : Acidearachidonique

ATP : adénosine tri phosphate

COX : Cyclooxygénase

FLAP : Five lipoxygenase activatig protein

LT : Leucotriènes

LTA : Leucotriène A

LTB : Leucotriène B

LTC : Leucotriène C

LTE : Leucotriène E

PDB : Protein Data Bank

RMN : résonance magnétique nucléaire

RMSD : Ecart quadratique moyen déviation

B3LYP: Becke 3-Parameter Lee-Yang-Parr

DFT : Density Functional Theory

INTRODUCTION GENERALE

Le processus de découverte d'un nouveau médicament est un processus basé sur une méthode quasiment expérimentale, long et couteux (entre 12 et 15 ans et près d'un milliard de dollars). A l'aide de l'outil informatique, des méthodes de modélisation moléculaire in silico, telle que le docking moléculaire, ont pris une place capitale dans le processus du Drug design. En effet, cette approche consiste à rechercher le mode d'interaction le plus favorable entre le ligand et son récepteur, le plus facile à mettre en œuvre, plus rapide et avec un coût très inferieur que les méthodes expérimentales classiques **[1].**

Notre travail de master a pour objectif essentiel d'étudier l'inhibition de l'enzyme 5-lipoxygénase par glucosinolates de Brassicaceae par modélisation moléculaire : cas de l'inflammation

L'enzyme arachidonate 5-lipoxygénase (5-lipoxygénase ou 5-**LOX**) est l'enzyme responsable de la production de leucotriènes inflammatoires. La surproduction de leucotriènes est une cause majeure de l'inflammation dans l'asthme, la rhinite allergique et l'arthrose.

Parmi les inhibiteurs connus de la 5-LO, seul le médicament antiasthmatique Zileuton est approuvé pour une utilisation chez l'homme sous forme de mélange racémique. Cependant, l'hépato toxicité indésirable ainsi que son profil pharmacocinétique nécessitant une administration fréquente limite son utilité dans les traitements.

Par conséquent, la recherche de nouveaux inhibiteurs naturels de la 5-**LOX** a une importance majeure pour remplacer ce médicament. Ces inhibiteurs sont les glucosinolates de Brassicaceae qui ont montré expérimentalement une inhibition des lipoxygénase.

Le but de notre travail est d'étudier théoriquement l'inhibition de la 5-LOX par une série de glucosinolates en utilisant des méthodes de calcul : **DFT** (**Density Functional Theory**) (pour préparer les différents inhibiteurs), et de docking moléculaire, et ensuite choisir le meilleur inhibiteur de cet enzyme.

Pour le présent travail, dans le premier chapitre nous présenterons les méthodes de modélisation moléculaire. Le deuxième chapitre sera consacré à l'étude bibliographique de l'enzyme 5-**LOX**, et son implication dans l'inflammation (l'asthme). Le troisième chapitre concerne une présentation des glucosinolates. Dans le quatrième chapitre, nous retrouveront la partie matérielle et méthodes. En fin, le cinquième chapitre présente l'essentiel de nos résultats et une discussion

Référence :

[1] C. Hazan « Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase beta par criblage virtuel et RMN ». Thèse de doctorat d'université : Biologie structurale. Toulouse : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. (2008).

chapitre I
Les methodes de la modelisation moleculaire

Chimie informatique appelé aussi chimie théorique ou modélisation moléculaire, est une branche de la chimie et/ou de la physico-chimie utilisant des programmes informatiques spécifiques étudier les structures et les propriétés d'objets chimiques tels que les molécules, les solides…etc.

Par conséquent, à mesure que les outils informatiques évoluent, il devient possible de développer des techniques de calcul de plus en plus complexes, permettant ainsi d'étudier des systèmes de plus en plus complexes **[1,2]**.

Le but principal de la modélisation moléculaire est de convertir des données structurales pour visualiser info graphiquement, et dessiner des molécules, connaitre les mouvements dynamiques des molécules et des énergies et la prédiction qualitative des propriétés des molécules **[3]**.

Pour le moment, les études théoriques s'orientent vers une conception rationnelle, donc la connaissance des relations entre les propriétés physico-chimiques et la structure moléculaire des molécules connues permettant aux scientifiques de développer de nouvelles molécules, avec une assez bonne attente **[4]**.

Les méthodes de la modélisation moléculaire peuvent être classées en trois catégories **[5].**

- **La mécanique quantique**
- **La mécanique moléculaire**
- **La dynamique moléculaire**
- **Les méthodes QSAR/QSPR**
- **Le docking moléculaire**
- **Monté Carlo**

I. Méthodes quantiques :

La résolution de l'équation de Schrödinger est le fond des méthodes de la mécanique quantique (MQ) pour décrire un système(les interactions au niveau atomique) en tenant compte des électrons et des noyaux de chaque atome de ce système **[6]** :

$$H\Psi = E\Psi \qquad \textbf{(1)}$$

Ψ : fonction d'onde du système,

H :'operateur Hamiltonien (contenant des opérateurs associés à des énergies cinétique et potentielle du système) s'appliquant à Ψ,

E : énergie du système.

Un système constitué de n électrons en interaction avec N noyaux est décrit par la fonction d'onde poly-électronique Ψ=Ψ (r1, r2,……r_n) d'énergie E, l'hamiltonien total **($\hat{H}$)** du système est défini en unités atomique **[7]**.

$$\hat{H} = -\sum_{K=1}^{2n} \frac{\hbar^2}{2 \cdot me} \cdot \nabla_K^2 - \sum_{K=1}^{2n} \sum_{A=1}^{N} \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0} \cdot \frac{Z_A}{r_{KA}} + \sum_{K=1}^{2n} \sum_{l>K}^{2n} \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0 \cdot r_{Kl}} - \sum_{i=0}^{N} \frac{\hbar^2}{2 \cdot M_A} \nabla_A^2 + \sum_{A=1}^{N} \sum_{B>A}^{N} \frac{e^2}{4\pi\varepsilon_0} \cdot \frac{Z_A}{R_{AB}} \cdot Z_B \quad \textbf{(2)}$$

1. Méthodes ab-initio (Hartree-Fock –Roothaan):

Les méthodes ab-initio sont des méthodes purement théoriques, toutes les intégrales sont calculées d'une manière exacte et la seule approximation faite est l'approximation de Borhn Oppenheimer et l'approximation OM-CLOA. Ces méthodes ab-initio ou les méthodes Hartree- Fock- Roothaan traitent toutes les particules (noyaux et électrons) de manière explicite (aucun paramètre empirique n'est utilisé dans le calcul de l'énergie) **[8].**

2. Méthodes semi-empirique :

Lors d'un calcul ab initio la quasi-totalité de temps machine est consommé par les calculs des intégrales, et dans le but de réduire ce temps, il est nécessaire de simplifier les équations de Roothaan. Pour ce faire des paramètres ajustés expérimentalement remplacent une partie du calcul des intégrales.

Il existe de nombreuses variantes :

- **INDO** :(inter mediate Neglect of Differential Overlap): Cette méthode à été proposé par Polple, Beveridge et Dobosh en 1967.Elle permet de faire la distinction entre les états singlet et les états triplet d'un système en conservant les intégrales d'échanges **[9].**

- **MINDO/3** :(Modified Neglect of Diatomic Overlap):Cette méthode a été proposé par Dewar et Thiel en 1977.elle est basée sur l'approximation **[9]**.
- **NDDO** :(Neglect of Diatomic Differential Overlap) qui consiste à négliger le recouvrement différentiel entre des orbitales atomiques sur des atomes différents **[9]**.
- **AM1** :(Austrin model1) :c'est une méthode proposé par Dewar en 1985 AM1 est une correction de MNDO **[9]**.
- **PM3** :(Parametric Method 3) : proposé par Stewart en 1989.PM3 représente la troisième version de MNDO **[9]**.

II. Mécanique moléculaire :

1. Energie potentiel en mécanique moléculaire (champ de force) :

La description des systèmes en mécanique moléculaire (MM) est basée sur une morphologie proche de la physique classique. En effet, les atomes sont considérés comme des sphères dures incompressibles, portant des charges partielles fixes qui sont liées entre elles par des liaisons à des ressorts.

La mécanique moléculaire elle utilise le champ de force qui est une somme de termes énergétiques harmoniques, représentant les interactions liantes et non liantes qui ont lieu à l'intérieur d'une molécule ou entre plusieurs molécules. Quant aux paramètres du champ de force, ils sont obtenus à partir de données expérimentales tels que l'étude par spectroscopie infrarouge de la vibration des liaisons ou encore la mesure de la longueur des liaisons par cristallographie aux rayons x. En plus la mécanique quantique peut donner des informations sur l'angle de torsion ou sur la fréquence de vibration des liaisons par exemple **[10]**.

Les paramètres sont caractéristiques d'un champ de force et ne sont pas des constantes de force. L'objectif de la mécanique moléculaire est de construire un modèle mathématique qui décrive un ensemble de molécule **[11]**.

L'énergie totale peut être décomposée en 2 termes **: [9]**

$$E_{totale} = E_{liante} + E_{non_liante} \qquad (3)$$

L'énergie liante regroupe les atomes liés par un ou plus deux ou trois liaisons covalentes. Elle est devisée en plusieurs termes :

$$E_{liante} = E_{liaison} + E_{flexion} + E_{torsion} \qquad (4)$$

Au-delà de ça l'énergie est calculée sous forme d'énergie non liante :

$$E_{non\text{-}liante}=E_{\acute{e}lectrostatique}+E_{VDW} \quad (5)$$

1.1-Energie d'interaction entre atomes liés :

Les déformations des liaisons et des angles sont représentées par un oscillateur harmonique avec une sommation sur toutes les liaisons covalentes ou sur tous les angles entre atomes liés par liaison covalente **[12]**.

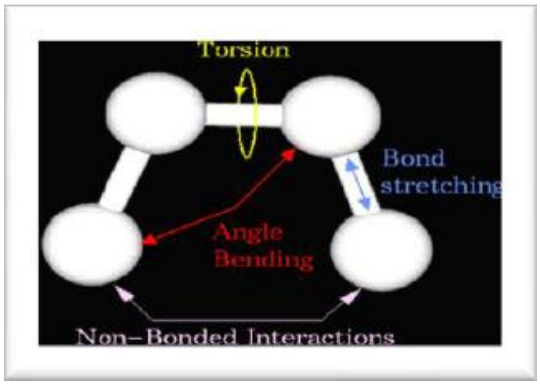


Figure1 : énergie de liaison

1.2-Energie d'élongation :

Définit l'énergie mise en jeu par la différence de la longueur r des liaisons après dilatation et compression à partir de leur valeur d'équilibre **[13]**.

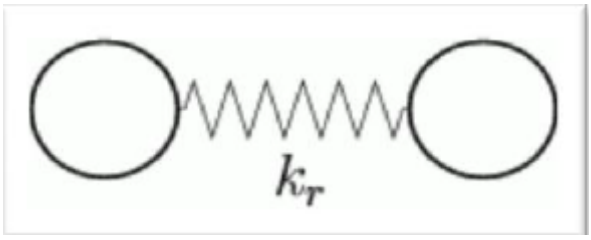


Figure 2 : énergie d'élongation

$$E(r) = \sum Kr\,(r - ro\,) \quad (6)$$

$\mathbf{r_0}$: longueur de liaison d'équilibre

$\mathbf{K_r}$: constante de force

1.3- Energie de torsion :

L'énergie de torsion est donnée par l'équation suivante :

$$V(n) = \sum K\emptyset\ (1 + \cos n\emptyset\ ) \quad (7)$$

V(n) : la barrière énergétique de rotation

n : le nombre de minimas énergétiques

$\oplus$: l'angle dièdre **[10]**

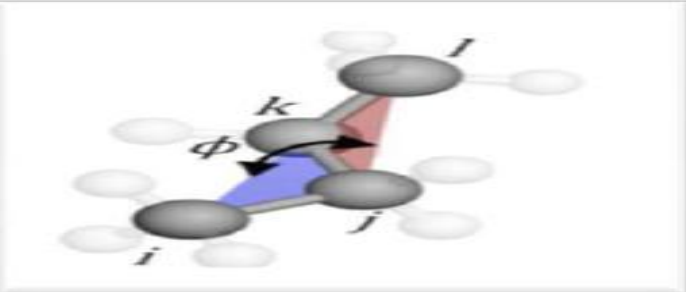


Figure 3 : angle de torsion entre quatre atomes de carbone

1.4-Energie de rotation :

C'est l'énergie impliquée dans les changements d'angle entre deux liaisons adjacentes à partir d'un angle de liaison à l'équilibre **[3].**

$$E(\theta) = \sum K\theta\ (\theta - \theta o) \quad (8)$$

Θ_0 :l'angle à l'équilibre entre 3 atomes en (°)

K_θ : la constante de force rotation associée en kcal/mol

Θ : désigne la valeur d'angle de liaisons entre 3 atomes

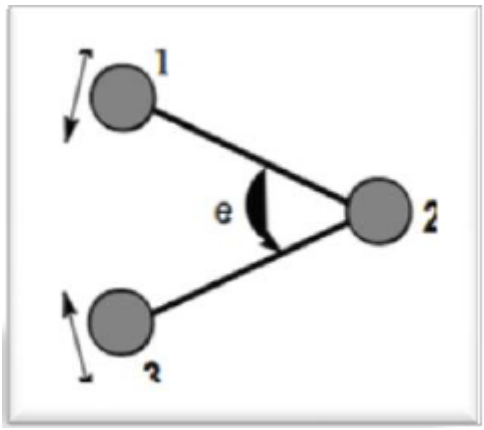


Figure 4 : énergie de déformation des angules de valence

2 - Energie d'interaction des atomes non-liés :

Cette énergie s'exprime sous la forme **[14]**

$$E_{\text{atomes non liés}} = E_{VDW} + E_{\text{électrostatique}} + E_{\text{liaisons hydrogène}} \quad \textbf{(9)}$$

2.1-Energie de VDW :

Nous appelons l'énergie de Van-der-Waals c'est l'énergie d'attraction et de répulsion entre deux atomes constituant un dipôle .elle s'exprime sous la forme du potentiel de Lennard-Jones, qui se compose d'un terme d'énergie attractive à $1/r_{ij}^{6}$ et d'un terme d'énergie répulsive en$1/r_{ij}^{12}$.les interactions de VDW se produisent entre des atomes relativement proches. Lorsque la distance entre les deux atomes est inférieure à la somme des rayons de VDW, le terme répulsif qui prédomine et inversement pour une distance supérieur, c'est le terme attractif qui fonctionne principalement **[14]**.

$$E\text{vdw} = \sum_{i=0}^{n} \sum_{i=0}^{n} \left[\frac{Aij}{\text{rij}^{12}} - \frac{Bij}{\text{rij}^{6}}\right] \quad \textbf{(10)}$$

A_{ij}, B ij : paramètres dépendant de la nature des atomes i et j distants de r_{ij}

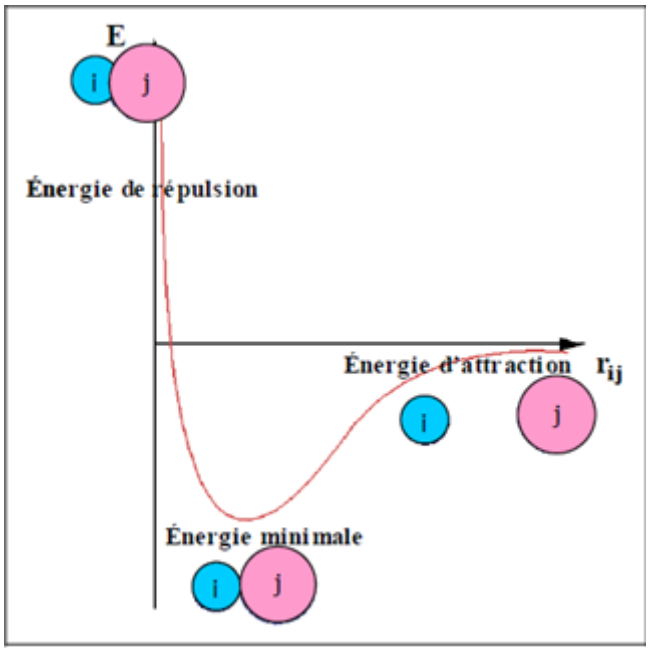


Figure 5 : courbe f (r_{ij}) représentative de la fonction d'énergie de Van der Waals entre deux atomes i et j (potentiel de Lennard-Jones

2.2-Interactions électrostatiques :

Les interactions électrostatique existent entre différentes paires d'atomes (deux atomes portant chaque une charge) est traduit par un potentiel électrostatique **[15]**

L'énergie de l'interaction électrostatique est décrite par la loi de coulomb :

$$Eélectrostatique = \sum_{i=0}^{n} \sum_{j=0}^{n} \frac{qiqj}{Drij} \qquad \textbf{(11)}$$

q_i, q_j : charges des atomes i et j

r_{ij} : distance i-j

D : constante diélectrique du milieu

2.3-Energie de liaisons hydrogène :

La liaison hydrogène ou pont hydrogène est une force intermoléculaire ou intramoléculaire impliquant un atome d'hydrogène porté par un atome électronégatif et un atome électronégatif (comme l'oxygène, l'azote et le fluor) portant un doublet libre. L'intensité d'une liaison

hydrogène est intermédiaire entre celle d'une liaison covalente et celle des force de VDW.L'énergie des liaisons d'hydrogène est de l'ordre de **3Kcal/mol**.

III. Dynamique moléculaire :

Des lois de la mécanique classique, les trajectoires des atomes en phases cristalline, en solution ou en phase gazeuse **[16-17]** ont conduit à la dynamique moléculaire pour étudier l'évolution d'un système dans l'espace conformationel. Au cours du temps, l'énergie du système le long de son parcours à travers la surface potentiel du système est donnée parla résolution numérique des équations classique du mouvement (de Newton).

1. principe :

Le calcul des positions et les vitesses d'un système atomique est l'objectif de la simulation de dynamique moléculaire **[18].**

En dynamique moléculaire classique **[19-20],** les atomes d'une molécule sont représentés par des masses ponctuelles dont l'ensemble des forces exercées sur lui par les autres atomes en fonction du temps détermine le mouvement.

Tout d'abord, à une certaine température, une vitesse initiale est attribuée à chaque atome.

A partir de ces vitesses, considérées comme constantes, la position i et δt est l'incrément de temps. A partir de ces nouvelles coordonnées, on détermine les forces qui agissent sur chaque atome (équation 1) selon le champ de force et le potentiel utilisé, et selon la seconde loi de Newton, de nouvelles vitesses et position sont définies.

$$\overrightarrow{Fi} = mi \cdot \overrightarrow{ai} \qquad \textbf{(12)}$$

Où :

$\overrightarrow{Fi}$: Le vecteur de force qui s'exerce sur l'atome i

mi: la masse de l'atome i

$\overrightarrow{ai}$: Vecteur accélération de l'atome i

L'équation de Newton montre que la vitesse et le sens de mouvement atomique dépendent des forces agissant sur les atomes. En réalité, les atomes possèdent une vitesse initiale propre qui

se conforme à l'énergie cinétique totale du système.et bien sûre, cette énergie dépend de la température de simulation étudiée.

Pendant l'augmentation de la température, on fournit une énergie cinétique aux atomes correspondant à une certaine température. Il s'agit de la seule énergie cinétique qui permet au système de franchir des barrières de potentiel que les autres minimiseront ne peuvent franchir.

Les vitesses V des atomes sont déterminées par le tirage aléatoire suivant une distribution de Maxwell :

$$\boldsymbol{Ec = \sum mi < Vi >^2 = \frac{3}{2}\, NKbT} \qquad \textbf{(13)}$$

Où : $\boldsymbol{\langle Vi \rangle^2}$: valeur du moyenne carré de la vitesse

N : nombre d'atome du système

$\mathbf{K_b}$: constante de Boltzmann

T : température absolue

Ensuite, on peut démarrer une simulation pour cela on calcule :

Les accélérations (a_i) : on utilisant la loi de Newton (20) avec F_i : force appliquée sur l'atome « i » est calculée avec la relation suivant :

$$\boldsymbol{\overrightarrow{Fi} = \overrightarrow{dEp} / ri(t)} \qquad \textbf{(14)}$$

Les vitesses : la première dérivée de l'accélération c'est la vitesse : $\mathbf{\overrightarrow{ai} = \overrightarrow{dvi} / \overrightarrow{dt}}$ **(15)**

Les positions : la première dérivé de la vitesse ou la deuxième dérivé de l'accélération c'est la position : $\mathbf{\overrightarrow{vi} = \overrightarrow{dri} / dt}$ **(16)**

et

$$\boldsymbol{\overrightarrow{ai} = \overrightarrow{dri^2} / \overrightarrow{dt^2}} \qquad \textbf{(17)}$$

Des intégrations successives de ces équations sont effectuées en divisant la trajectoire en une série d'état discret séparés par des intervalles de temps très courts, ce qui conduits à une trajectoire en fonction du temps. Puisque, la vitesse et l'accélération de l'atome 'i' à l' instant ''t'' sont connue, on peut connaitre sa position à l'instant t +Δt.

Δt : le pas d'intégration ($\approx 10^{-15}$)

$$\boldsymbol{ri}\,(\boldsymbol{t}+\Delta\boldsymbol{t}) = \boldsymbol{ri}(\boldsymbol{t}) + \boldsymbol{Vi}\cdot\Delta\boldsymbol{t} + \frac{\mathbf{1}}{\mathbf{2}}\,\boldsymbol{ai} * \Delta t^2 \qquad \textbf{(18)}$$

2. Un calcul de dynamique moléculaire :

2.1. Préparation du système :

La première étape principale consiste à obtenir un fichier contenant les coordonnées de tous les atomes du système.

Si l'étude se fait en solvant explicite, il est nécessaire de plonger la molécule dans le solvant dans l'environnement proche du soluté. Et si l'eau est un solvant, toutes les molécules est situé à moins de 2.8 A° d'un atome lourd du soluté sont supprimées.

2.2. Minimisation :

La minimisation du système se fait par l'utilisation successive des deux méthodes SD et GC, en cas de solvatation implicite.

En cas de solution explicite, le protocole est le suivant : les minimalisations sont effectuées consécutivement : sur le soluté uniquement (le solvant étant fixe) puis sur le solvant uniquement (le soluté étant fixe). Ces deux dernières étapes sont répétées une deuxième fois, puis le système solvant soluté dans son ensemble est minimalise, sans aucun restriction.

Enfin, la structure obtenue correspond à un point minimum de l'hyper surface d'énergie potentielle pour une température de 0 K.

2.3 . Chauffage :

Cette étape nous permet de contribuer progressivement et unitairement l'énergie cinétique au système pour atteindre la température de simulation requise qui est souvent de 300 K.

Pendant des intervalles de temps réguliers, la vitesse est assignée au hasard selon une distribution de Boltzmann pour chaque atome N du système.

La relation suivante relie directement la température aux vitesses :

2.4. Equilibrage :

Cette étape consiste à stabiliser l'énergie totale et par conséquent la température d'équilibrage se fait en deux étapes : Premièrement, on laisse évoluer le système et en même temps en surveillant l'énergie totale que l'on stabilise en jouant sur la température par l'intermédiaire des vitesses comme durant la phase de chauffage. Dans la deuxième étape, l'énergie totale est contrôlée avec la température, mais dans cette étape le contrôle se fait par réajustement.la température ne doit pas dépasser (+ OU -) 10K de la température définie.

2.5. Production :

Pendant l'étape de production, le système se développe librement, sains contrainte. C'est cette étape qui donne la trajectoire de simulation de dynamique moléculaire correspondante qui va servir à l'analyse du comportement du système. Pour valider cette étape, il faut au minimum surveiller la stabilité du système par l'intermédiaire de l'énergie totale et de la température. Si l'une de ces quantités change donc on peut la dériver, cela signifier qu'il ya une erreur ou une hétérogénéité entre les paramètres de simulation utilisés, par exemple, la phase d'équilibrage a été trop courte ou bien le pas d'intégration est inappropriée **[21]**.

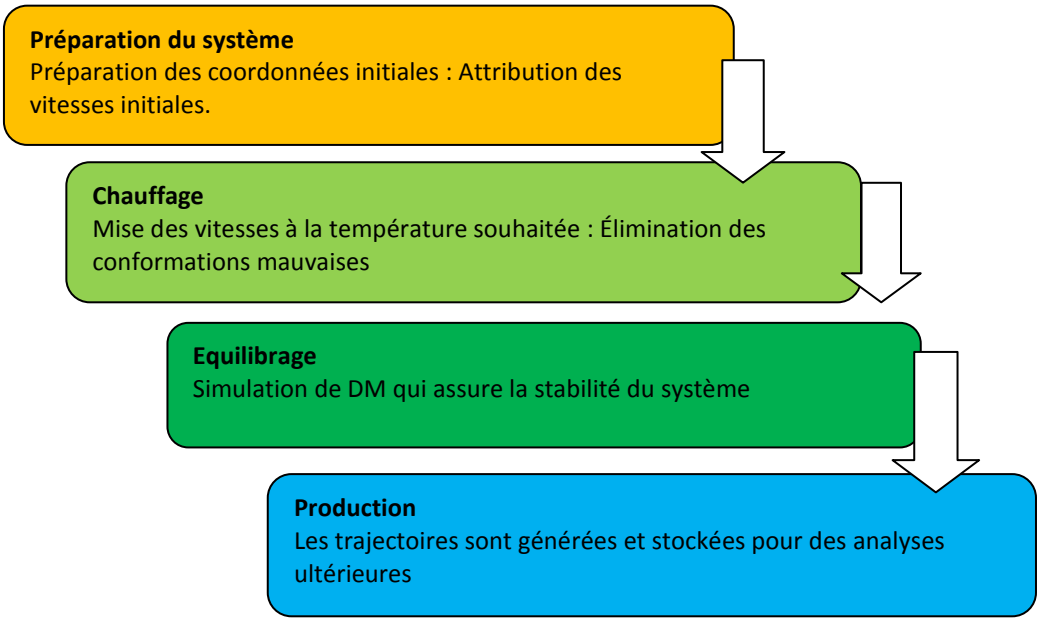


Figure 6: protocole générale pour des simulations DM

IV. Le docking moléculaire :

Des principes de reconnaissance mutuelle entre la molécule et sa cible gouvernent l'action d'une molécule dans une protéine. C'est le rôle de docking moléculaire. Il est défini par un ensemble de méthodes algorithmiques et géométriques permettant la production in silico de la géométrie (orientation relative et position)la plus favorable d'un ligand dans son récepteur **[22]**.généralement, le récepteur est une grosse molécule par exemple une protéine et le ligand est une petite molécule .Le terme docking est utilisé seul pour désigner un « docking protéine-ligand » **[23]**. Récemment, des molécules d'importance thérapeutique ont été conçues, il a bénéficié des avancées de diverses disciplines scientifiques telles que la biologie, la médecine, la chimie pharmaceutique et informatique. En effet, avec le développement de l'outil informatique, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire deviennent un outil essentiel dans la recherche en biologie **[24-25]**.

1. Application de docking :

Il existe au moins deux applications principales au programme de docking. L'application classique est la prédiction du mode d'interaction, qui repose sur la détermination correct de la position du ligand par rapport à son récepteur .l'autre application consiste à optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur.

L'optimisation de la géométrie de ligands déjà connus peut avoir plusieurs raisons :

L'amélioration de son affinité, de sa spécifié, de sa synthèse ou même de ses propriétés ADMET (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité). **[26]**

De nombreuses cibles thérapeutiques (protéines) dont la structure 3D en complexe avec le ligand ont été déterminées par le docking moléculaire. Actuellement, des conceptions rationnelles basées sur des stratégies de criblage virtuel conduisent à un grand nombre de médicaments mis sur le marché.

Exemple des stratégies de criblage virtuel :

- Un inhibiteur de l'aldose réductase : en cherchant dans des bases de données de composés **[27]**.
- Un inhibiteur de la trans-activation de la HIV-1 RNA : une recherche dans de des bases données de composés et un docking rigide sont utilisés **[27]**.

- Un inhibiteur de la thrombine et celui de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases : des chimio thèques combinatoires sont étudiés parle docking **[28]**.

2. Du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité :

Selon la prise en compte de la flexibilité du ligand, on peut classés les méthodes de docking en 3 catégories :

Dans la première classe le ligand et la protéine sont considérés rigides, reflétant ainsi le principe de concept « clé-serrure » où la clé représente le ligand, et la serrure représente la protéine **[29]**.

La seconde classe considère le ligand comme étant flexible par contre la protéine reste toujours rigide. Les résultats obtenus en utilisant cette approche pour concevoir un nouveau médicament sont très bons. Ce type de docking reste encore utilisé jusqu' à présent.

La dernière classe permet de traiter en flexibilité du ligand et de façon partielle la protéine **[30]**.

3. Les outils de docking moléculaire :

3.1. Récepteur :

Pour faire le docking, la disponibilité de la structure des protéines est l'un des éléments essentiels **[30]**. Parmi les sources d'informations de ces structures on a la cristallographie aux rayons X et de la RMN. Cette méthode est responsable de la plus part des structures issues d'une basse de données de structure accessibles gratuitement appelée la « Protein Data Bank » (PDB). En mars 2018, plus de 117000 structures protéiques ont été résolues et ajoutées à la liste de la PDB grâce à la cristallographie aux rayons X

Environ 11000 structures ont été fournies par la technique RMN pour seulement 1500 dans le cas d'un microscope électronique **[32]**. Quand la structure 3D d'une protéine n'est disponible expérimentalement, les méthodes de prédiction par homologie de séquence peuvent être mises en œuvre **[33]**.

3.2- Ligand :

Il existe deux méthodes pour obtenir une structure tridimensionnelle d'un ligand. La première méthode de nature commerciale, est constituée de bases de données de structure chimiques appelés espaces chimiques ou chimio thèques. Dans La seconde méthode des ligands de la PDB ou de la littératures dessinés, optimisés et sauvegardés dans différents extensions (pdb, mol, mol2…..etc.) à l'aide des logiciels de construction moléculaire tels que cham. Drew, Argus lab., Titan ou Sybyl…sont utilisés **[34].**

3.3- Les programme :

Le docking permet de prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et leur cible. Ce processus se déroule en deux étapes :

Dans la première étape, le ligand est placé dans son site d'interaction. La seconde étape consiste, quant à elle, à évaluer les poses de ligand lors de la première étape pour ne garder que le meilleur. Les types des algorithmes utilisés pour ces deux étapes en fonctions du programme de docking utilisée **[35]**. Il existe actuellement un nombre important de programmes de docking moléculaire sont disponibles. Parmi les programmes les plus utilisés, nous citons comme exemple Auto Dock [**36],** FlexX [**37]**, Gold [**38]**, Dock **[39]** et Surflex **[40].**

Nom	Editeur	SiteInternet
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrödinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

Figure 5 :adresses des principaux programmes de docking moléculaire[60]

4. Les étapes du docking :

Le docking (la première étape) : étape de sélection, consiste à positionner le ligand dans le site actif de la protéine et à analyser les conformations, les positions et les orientations (poses) possibles, et seuls les meilleurs modes d'interactions sont retenus.

Le scoring (la seconde étape) : étape de classement, consiste à estimer l'affinité ligand-protéine et d'attribuer un score aux poses obtenues lors de la première étape pour choisir à finalement la meilleure pose. **[41,42]**

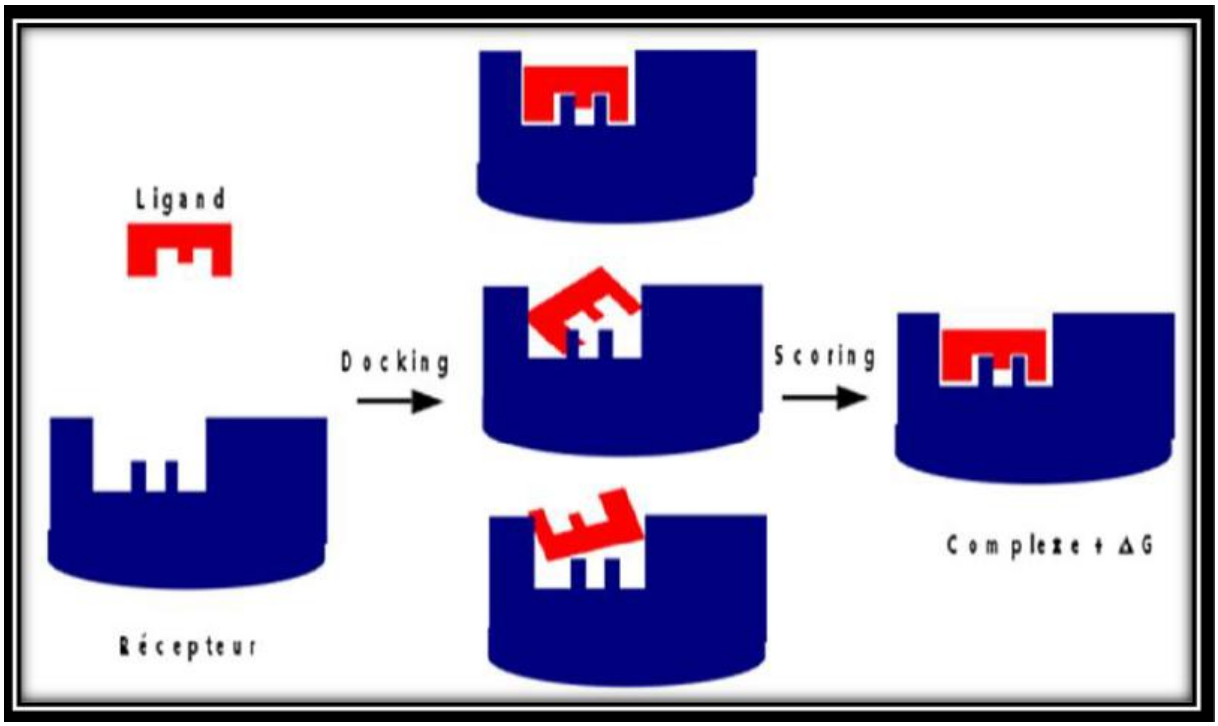


Figure 6 : principe général d'un programme de docking

5. Algorithmes de docking :

Il existe plusieurs méthodes qui permettent de prendre en compte la flexibilité du ligand en particulier des méthodes systématiques et aléatoires ou stochastiques

5.1. Méthodes systématiques :

Cette méthode est basée sur la découpe de ligand en fragments rigides et flexibles. Entre les points où les rotations sont possibles, une ou plusieurs ancres sont déterminées. Premièrement, un **[43,44]** ou plusieurs **[45,46]** fragments qui doivent être rigides sont placés au sien du site actif et donc mis en interaction avec la cible, ensuite le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de

torsion. Cette méthode a été implémentée dans nombreux programmes dont Dock **[43]** FlexX **[44**] et Surflex **[47].**

5.2. La méthode stochastique :

L'approche stochastique consiste à déformer aléatoirement la structure tridimensionnelle du ligand. Parmi les principaux algorithmes stochastiques est la méthode par algorithme génétique. Cette méthode a été incorporée dans nombreux programmes dont Auto Dock et GOLD **[48]**

6. les fonctions de score :

Les différentes fonctions de score mises en oeuvre dans les programmes de docking ont fait l'objet de plusieures publications **[49] [50] [51]**. Elle sont généralement classées suivant trois classes : les fonctions de score basées sur des connaissances statistiques, les fonctions de score basée sur un champ de force et les fonctions de score empirique . Enfin, la combinison de plusieurs fonctions de score de nature différente peut créer des fonctions de score de consenus.

6.1 les fonctions de score basées sur un champ de force :

Le champ de force est la somme de deux énergies :L'énergie entre atomes liés et l'énergie entre atomes non-liés. Ce second terme correspond au terme principal de l'énergie d'intéraction protéine-ligand dans le cas d'une application à un probléme de docking. La plus part du temps, les fonctions de scores basées sur un champ de force ne considérent qu'une seule conformation de la protéine. Ainsi, si l'on souhaitait faire une comparison entre l'activité de deux ligands avec la meme conformation, cele permet de faire abstraction du terme d'énergie interne dela protéine qui s'annule dans l'expression de la différence d'énergie libre d'intéraction entre les deux ligands.

les fonctions de score présentent de nombreuses limitations en plus de celles caussés par la représentation du systéme . Exceptionnelement, les effets d'entropie, qui peuvent varierd'un ligand à l'autre pour un site actif donné, aussi bien que pour un ligand donné d'un site actif à l'autre,ne sont pas pris en considération. par conséquent,la contribution enthalpique de l'énergie libre d'intéraction est ainsi prise en considération.

Les fonctions G-Score **[52]** (basée sur le champ de force de Tripos **[52]**) et celle incorporée dans AuttoDock **[53]** (basée sur le champ de force AMBER) sont des exemples de fonction de score.

6.2.les fonctions de score empiriques :

Ce type de fonctions de score calculent l'énergie libre de liaison approximativement, en sommant de façon pondérée différents termes d'intéraction dérivés de paramétres structuraux. Les poids de la fonction de score sont ajustés à fin de reproduire les données expérimentales, par exemple les constantes de liaison tirées d'un jeu d'entrainement de complexes protéine-ligand.

La majorité des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score à cause de leur efficacité (en terme de rapport précision/rapidité). Mais,le principal inconvénient de ces fonctions empiriques est leur forte dépendance aux données utilisées pour les caliber qui, en cas de mauvaise paramétrisation, peut limiter leur transférabilité sur d'autre systémes. Parmi les fonctions de score empiriques principal, on peut citer : LigScore **[54]**.

6.3. les fonctions de score basées sur des conaissances statistiques :

Ce type de fonctions de score sont basées sur un principe que les distances interatomiques les plus représentées statistiquement dans les complexes constituent des contacts énergétiques appropriées et, qu'à l'inverse, les plus rares représentent des intéractions moins stables. En plus,leur paramétrisation dépend de la quantité d'informations expérimentales disponibles et on doit leur apparition à la profusion de données structurales accessibles dans des bases de données telles que la PDB. Par exemple populaire de ces fonctions de scores :DrugScore **[55]**.

6.4. les fonctions consensus :

Les fonctions consensus sont des fonctions hybrides combinent les résultats issus de diverses fonctions de score. On suppose qu'il est possible de compenser partiellementles les faiblesses intrinséques detoutes les fonctions de score employées,évitant leurs erreurs individuelles et ainsi d'augmenter la probabilité d'identifier des composés actifs **[56].** Mais, dans la cas ou les termes des différentes fonctions de score sont fortement corrélés,l'intérét du consensus devient limité car il peut entrainer une amplification des erreurs, au lieu de les atténuer. Ces fonctions consensus ont récemment fait le role d'une revue **[57].**

Référence :

[1] L. Rivail, "Eléments de chimie quantique à l'usage des chimistes", CNRS Edition, Paris, (1999).

[2] D. A. Mc Quarrie, J.D. Simon, "Chimie Physique Approche Moléculaire", Dunod, Paris, (2000).

[3] S.Belaidi, « nouvelle approche de la stéréo sélectivité dans les macrolides antibiotiques dissymétrique par la modélisation moléculaire », thèse doctorant, université de Batna, (2002).

[4] R.Bounehas, « approche qualitative la relation structure activité dans des dérives bioactives de 1, 2,3-triazine », mémoire master, université Biskra, (2014).

[5] J. Débord, « Introduction à la modélisation moléculaire », pp.37-41, (2004).

[6] E. Schrodinger, *Ann.Phys.Leipzig*, (1926), ***79***, 361, 489, 734.

[7] D.Harkati, « Etude de la structure et des propriétés physico-chimiques associées, de quelques molécules bioactives à intérêt pharmaceutique », Thèse de doctorat, université Biskra, (2015).

[8] PD.Leeson, and M.Andrew, Davis. "Time-related differences in the physical property profiles of oral drugs", *Journal of medicinal chemistry*, (2004), **47:25**, 6338-6348.

[9] Cours de post-graduation; option; chimie théorique: assuré par Dr. S. Mekelleche. (2000-2001).

[10] C.Hercend, « Contribution de la modélisation moléculaire à l'étude de pathologies humaines : Application au transporteur ATP7B et au récepteur 5HT2B », Thèse de doctorat, Université René Descartes - Paris V, Français, (2012).

[11] Z.Almi et Y.Soualah, « Etude de la relation structure activité des phénothiazines a chaine linéaire », Mémoire de master, université Biskra, (2010).

[12] N.L.Allinger, *In Advances in physicalorganicchemistry*, AcademicPress, (1976), **13,** 1-82.

[13] R.Mazri, « Nouvelle approche des relations structures-activités dans des molécules antibiotiques », Thèse de doctorat, université Biskra, (2015).

[14] MA. Leach,.*Addison Wesley Longman Ltd: Harlow*,(1996), 25-130.

[15] D. A. Case, et al, *AMBER7*, (2002).

[16] R.Mazri, Nouvelle approche des relations structures-activités dans des molécules antibiotiques, Thèse de doctorat, université Biskra, 2015

[17] P. A. Kollman, *Acc. Chem. Res.* (1985), **18**, 105.

[18] W. F. van Gunsteren, *Prot. Eng.*, (1988**)**, **2**, 5.

[19] J. A. McCammon; S. C. Harvey, *Cambridge*, (1987).

[20]D. Frenkel, B. Smit, *Academic press: San, Diego*, (1996).

[21] Krid Y. « Conception *in silico* de nouveaux flavonols inhibant potentiellement l'enzyme de Conversion de l'Angiotensine pour le traitement de l'hypertension artérielle ». Mémoire de Master en Biochimie Moléculaire et Santé, Université des Frères Mentouri, Constantine. Algérie. (2013).

[22] Bouali-Haquenée F. « Etude de l'interaction de quelques sels de métaux avec les sucres en solution aqueuse par modélisation moléculaire ». Thèse de doctorat en Chimie Organique Appliquée. Tlemcen : Université Abou BekrBelkaid. Algérie. (2016).

[23] Beautrait A. « Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-Getétude du domaine FAT de la kinase d'adhérence focale FAK ». Thèse de doctorat d'université: Chimie Informatique et Théorique. Nancy I : Université Henri Poincare. France. (2008).

[24] El Hadj Saïd K, *Mémoire de Master en Chimie Organique*, Université de Tlemcen. Algérie. (2016).

[25]Merzoug.A. « Étude in silico de l'inhibition dela peptide déformylase » .Thèse de Magistère. UnivMentouri Constantine, (2012).

[26]Mokrani E.H. *Thèse de Magistère*. UnivMentouri Constantine, (2012).

[27]ArraultA. *Thèse de doctorat d'université,* Université d'Orléans. France, (2007).

[28]A.Vuorinen, D. Schuster, *Methods*, (2015), **71,113**-134.

[29]C.Sotriffer, et al., .*Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. (2003), **1,281**–331.

[30] F.Spyrakis, et al., *Burger'sMedicinal Chemistry and Drug Discovery*. (2010), **48,601**–684.

[31] Site web: https://www.rcsb.org/stats/summary. Consulter le : 03-03-2018

[32] Nathalie L. « Méthode de criblage virtuel *in silico* : importance de l'évaluation etapplication à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6 ». Thèse de doctoratd'université : bioinformatique. Paris : Université Paris-Sud. France, (2014).

[33] E.H Mokrani, *Thèse demagister, UniversitéMentouri* Constantine. Algérie, (2012).

[34] François M. « Développement d'une nouvelle méthode de docking basée sur lesmécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques ». Thèse de doctorat del'université : chimie. Paris sud : Université Paris SUD, (2015).

[35] G.M.Morris, et al., *Journal of ComputationalChemistry*. (1998), **19, 1639**-1662.

[36] M.Rarey, et al., *Journal of Molecular Biology*, (1996); **261**,470-489.

[37]G.Jones, et al., *Journal of Molecular Biology*, (1997), **267,727**-748.

[38]T.J.Ewing, et al., *Journal of Computer-AidedMolecular Design.* (2001), **15,411**-428.

[39] Jain N. "Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search". *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. (2007), **21,281**–306.

[40] G. L.Warren, et al, .*Journal of Medicinal Chemistry*, (2006), **49, 5912**-5931.

[41]I.Halperin, et al., *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, (2002), **47,409**-443.

[42]T. J.Ewing, et al., *Journal of Computer-Aided Molecular*, (2001), **15,411**-428.

[43]H.Clauûen, et al, *Journal of Molecular Biology,* (2001), **308,377**- 395.

[44]W.Welch, et al., *Chemistry & Biology*. (1996), **3,449**-462.

[45]N.Budin, et al., *Journalof Biological Chemistry*. (2001), **382**, 1365-1372.

[46]E.Kellenbergeret al., .*Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, (2004), **57,225**-242.

[47]Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking".*Journal of Molecular Biology*.(1997),**267**,727-48.

[48]Gohlke H.; Klebe G., "Approaches to the description and prediction of thebinding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors".*Angew. Chem., Int. Ed. Engl*, (2002), **41:15, 2644**-2676.

[49]P. Ferrara, et al, *J. Med. Chem*, (2004), **47, 3032**-3047.

[50]Wang R., Lu Y., Fang X., Wang S., "An extensive test of 14 scoring functions using the PDBbind refined set of 800 protein-ligand complexes". *J.Chem. Inf. Comput. Sci*, (2004), **44:6**, 2114-2125.

[51]B. Kramer, et al., *Proteins: Struct, Funct, Genet*, (1999), **37:2**, 228- 241.

[52]Goodsell D. S., Morris G. M., Olson A. J., "Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock", *J. Mol. Recognit*, (1996), **9:1, 1**-5.

[53]Krammer A., Kirchhoff P. D., Jiang X., Venkatachalam C. M., Waldman M., "LigScore: a novel scoring function for predicting binding affinities". *J.Mol. Graph. Model*, (2005), **23:5,395**-407.

[54]Gohlke.H. Hendlich. M., Klebe.G. "Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions", *J. Mol. Biol*, (2000), **295:2,337**-356.

[55]P. S.Charifson, et al. *J. Med. Chem*, (1999), **42:25, 5100**-5109.

[56]FeherM. "Consensus scoring for protein-ligandinteractions".*DrugDiscov.Today*, (2006), **11:9-10**, 421-428.

Sommaire

I. Méthodes quantiques : 3

1. Méthodes ab-initio (Hartree-Fock –Roothaan): 4

2. Méthodes semi-empirique :..... 4

II. Mécanique moléculaire :..... 5

1. Energie potentiel en mécanique moléculaire (champ de force) : 5

1.1-Energie d'interaction entre atomes liés :..... 6

2 - Energie d'interaction des atomes non-liés : 8

III. Dynamique moléculaire :..... 10

1. principe : 10

2. Un calcul de dynamique moléculaire :..... 12

IV. Le docking moléculaire :..... 13

1. Application de docking : 14

3. Les outils de docking moléculaire : 15

4. Les étapes du docking : 16

5. Algorithmes de docking : 17

6. les fonctions de score : 18

Référence : 20

1. Méthodes semi-empirique : 4

Chapitre II

La 5-lipoxygenase, l'inflammation, Zileuton et les glucosinolates

L'arachidonate 5-lipoxygénase, également connue sous le nom d'ALOX5, 5-lipoxygénase, 5-LOX ou 5-LO, est une enzyme de la famille des lipoxygénases contenant du fer non hémique (EC 1.13.11.34) qui chez l'homme est codée par le gène *ALOX5*. Elle catalyse la transformation des acides gras en leucotriènes ainsi que des métabolites induisant plusieurs processus pathologique comme l'inflammation, cancer, thermogènes, ostéoporose **[1]**.

Dans les tissus des animaux les lipoxygénases sont des métallo-enzymes. Un atome de fer non hémique unique est présent par molécule et il oscille entre deux états d'oxydation Fe(II) (enzyme inactive) et Fe(III) (forme active) **[2]**.

Les lipoxygénases (LOX) appartiennent à une famille hétérocyclique d'enzymes qui catalysent la peroxydation des lipides dioxygénases d'acide gras polyinsaturée (AGPI) en leurs dérivés hydroperoxydés correspondants. Le substrat le plus courant dans les tissus animaux est l'acide arachidonique **[2]**.

Jusqu'à présent, trois iso-enzymes majeures ont été trouvés chez les êtres humains, classés en fonctions de leur spécificité de position de l'oxygénation de l'acide arachidonique (AA) : la 5-,12- et 15-LOX insérer O2 au C-5, -12 et -15 positions des acides aminés respectivement, et produire le 5-, 12- et -15 HPETE (acide hydroperoxy-eicosatetraenoique) **[3]** ; ces enzymes ubiquitaires jouent un rôle important dans certaines maladies humaines telles que l'inflammation , les maladies cardiovasculaires, les maladies neuro-dégénératives et les troubles cancéreux**[4]**.

I. La 5-lipoxygénase :

La lipoxygénase oblige la présence de Ca^{2+} et l'ATP **[5]**.C'est une famille de dioxygénases contenant du fer, ce dernier étant un catalyseur de l'hydroper oxydation des lipides, contenant une structure cis, cis1, 4-penta diène. Les produits principaux sont des acides gras hydroperoxydés, qui sont généralement réduits à des dérivés hydroxylés. La 5-LOX joue un rôle important dans la biosynthèse des leukotriènes (LT) **[6]**. La 5-LOX peut être isolée de leucocytes humains et porcins, les mastocytes murins et des cellules de leucémie basophiles de rat **[7]**. La lipoxygénases se déplace entre le cytoplasme et le noyau. La 5-LOX est trouvé seulement dans le noyau, lorsqu'elle est phosphorylée sur la Ser-271. La translocation du cytosol et la matrice nucléaire vers l'enveloppe nucléaire et l'association avec la membrane est favorisé par la fixation du calcium **[6]**.Les études sur les rôles

biologique de 12 et 15-LOX sont limitées, En revanche, La 5-LOXa été largement étudiée et pourrait être biologiquement la plus importante car elle est impliquée dans la biosynthèse des médiateurs inflammatoires puissants (LTs), qui est la seconde voie métabolique principale de l'acide arachidonique (AA) **[3].**

1. Le gène de la 5-LOX :

Le gène humain majeur 5-LOX (71, Kpd) est situé sur le chromosome 10 et devisé en 14 exons. Un gène de lipoxygénase immémorial commune est suggéré par l'identique organisation intron-exon humain 5-,12-et 15-LOX. Différents sites d'initiations de transcription ont été décrits dans le gène de 5-LOX : le majeur (position0) est situé à 65 nucléotides en amont de L'ATPG. Dans la partie distale du gène et dans le promoteur des éléments régulateurs sont indiqués. Le promoteur est friqué en GC, indiqué par les multiples sites SP1 contraignant. Abréviation : TGFRE, élément TGF-b- sensibles **[6]**.

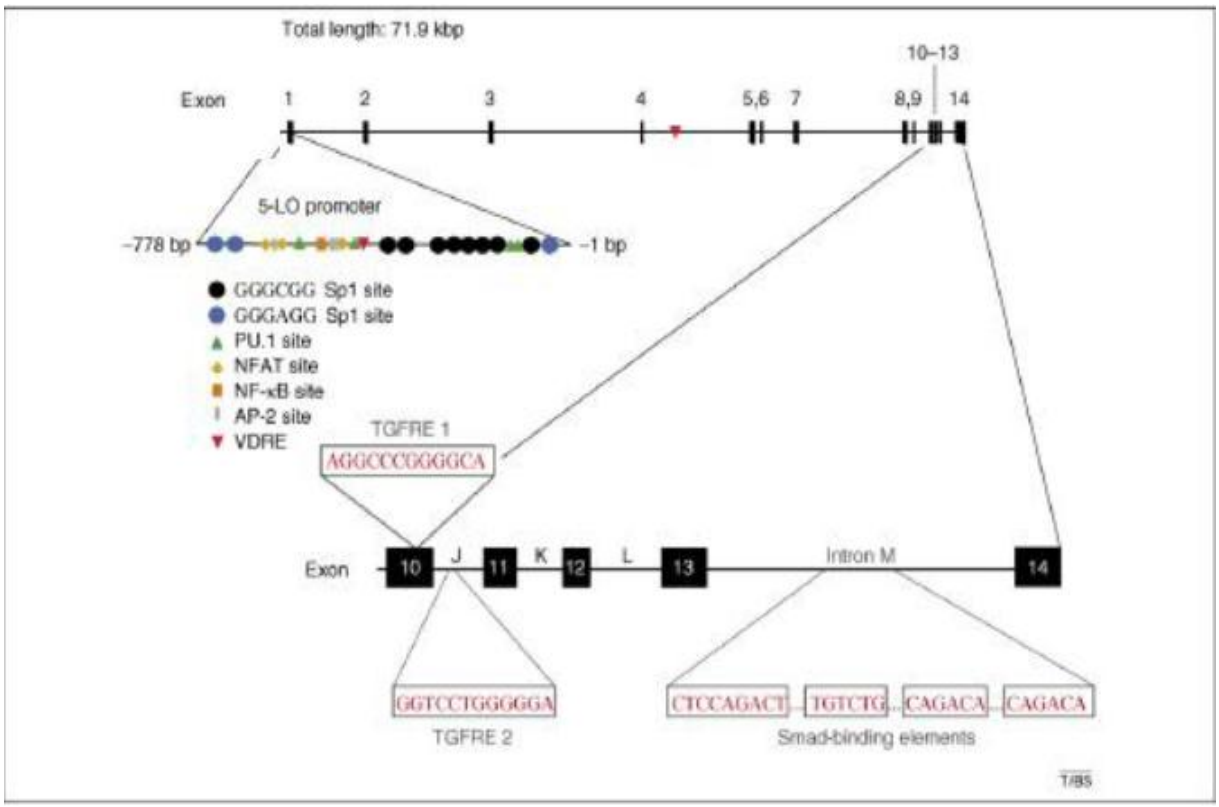


Figure1 : le gène de la 5-LOX

2. La nomenclature internationale de l'enzyme 5-LOX :

EC 1.13.1134

EC1-oxydoréductases

EC 1.13- Agissant sur les donateurs individuels et l'incorporation de l'oxygène moléculaire (des oxygénases). Il faut que l'oxygène ne doive pas être dérivé de l'O2.

EC 1.13.11-En plus l'incorporation de deux atomes d'oxygène.

EC 1.13.11.34-Arachidonate 5-lipoxygénase

Nom accepté : arachidonate 5-lipoxygénase.

Autres noms connu: 5Δ-lipoxygénase, Δ5-lipoxygénase, C-5-lipoxygénase, LTA synthase, arachidonique 5-lipoxygénase, acide arachidonique 5-lipoxygénase, leucotriène A4 synthase, leucotriène-A4 synthase.

Nom systématique : arachidonate : oxygéne 5-oxydoréductase **[8]**.

Dans la nomenclature de la lipoxygénase le nombre fait référence au carbone de l'acide arachidonique à laquelle l'oxygène est ajouté **[6]**.

La 5-LOX est un catalyseur des réactions de l'acide arachidonique (AA) en acide 5(S) hydroperoxy-6-trans-cis-8, 11,14-eicosatétraénoique (5-HPETE), après en LTA4 allylique époxyde **[6]**. L'hydrolisation enzymatique du LTA4 se fait par la LTA4 hydrolase pour obtenir l'acide di-hydroxylé le LTB4 alors que sa conjugaison avec le glutathion conduit au LTC4.

3. La structure générale de la 5-LOX :

L'objectif des études de la séquence des acides aminés des protéines est de mieux comprendre la corrélation entre leurs caractéristiques structurelles et leurs activités biologique **[9]**.

L'enzyme 5-LOX est constituée de 673 acides aminés et un poids moléculaire de 77839 da. La séquence des 17 premiers acides aminés est pareille à celle déterminée par la méthode de dégradation d'Edman de la 5-LOX de la cellule leucémie de basophile de rat **[5]**.

3. Le site actif :

Le site actif de l'enzyme 5-LOX est une cavité allongée, ou les acides aminés (leucines 368, 373, 414, et Ile 406) sont conservés dans tous les types dans lipoxygénases métabolisant l'acide arachidonique. Ces acides aminés comportent des chaines latérales hydrophobes qui forment une zone où le penta diène doit être placé pour la catalyse. Dans la séquence 5-LOX, en plus de ces acides aminés, on retrouve également les résidus Tys 181, Ala 603, Ala 606, Thr 364, spécifiques des séquences 5-LOX, et les petites chaines latérales de Ala 603 et Ala 606 semblent être une condition nécessaire à la formation de Tyr 181, qui, avec Phe 177, '' bouchons '' de la cavité à la fin. Les deux acides aminés Tyr 181 et Ala 603 est en contact avec une liaison Van Der Waals, et les petites chaines latérales des Ala 603 et Ala 606 permettent la fois des composés aromatiques volumineux (Phe177 et Tyr 181) pour pointer dans la cavité où ils peuvent être protégés du solvant. Les acides aminés Asn 407 et His 432 prêtent également à définir le site actif **[10]**.

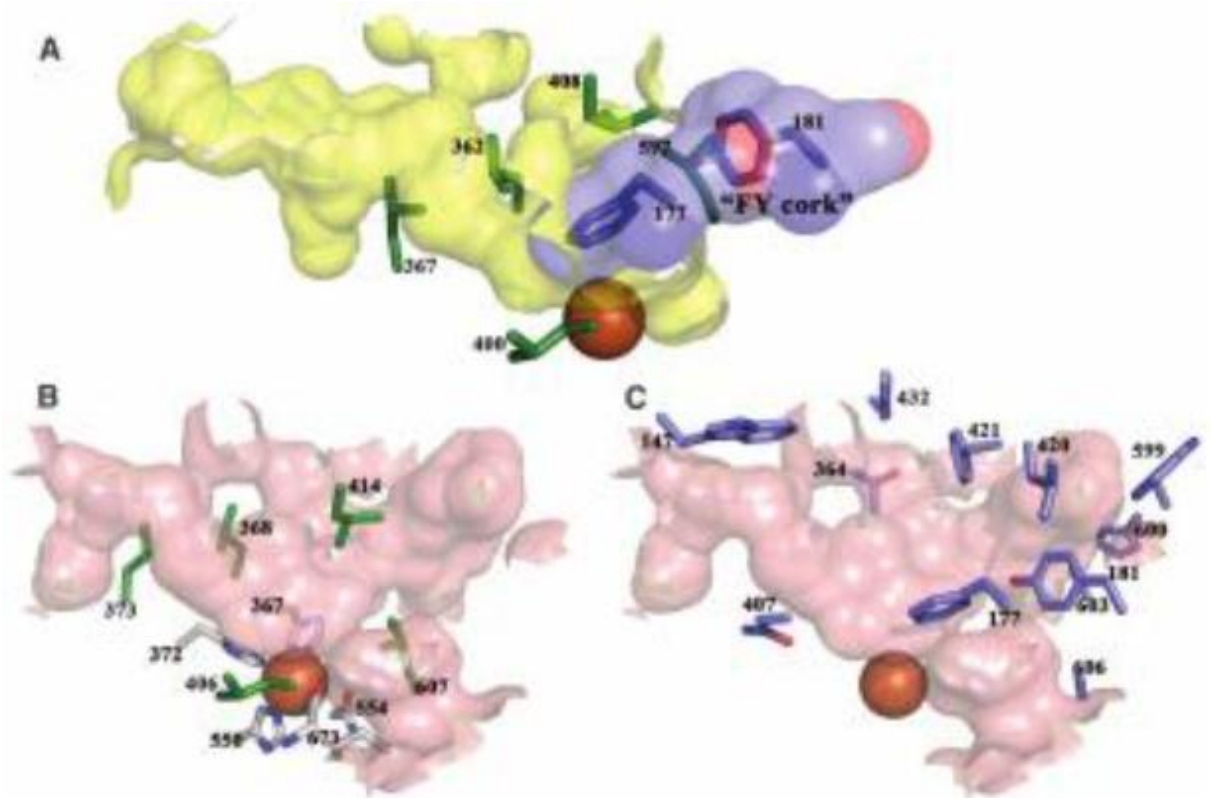


Figure 2 : le site actif de la 5-LOX

II. L'inflammation :

L'inflammation est le processus physiologique de défense du corps contre les attaques. Ses fonctions sont:

-Agent d'attaque détecté,

-Éliminer l'agent,

-Réparer les tissus endommagés.

Tant que l'ajustement est maintenu, le mécanisme est bénéfique pour le corps. En fait, l'inflammation peut entraîner des manifestations pathologiques dans les situations suivantes:

-Réponse inflammatoire insuffisante,

-La réponse inflammatoire est exagérée,

-Un stade d'inflammation persiste et peut être auto-entretenu lorsque l'agent pathogène n'existe plus.

On distingue deux types de l'inflammation : L'inflammation aiguë est différente de l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë est la première réponse à une attaque. C'est immédiat et rapide. Une fois que l'inflammation anormale persiste, on parle d'inflammation chronique, puis on trouve des manifestations pathologiques liées à ce mécanisme. (Figure3) **[11]**.

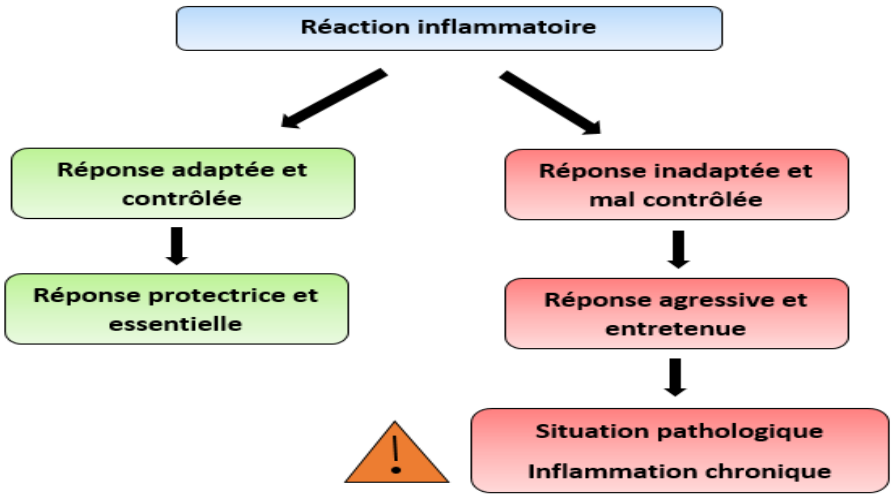


Figure 3: la réaction inflammatoire

1. Inflammation aiguë

L'inflammation aiguë est la réponse immédiate du corps humain à l'agent attaquant, qui se caractérise par une forte exsudation vasculaire et une forte présence de noyaux poly morpho nucléaires dans les foyers inflammatoires [12,13].L'inflammation aiguë peut être guérie spontanément ou après le traitement, mais si le tissu est gravement endommagé, des séquelles peuvent subsister [14].Indépendamment du stimulus inflammatoire et du tissu enflammé, le stade de la réponse inflammatoire aiguë est toujours le même (Figure 3) : modifications vasculaires dans les tissus enflammés, telles qu'une augmentation de la perméabilité des parois des vaisseaux sanguins

Cette perméabilité accrue permet au fluide plasmatique de s'échapper vers l'environnement extravasculaire, un phénomène connu sous le nom d'exsudation plasmatique. Ces modifications vasculaires permettent aux leucocytes de se recruter dans le milieu extravasculaire puis de se déplacer vers le site de l'inflammation.Les globules blancs détruisent et éliminent les stimuli nocifs qui y sont présents, laissant place à la réparation des tissus endommagés **[15]**.

1.1. Inflammation chronique

La persistance de l'inflammation et de son trouble de contrôle causes physiologiques de l'inflammation chronique **[16]**. En fait, l'infiltration excessive de globules blancs dans le site d'inflammation et l'élimination insuffisante de la cause de l'inflammation sont les causes de l'inflammation chronique **[15]**.

Une inflammation chronique peut également être provoquée dans certaines maladies auto-immunes, dans lesquelles les antigènes activent en permanence le système immunitaire. Par conséquent, l'inflammation chronique est caractérisée par une longue durée **[17]**. Par exemple, les crises de goutte sont causées par le dépôt de cristaux d'urate dans les tissus. La présence de ces cristaux attire les neutrophiles qui les prennent. Les neutrophiles résistent à l'action des enzymes lysosomales et ne peuvent pas s'en débarrasser et les libérer avec les enzymes dans les tissus environnants. Cela conduit au recrutement de nouveaux globules blancs, principalement des macrophages et des lymphocytes, et amplifie la réponse inflammatoire chronique **[18]**.

1.2. Médiateurs de l'inflammation :

Le contrôle du métabolisme des acides gras polyinsaturés est effectué par deux types d'enzymes, cyclooxygénase (COX) et lipoxygénase (LOX), qui conduisent ensemble à la biosynthèse de métabolites biologiquement actifs : les eicosanoïdes, la libération de ces médiateurs provoque une réponse inflammatoire.

Ces médiateurs affectent le développement et la résolution de l'inflammation en agissant sur diverses cellules impliquées dans l'inflammation **[15]**. On peut distinguer deux types de substances intermédiaires. Certains sensibilisent les neurones et provoquent une vasodilatation. C'est le cas de la prostaglandine et du leucotriène B4. Le métabolite de l'acide arachidonique lui-même provient de l'action de la phospholipase A2 et libère des phospholipides membranaires en réponse aux lésions tissulaires.

D'autres activent ou sensibilisent les nocicepteurs et augmentent la perméabilité vasculaire, comme la bradykinine plasmatique libérée par les mastocytes, la sérotonine plaquettaire et l'histamine **[19].** D'autres molécules sont impliquées dans l'apparition ou le maintien du processus inflammatoire.

1.3. Biosynthèse des eicosanoïdes [20,21]

Les eicosanoïdes est un milieu lipidique à activité biologique, dérivé des acides gras polyinsaturés à vingt atomes de carbone. Chez les mammifères, leur principal précurseur est l'acide arachidonique (AA) (figure 3.1).

Dans l'organisme, les acides gras (essentiels) incorporés aux aliments sont principalement présents sur la membrane sous forme de phospholipides. Sous l'effet de la stimulation cellulaire (infection microbienne, friction, coup, blessure, brûlure, substance (chimique, facteurs de croissance, etc.) La phospholipase A2 (PLA2) libère l'AA des phospholipides membranaires, ce qui déclenche la cascade d'acide arachidonique. Ensuite, il peut être métabolisé de trois manières :

a. la voie des cyclooxygénases

Il assure la formation des prostaglandines (PGD2, PGE2 et PGF2α), les prostaglandines (PGI2) et le thromboxane A2 (TXA2). Ces composés jouent un rôle important dans le processus inflammatoire et le maintien de l'hépatite, homéostasie gastro-intestinale et rénale.

b. la voie des lipoxygénases

Il provoque principalement la biosynthèse des leucotriène et des hépoxillines. Ces composés sont impliqués dans plusieurs réactions biologiques importantes, telles que les réactions d'inflammation et d'hypersensibilité.

Ces enzymes assurent la formation de divers acides époxy et hydroxyarachidiques (EET et HETE) qui sont impliqués dans le contrôle de la fonction rénale et de la tension vasculaire. Les effets physiologiques et / ou physiopathologiques de ces métabolites AA sont l'objet de recherches approfondies, notamment dans le domaine de l'hypertension **[22, 23,24]**.

Dans notre travail, nous nous intéressons particulièrement aux voies de la lipoxygénase.

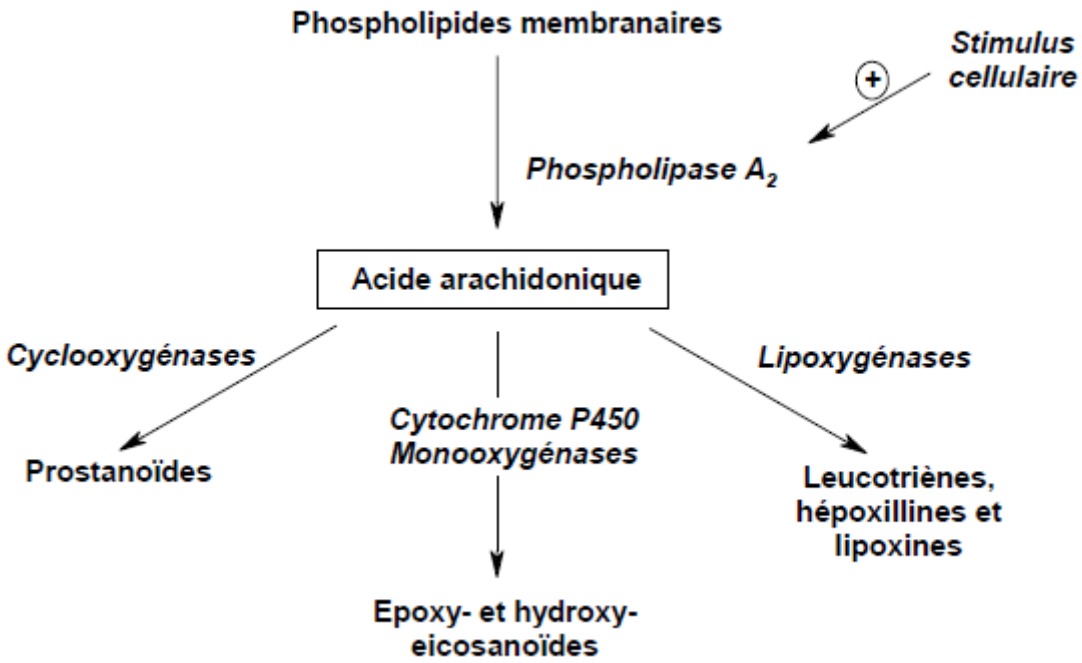


Figure 4 : Biosynthèse des eicosanoïdes

2. L'asthme

2.1. Définition de l'asthme

L'asthme est une maladie hétérogène défini comme une pathologie inflammatoire chronique des voies respiratoires au niveau des bronches et des petites bronches, les bronchioles (voir schéma), liée aux multiples facteurs génétiques et environnementaux **[25].**Elle se traduit par des épisodes récidivants d'essoufflement, oppression thoracique, dyspnée, respiration sifflante, production d'expectoration et une toux qui s'associent à des restrictions des vois aériennes et à une hyperréactivité bronchique .Ces symptômes

provoquent des problèmes indésirables tels que la fatigue, l'insomnie, la réduction des activités physiques et affectent la qualité de vie du patient **[26].**

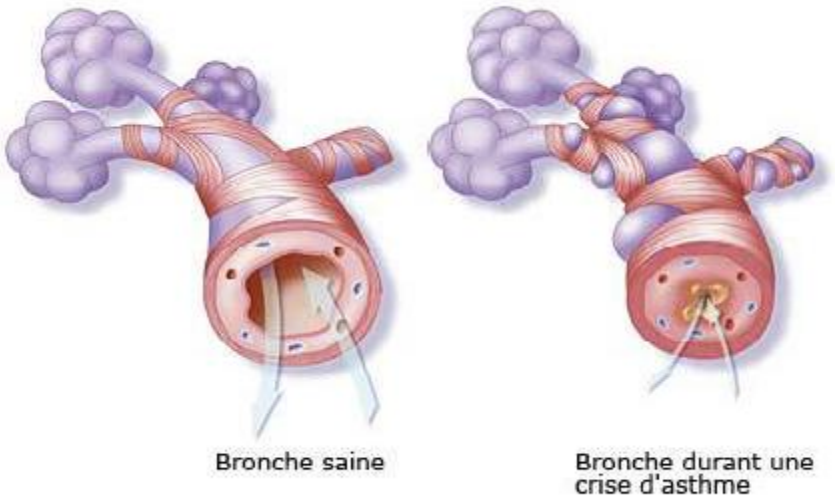


Figure 5: les branches avant et durant une crise d'asthme

2.2. Traitement

Actuellement, le traitement de l'asthme vise à soulager les symptômes causés par le bronchospasme et l'inflammation des voies aériennes et à diminuer le risque d'exacerbation. Malheureusement, à ce jour il est encore impossible de faire guérir cette maladie **[27,28].**

Il existe 2 classes de médicaments permettant de contrôler les symptômes de l'asthme. La première classe, appelés médicaments de crise ou de secours(les bronchodilateurs) doivent être pris en cas de symptômes. Ils a un effet de soulagement immédiat, mais ne permettent pas de calmer l'inflammation des bronches.

La deuxième classe, les médicaments constituent le traitement de contrôle ou de fond(les anti-inflammatoires). Il faut les prendre tous les jours, même en l'absence de gêne respiratoire dès que l'asthme est modéré et persistant. Ils permettent de calmer et diminuer l'inflammation des bronches et par la suite d'espacer les crises. S'ils ne sont pas pris régulièrement, la fréquence et la gravité des crises augmentent, ainsi que le besoin de recourir aux médicaments de crise.

2.2.1. Le traitement de crise ou de secours (Les bronchodilatateurs) :

a.Bêta-2- mimétique ou Bêta-2-agoniste

Les Bêta-2-agonistes inhalés sont des agents très puissants utilisés uniquement pour soulager les symptômes de crise (toux, oppression thoracique, respiration sifflante et essoufflement). De loin, l'activité cruciale des Bêta mimétiques consiste à stimuler les récepteurs ß2 qui se trouvent au niveau des muscles lisses des voies respiratoires, qui permet à ce dernier de se détendre **[29].**

Il existe deux catégories de Bêta2-agoniste à savoir : Bêta2-Agoniste à courte durée d'action (SABA) et Bêta2-Agoniste à longue durée d'action (LABA).

b. Bêta2-Agoniste à Longue durée d'action

Le Bêta2-Agoniste à Longue durée d'action (LABA) confère un contrôle plus longue des symptômes de l'asthme, il est spécialement utile pour prévenir les symptômes nocturnes. En monothérapie, l'utilisation de BALA semble être moins efficace que les corticostéroïdes inhalés (CSI) **[29].**

c. Bêta2-Agoniste à Courte durée d'action

Le Bêta2-Agoniste à courte durée d'action (SABA) utilisés uniquement pour soulager les symptômes immédiat de crise **[30]** et sont les agents essentiel qui interviennent dans la prise en charge des symptômes d'asthme aigue. Cette catégorie médicamenteuse confère une bronchodilatation rapide par l'interaction avec des récepteurs ß2-adrénergiques spécifiques **[31].**

2.2.1.1. Les anti cholinergiques

Les médicaments anti cholinergiques (Tiotropium, glycopyronium et l'aclidinium) possédant un effet bronchodilatateur, qui joue le rôle des inhibiteurs compétitifs et réversibles des récepteurs cholinergiques de l'acétylcholine **[32].**

L'efficacité des antis cholinergiques particulièrement le Tiotropium aide à réduire le risque d'exacerbation et d'augmenter la fonction pulmonaire chez les patients atteints d'asthme mal contrôlé malgré l'utilisation de CSI et BALA **[33]**.

2.2.1.2. La théophylline

Depuis 1930, la théophylline apparentée de la caféine est utilisée dans le traitement de l'asthme **[34].**

La théophylline C'est le plus ancien des bronchodilatateurs utilisé comme un traitement pour les patients souffrant un asthme mal contrôlé **[35].**

2.2.2. Le traitement de fond ou Les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont conseillés en cas d'asthme persistant **[36].**

2.2.2.1. Les anti-inflammatoires stéroïdiens

a. Les corticoïdes

Parmi tous les traitements de l'asthme. Les corticoïdes stéroïdiens ou les corticostéroïdes sont les médicaments anti-inflammatoires les plus puissants et les plus efficaces. Les corticostéroïdes diminuent l'inflammation des voies respiratoires et, par conséquent, la production de mucus, ils permettent l'inhibition de l'infiltration des cellules inflammatoires dans les voies aériennes et les poumons, l'inhibition de la migration et l'activation des cellules inflammatoires, la diminution de la perméabilité vasculaire, l'élimination de la sécrétion des voies aériennes, le blocage de l'hyperréactivité des voies respiratoires, l'inhibition de la production de cytokines et permettent la promotion des conséquences des bêta-2-agonistes **[37].**

2.2.2.2. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

a. Les anti-leucotriène

Les Antileucotriènes diminuent l'inflammation causée par les leucotriènes (médiateurs inflammatoires), des substances contribuant à la réponse inflammatoire. Cette catégorie médicamenteuse semble ne pas avoir des effets secondaires sur la minéralisation osseuse et sur l'axe surrénalien **[38].**

b. Les anti-Ig

Les anticorps monoclonaux anti-IgE sont des médicaments destinée à traiter l'asthme allergique sévère. Ils peuvent se lier aux IgE sériques, mais aussi aux IgE membranaires des mastocytes et des lymphocytes B **[39].**

c. Les cromornes

Les cromoglycates sont des médicaments destinée à traiter l'asthme persistant léger. Les cromones permettent la suppression de la réponse inflammatoire induit par les IgE et l'inhibition des cellules inflammatoires. Cependant il est important de noter que cromonessont moins efficace que les CSI **[40].**

2.2.3. Autres traitements

a. Les antibiotiques

Macrolides utilisés pour traiter les infections associées L'asthme sévère, en plus de l'effet antimicrobien, peut également réduire les macrolides inflammation neutrophile **[41].**

3.2.4. Traitement de la crise d'asthme

Dans le traitement de la crise d'asthme, les bêta-2-agonistes sont les bronchodilatateurs les plus avantagés, du fait de leur rapidité et efficacité. La voie inhalée est prioritaire dans tous les cas à cause de son efficacité liée à la pénétration locale et de ses effets systémiques limités **[42].**

III. Zileuton :

Des recherches intensives dans le domaine des inhibiteurs de la synthèse de leucotriène (LT) ont conduit à la découverte de différentes classes de composés, agissant directement sur l'activité enzymatique de la 5-LOX ou sur d'autres enzymes ou protéines impliquées dans la biosynthèse des leucotriène LTs [par exemple les inhibiteurs de cPLA 2 ou de 5-LO -activation de la protéine (FLAP)]. Les inhibiteurs directs de l'enzyme 5-LOX ont été classés sur la base de leur mécanisme d'action. Idem, les inhibiteurs du ligand de fer chélates le fer du site actif, les inhibiteurs redox actifs découplent le cycle catalytique de la 5-LOXet les inhibiteurs non redox de type 5-LO entrent en compétition avec l'AA **[43]**. Cependant, la majorité de ces composés ont échoué dans les études précliniques et / ou dans les essais cliniques en raison de leur manque d'efficacité ou de leur toxicité. Jusqu'à maintenant, le ligand de fer zileuton (Figure 1) était le seul inhibiteur de la 5-LO qui pouvait entrer sur le marché **[44]**, mais son utilisation clinique est limitée par la toxicité hépatique.

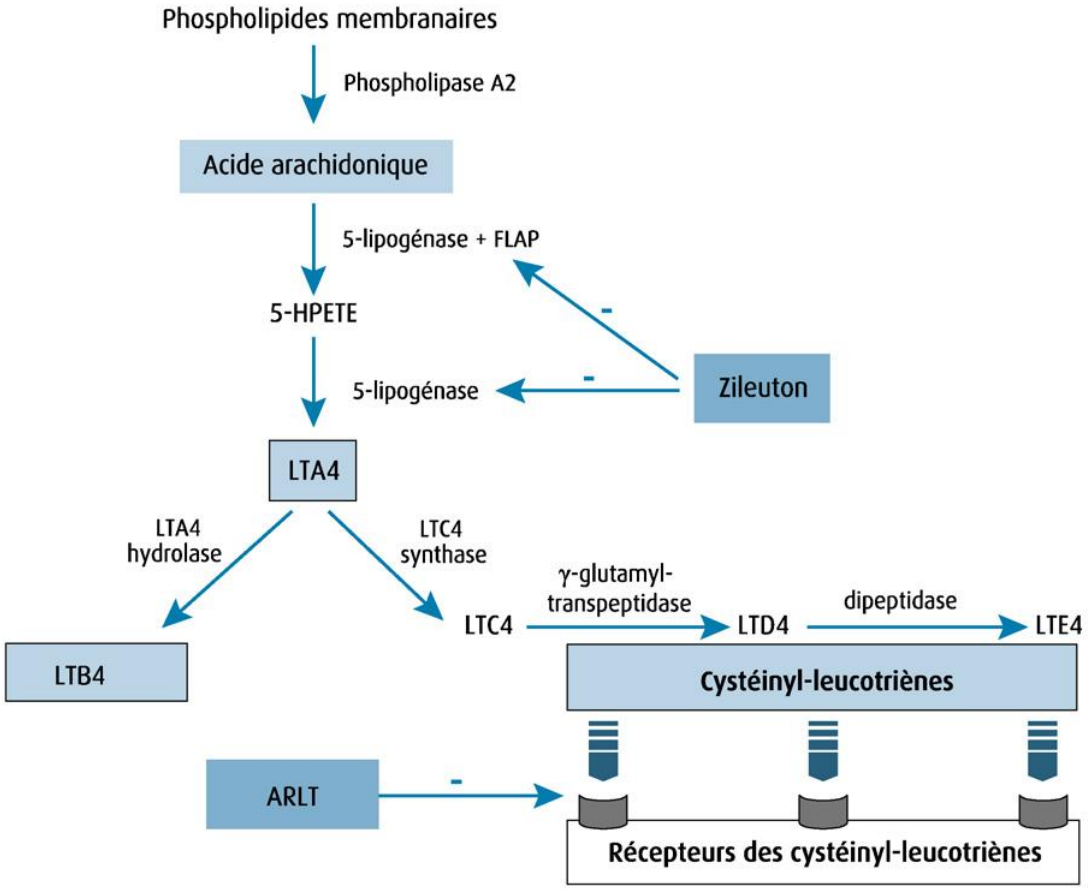


Figure 6: Voies de synthèse des leucotriènes et niveaux d'action des Antileucotriènes

1. Définition :

Zileuton **un benzothiophène N -hydroxyurée** est le premier et le seul inhibiteur de 5-LOX (Zyflo®) disponible sur le marché. Dans les essais cliniques, il a été démontré qu'il provoque des effets bronchodilatateurs, probablement liés à l'inhibition des cysLT et à leur action de tension dans les muscles lisses bronchiques. Cependant, le zileuton apporte aussi une amélioration chronique des fonctions des voies respiratoires, associée à une réduction des composants inflammatoires de l'asthme, tels que l'œdème, l'infiltration cellulaire et la production de mucus **[44]** et réduire la dose de glucocorticoïdes anti-inflammatoires nécessaire pour contrôler l'asthme. Notamment, bien que des doses de zileuton de 400 et 600 mg aient été également efficaces pour l'amélioration aiguë des fonctions pulmonaires, une amélioration significative de la fonction chronique des voies respiratoires n'a été observée qu'après l'administration quatre fois par jour de 600 mg de ce médicament **[45]**.Par conséquent, la dose orale recommandée de zileuton pour le traitement de l'asthme

est de 4 × 600 mg · jour -1 (ou 2 × 1200 mg · jour -1 pour les comprimés à libération prolongée récemment approuvés, Zyflo CR®), pour une dose quotidienne totale de 2400 mg, entraînant des concentrations plasmatiques maximales d'environ 5 µg · ml −1 (correspondant à environ 21 µM) et une exposition systémique (aire moyenne sous la courbe) de 19,2 µg · h · ml −1. Bien qu'une liaison de 93% aux protéines plasmatiques doive être prise en considération, ces concentrations plasmatiques dépassent nettement les valeurs de CI 50 pour la 5-LOX dans le sang (soit 0,5 à 1 µM), et la contribution des effets sur d'autres cibles à l'ensemble l'action de zileuton est une possibilité raisonnable.

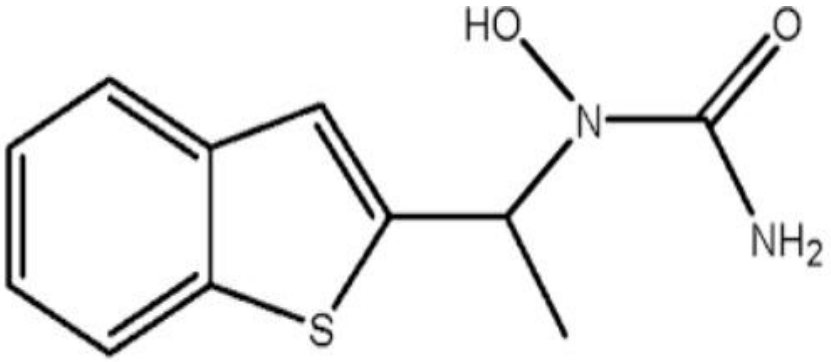


Figure 7 : le médicament zileuton (Zyflo)

2. Effet indésirables :

Zileuton présente une toxicité hépatique (provoquent une élévation potentielle des enzymes hépatiques) et, par conséquent, son utilisation clinique est limitée par la nécessité de surveiller les taux d'enzymes hépatiques(les enzymes hépatiques) pour cette raison, zileuton est contre-indiqué chez les patients présentant une maladie hépatique active ou une élévation persistante des enzymes de la fonction hépatique supérieure à trois fois la limite supérieure de la normale. Fait intéressant, la lésion hépatique causée par le zileuton semble être un effet toxique direct qui n'est pas lié à l'inhibition du l'enzyme 5-LOX **[46]**.

Zileuton peut provoquer des événements neuropsychiatriques, notamment des troubles du sommeil et des changements de comportement. Les patients doivent être avisés d'informer leur fournisseur de soins de santé si des événements neuropsychiatriques surviennent lors de l'utilisation de Zyflo ou Zyflo CR

Donc, la recherche de nouveaux inhibiteurs naturels de la 5-LOX a une grande importance pour remplacer ce médicament.

Ces inhibiteurs sont les glucosinolates qui ont montré expérimentalement une inhibition des lipoxygénase **[47]**.

IV. Glucosinolates :

1- Introduction

Au début du XIXe siècle, les premières observations ont été faites sur les propriétés uniques des glucosinolates et des isothiocyanates (connu sous le nom d'huiles de moutarde) ont été signalés, tels que résultats des efforts pour comprendre l'origine chimique de la saveur piquante des graines de moutarde **[48]**. Ensuite au moins 120 glucosinolates différents ont été isolés et identifiés dans l'ordre botanique des Brassicales (Brassicaceae). La famille des **Brassicaceae**, également appelée crucifères, comprend environ 375 genres et environ 3 200 espèces, y compris de nombreuses plantes économiquement importantes telles que les légumes-feuilles et racines, les oléagineux et les condiments, et la plante modèle Arabidopsisthaliana. Les légumes Brassicaceae sont largement cultivés, avec de nombreux genres, espèces et cultivars dont Brassicara pa (chou chinois, moutarde chinoise, bokchoy et navet), B. oleracea (chou, brocoli, chou-fleur, chou frisé, choux de Bruxelles et chou-rave), B. napus (colza et rutabaga), B. juncea (vert moutarde) et Raphanussativus (radis). Les glucosinolates, métabolites secondaires trouvés dans les Brassicaceae et les familles apparentées, ont trois groupements: un groupement β thioglucose, un groupement oxime sulfoné et une chaîne latérale d'aglycone variable dérivée d'un acide α-aminé[3–6].

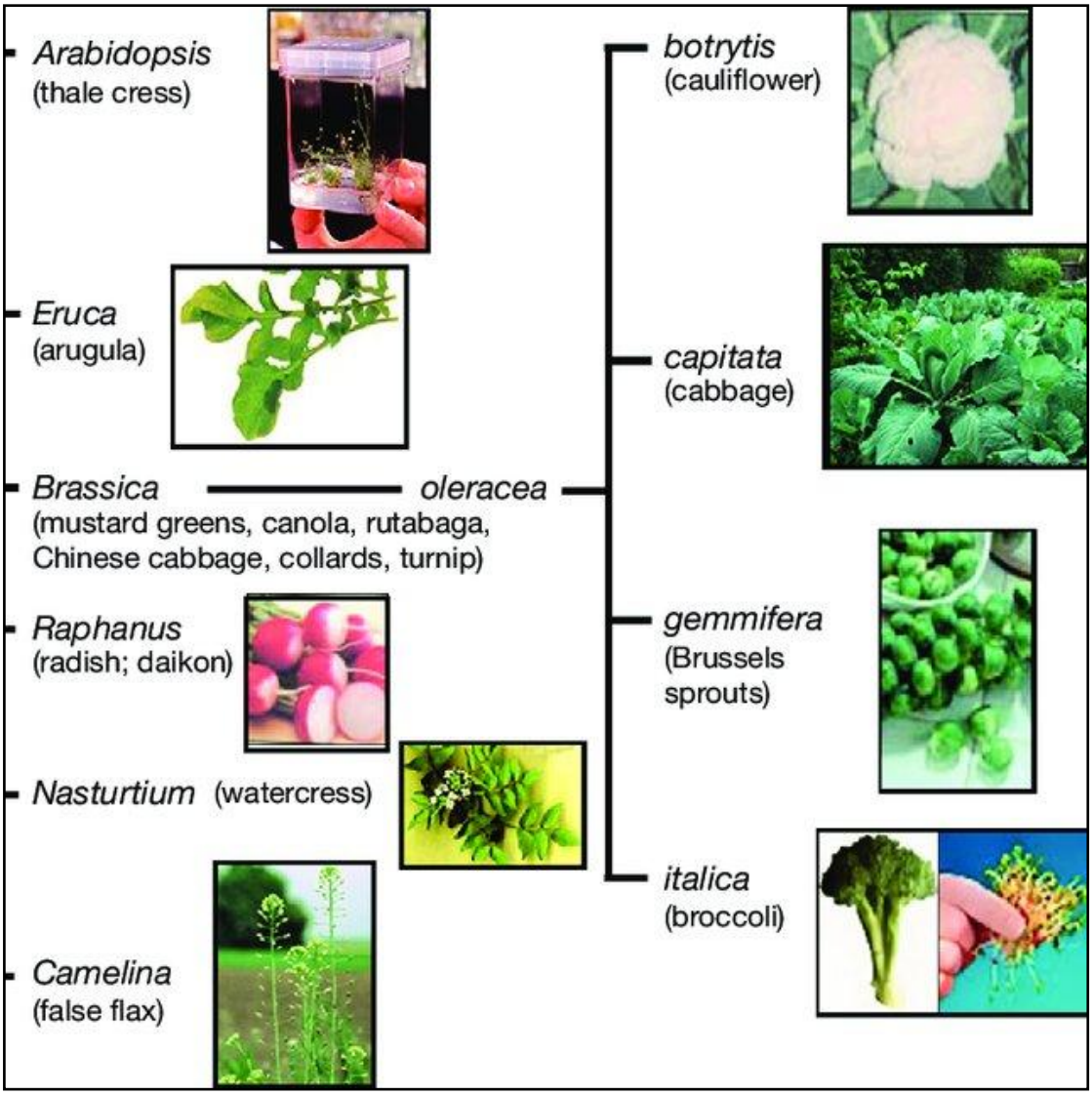


Figure 8 : famille du Brassicaceae

Le système de santé de la personne peut être amélioré par la famille des **Brassicaceae** grâce à sa teneur en fibres, en vitamines et en photochimie de l'ordre des Brassical en et en raison de la présence de composés à forte teneur en soufre dans leurs métabolites bioactifs. Les effets sur les voies génétiques peuvent être améliorés par ces nutriments qui sont utiles pour renforcer l'immunité, permettre la santé des os et ont également une activité anti-inflammatoire et anticancéreuse. Ainsi, la consommation de ces extraits de plantes par les humains et les animaux a l'avantage de repousser in vivo les dommages oxydatifs liés aux maladies. Ainsi, la consommation de feuilles de la famille des **Brassicaceae** signifie une nourriture naturellement disponible avec une activité antimicrobienne potentielle. Les composés présents dans cette famille ont plusieurs effets bénéfiques en raison de leurs

caractéristiques chimiques et actions physiologiques particulières de dans. D'autres études pharmacologiques in vitro ou in vivo pour les composés bioactifs programmés des légumes Brassica ont montré un large spectre d'activités biologiques, y compris des activités **anti-inflammatoires**.

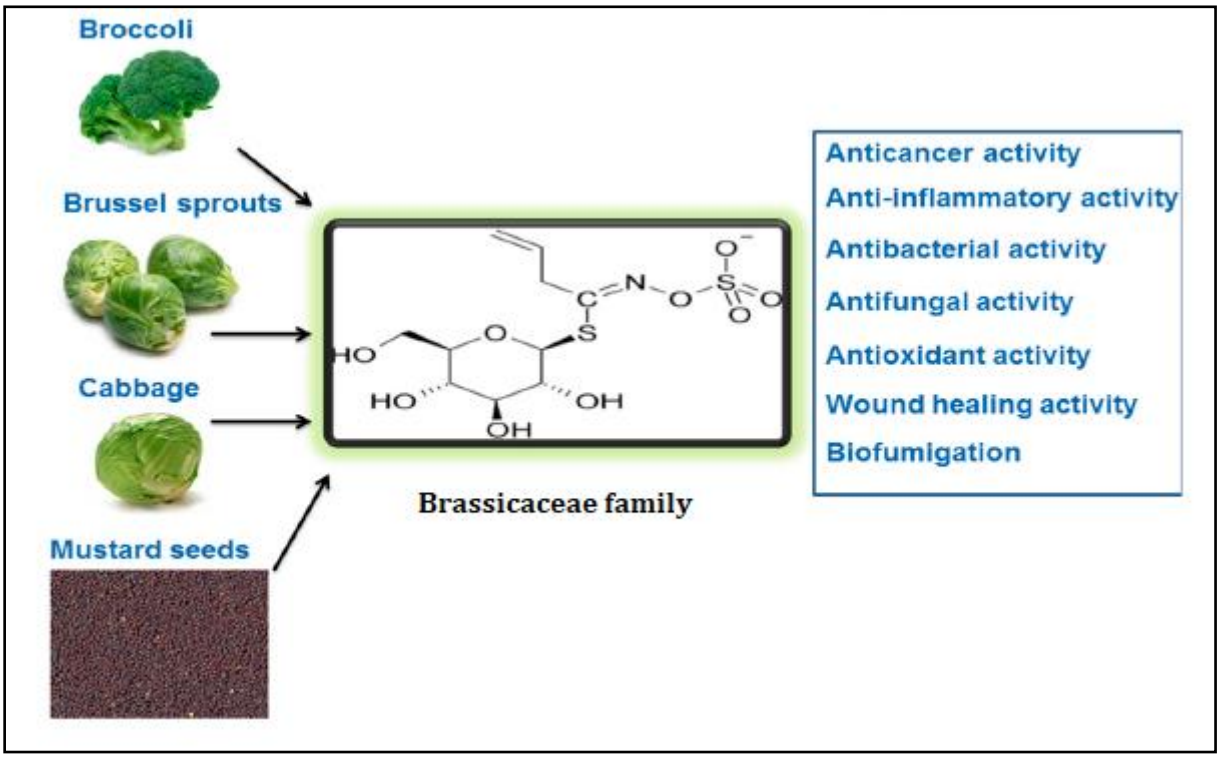


Figure 9 : effet thérapeutique de la famille du Brassicaceae

Dans le présent chapitre, on se propose un aperçu sur les travaux réaliser dans ce contexte, ceci afin de mettre en évidence l'intérêt donné aux processus inflammatoire du 5-Lipoxygénase et anti-inflammatoire du Brassicaceae**:**

Ramirez et ses collaborateurs **[49]** dans leur travail ont examiné la fonctionnalité et les perspectives futures des Brassicaceae en montrant que :

i- Les légumes Brassicaceae sont des cultures importantes consommées dans le monde entier en raison de leur saveur unique et de leurs propriétés

fonctionnelles largement reconnues, qui sont directement liées à leur composition photochimique.

ii- Les isothiocyanates (ITC) sont les composés les plus caractéristiques, considérés comme responsables de leur goût piquant. Outre l'ITC, ces légumes sont également riches en caroténoïdes, phénoliques, minéraux et vitamines.

iii- Par conséquent, le profil photochimique de Brassica en fait une source naturelle idéale pour améliorer la qualité nutritionnelle des aliments manufacturés.

iv- En ce sens, l'inclusion d'ingrédients fonctionnels dans les matrices alimentaires présente un intérêt croissant.

Jasmine Speranza et ces co-auteurs **[50]** ont étudié le Brassicaceae à la fois d'un point de vue photochimique et biologique. Ces études scientifiques modernes in vitro et in vivo montrent qu'es ces espèces ont des activités anti-inflammatoires, anti tumorales, antimicrobiennes, antivirales, analgésiques et antioxydants prouvées. La composition photochimique du Brassicaceae a été minutieusement étudiée et il a été prouvé que la plante contenait de nombreux composés biologiquement actifs précieux, y compris plusieurs alcaloïdes, parmi lesquels la tryptanthrine, l'indirubine, l'indolinone, les composés phénoliques et les polysaccharides ainsi que les glucosinolates, les caroténoïdes, les constituants volatils et les acides gras. Cet article fournit un aperçu botanique et ethnobotanique général qui résume les connaissances à jour sur la photochimie et les propriétés biologiques de cette plante précieuse afin de soutenir son potentiel thérapeutique. En outre, les études biotechnologiques sur Brassicaceae, qui se sont principalement concentrées sur les cultures de racines velues pour la production accrue de flavonoïdes et d'alcaloïdes ainsi que sur l'établissement de cultures de pousses et de protocoles demicro- propagation, ont été examinées. Ils fournissent des informations sur les futures perspectives de recherche.

Zhang et ces collaborateurs **[51]** ont collecté un ensemble de données comprenant 220 5-LOX humains inhibiteurs de classification. Une carte auto-organisée (SOM), un support vecteur machine (SVM), et un perceptron multicouche (MLP) a été utilisé pour construire

des modèles avec des descripteurs pour classer les inhibiteurs 5-LOX en actifs et ceux faiblement actifs. Les empreintes digitales MACCS ont été utilisées dans ce processus de construction de modèles. La précision (Q) et la corrélation de Matthews coefficient (MCC) du meilleur modèle SOM (Model1A) étaient de 86,49% et 0,73 sur l'ensemble de test, respectivement. Le Qat MCC du meilleur modèle SVM (modèle 2A) était de 82,67%et 0,64 sur l'ensemble de test, respectivement. Le Q et le MCC du meilleur modèle MLP (modèle 3B) étaient de 84,00% et 0,67 sur l'ensemble de test, respectivement. De plus, 180 inhibiteurs avec des bios activités mesurées par la méthode de fluorescence ont en outre été utilisés pour une prédiction quantitative. Régression linéaire multiple (MLR) et les algorithmes SVM ont été utilisés pour construire des modèles pour prédire les valeurs IC50. Les coefficients de corrélation (R) du MLRMengdi Zhang et ZhonghuaXia y ont contribué à parts égales travail. Matériel supplémentaire électronique La version en ligne de ce l'article **[51]** contient des matériels, qui sont disponible pour les utilisateurs autorisés. Le modèle (modèle Q1) et le modèle SVM (modèle Q2) étaient 0,72 et 0,74 sur l'ensemble de test, respectivement.

Dans la présente étude **[52]**, des dérivés de coumarine 7-substitués ont été synthétisés en utilisant diverses amines aromatiques et hétérocycliques, et évalués in vivo pour l'activité anti-inflammatoire et analgésique, et pour le risque ulcèrogène. Les composés les plus actifs ont été évalués in vitro pour l'inhibition de la 5-lipoxygénase (5-LOX). Une étude d'amarrage a été réalisée pour prédire l'affinité de liaison et l'orientation au site actif de l'enzyme. L'activité anti-inflammatoire et analgésique in vivo et l'étude d'inhibition de l'enzyme 5-LOX in vitro ont révélé que les composés 33 et 35 sont les composés les plus puissants dans toutes les méthodes de criblage. Une étude cinétique in vitro de 35 a montré un type d'inhibition mixte ou non compétitif avec l'enzyme 5-LOX. La présence d'un groupe single bondOCH3 en 35 et d'une liaison simple Cl en 33 en position C6 du cycle benzothiazole s'est avéré des substitutions très importantes pour une activité puissante.

Mitra et ses collaborateurs **[53]** ont montré que la surproduction de médiateurs lipidiques inflammatoires dérivés de l'acide arachidonique contribue à l'asthme et aux maladies cardiovasculaires, entre autres pathologies. Par conséquent, l'enzyme qui initie la synthèse des leucotriènes pro-inflammatoires, la 5-lipoxygénase (5-LOX), est une cible pour la conception de médicaments. La structure cristalline de la 5-LOX a révélé un site actif entièrement encapsulé, ainsi le point d'entrée du substrat n'est pas connu. Nous avons

demandé si un motif structurel, un «bouchon» présent dans la 5-LOX mais absent dans d'autres lipoxygénases de mammifères, pouvait être éjecté pour permettre l'accès au substrat. Nos résultats indiquent que la réduction du volume de liège facilite l'accès au site actif. Cependant, si l'entrée du liège dans le site est obstruée, l'activité enzymatique est considérablement compromise. Les résultats soutiennent un modèle dans lequel le «bouchon» qui protège le site actif en l'absence de substrat sert de portail du site actif, mais l'acide aminé «bouchonnant» Phe-177 joue un rôle critique dans la fourniture d'un site actif entièrement fonctionnel. Ainsi, la métaphore la plus appropriée pour ce motif structurel est un capuchon «twist-and-vers». Des données de mutagenèse supplémentaires sont cohérentes avec un rôle pour His-600, profondément dans la cavité allongée, dans le positionnement du substrat pour la catalyse.

Pergola et ses collaborateurs **[54]** ont effectué Ici, nous avons étudié l'interférence par la tryptanthrine de 5-LOX la formation du produit dans les systèmes cellulaires et acellulaires, en tenant compte des composants critiques pertinents pour la pharmacologie in vivo des leucotriènes LT (médiateurs pro-inflammatoires produits) par la 5-lipoxygénase (5-LO). Inhibiteurs de synthèse. Nous avons trouvé inhibition marquée de la formation de LT par la tryptanthrine chez les neutrophiles, ce qui est en accord avec les résultats précédents **[55]**. Cependant, la tryptanthrine ne s'est pas révélée être un inhibiteur direct de 5-LO, et il n'a pas non plus inhibé voies de signalisation et / ou facteurs connus pour réguler la 5-LOX formation du produit dans les cellules intactes. Ces caractéristiques suggèrent un nouveau mécanisme moléculaire pour son interférence de **5**-LOX formation de produit différente des autres inhibiteurs caractérisés de la synthèse de LT tels que les inhibiteurs de cPLA2, **5-LO** ou FLAP.

2. Structure des glucosinolates :

La structure des glucosinolates a été proposée pour la première fois par **Gadamer [56]** de au XIXe siècle qui a supposé, que la chaine latérale R est liée à l'atome d'azote (a figure 3). Malgré quelques difficultés, cette structure à été acceptée comme exacte jusqu'en 1956, date à laquelle, Ettlinger **[57]** qui a suggéré la bonne structure (b, figure3). La structure a été confirmée l'année suivante la synthèse du benzylglucosinolate(glucotropaeoline, R=CH_2Ph) **[58]**.

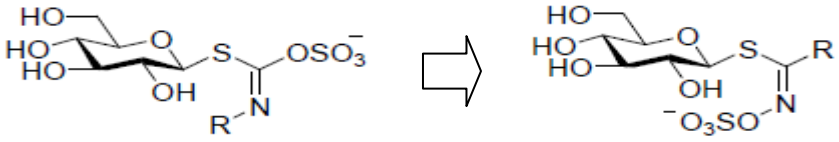


Figure 10 : la structure de glucosinolate

La contribution dans des glucosinolates présente un assemblage de trois entités structurales remarquables :

- Une entité glycosidique (unité1-thio-D-glucopyranosyle, toujours de la configuration β).
- Une entité anionique (fonction anomériquethiohydroximate O-sulfatée, Dans la plus part des cas, il associée à un cation de potassium pour les glucosinolates
- Une entité relativement hydrophobe (unechaine latérale R).

3. Biosynthèse :

Les glucosinolates sont synthétisés par les plantes des familles des crucifères à partir des acides aminés (alanine, valine, leucine, isoleucine, phénylalanine, méthionine, tyrosine et tryptophane, ainsi que certains homologues à longue chaine de la méthionine et phénylalanine **[59]**

Les glucosinolates sont regroupés en trois classes sellons les acides aminés à partir des quels ils sont bio-synthétisés.

- La première classe : les glucosinolates aliphatiques (formé à partir des acides aminés aliphatiques).
- La deuxième classe : les glucosinolates aromatiques (formé à partir de la phénylalanine ou la tyrosine).
- La troisième classe : les glucosinolates indoliques (formé à partir du tryptophane) **[60]**.

a. myrosinase :

Dans toutes les plantes contenants des glucosinolates la présence de cette espèce s'accompagne toujours de la présence d'une enzyme spécifique, la myrosinase (une

thioglucoside glucohydrolase EC.3.2.1.147) qui est la seule glucosidase d'hydrolyser ces composés thiosaccharidiques. La relation enzyme-substrat unique est partie intégrante des dispositifs de défense de ces plantes contre diverses attaques, par la production de composés bioactifs (fongicides, bactéricides et insecticides **[61]**.

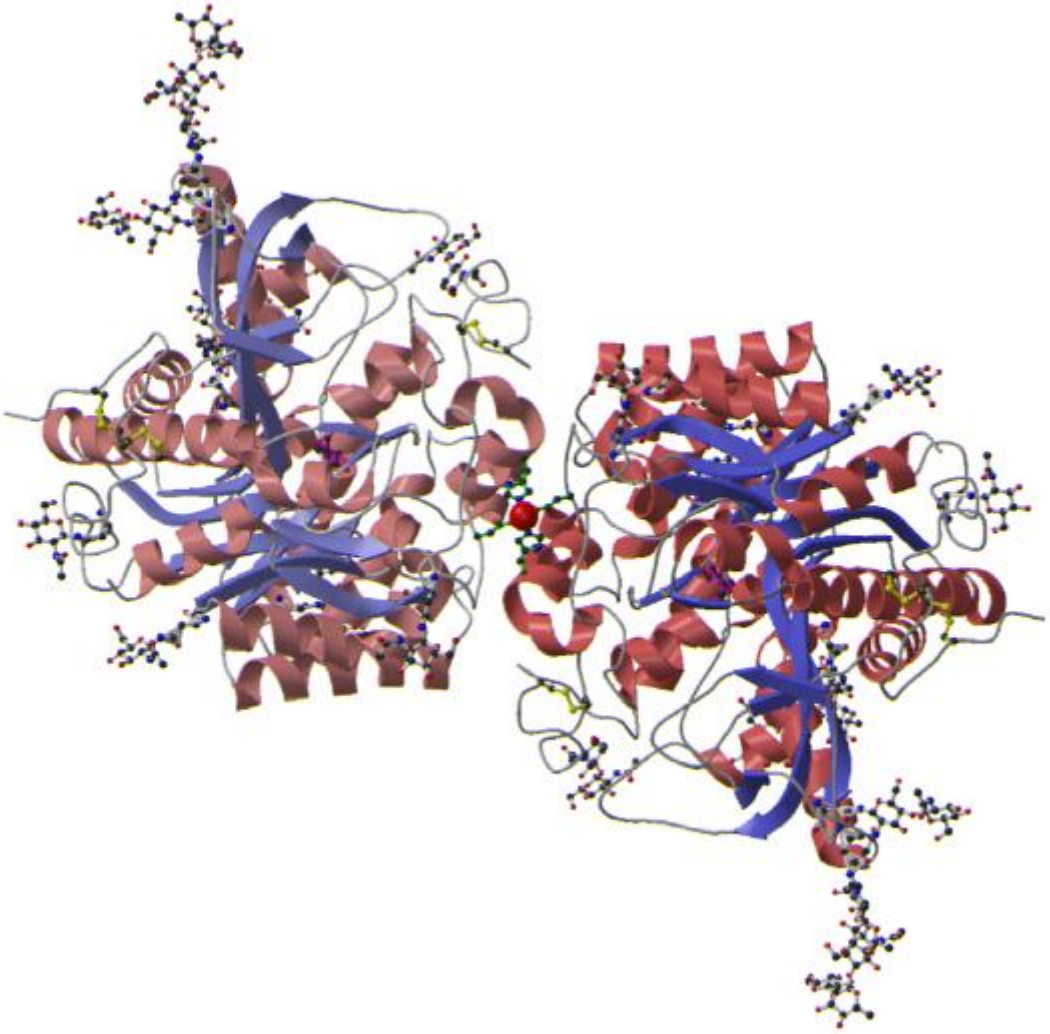


Figure 11 : Enzyme Myrosinase

b. Hydrolyse des glucosinolates :

L'enzyme myrosinase catalyse l'hydrolyse de la liaison soufre-glucose pour libérer le glucose et un intermédiaire sulfaté (figure 4). Lequel par élimination de l'ion sulfate subit un réarrangement spontané, et forme divers composés : des isothiocyanates (principalement), des nitriles, des amines, des thiocyanates, l'anion thiocyanate, des épithionitriles, et des oxazolidine thiones. L'activité de ces enzymes nécessite une température d'environ 55°Cet

un PH compris entre 4 et 9. Le produit final de dégradation enzymatique dépend de la nature de chaine latérale et des conditions de réactions.

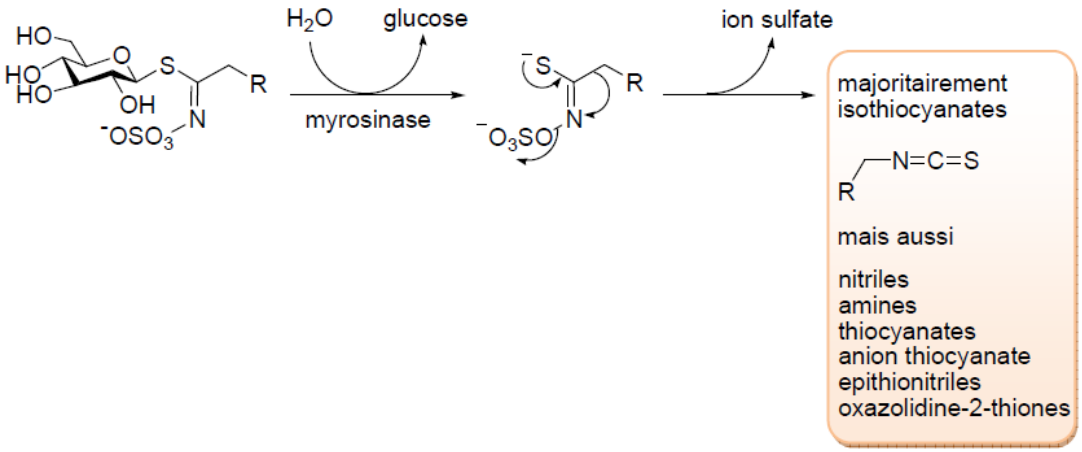
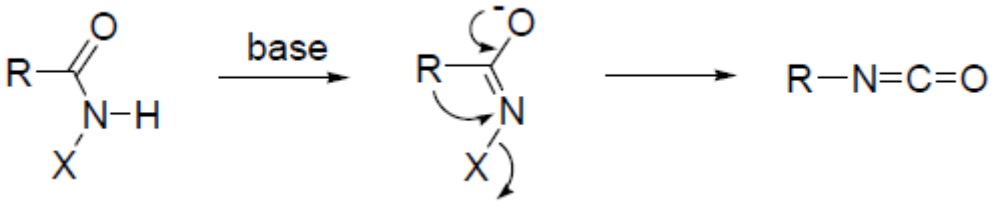
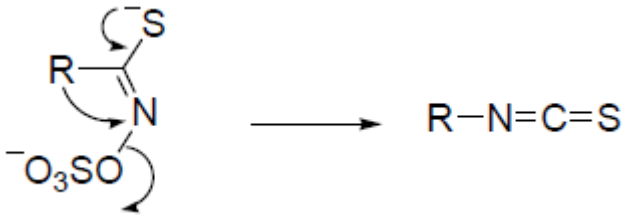


Figure 12 : hydrolyse des glucosinolates

Le mécanisme de formation des isothiocyanates suite le réarrangement de Lossen conduisant à la formation des isocyanates **[62,63].**



Dans le cas des glucosinolates, cela conduit à la formation d'isothiocyanates.



Habituellement, entre PH 6 et 7, les produits de dégradation enzymatique sont les isothiocyanates stables, sauf pour les glucosinolates ayant une chaine latérale R β-hydroxylée et les glucosinolate sindoliques.

4. Classification des glucosinolates :

Les glucosinolates sont classé selon la compostions de groupe radical(R)

- **A.** chaîne soufrée (Alkyle thio alkyle). C'est le groupe le plus important.

  - CH_3-S-$(CH_2)_n$- pour n de 2 à 11, par ex. n=3 R=3-(Méthylethio)propyle donne la glucoibervérine.
  - CH_3-SO-$(CH_2)_n$- pour n de 3 à 11, par ex. n=3 R=3-(Méthylesulfinyle)propyle donne la glucoibérine,
    - autre ex. dans le superbrocoli "Beneforte" n=4 R=4-(Methylesulfinyle)butyle donne la glucopharanine
  - CH_3-SO_2-$(CH_2)_n$- pour n de 3 à 10, par ex. n=3 R=3-(Méthylesulfonyle)propyle donne la glucocheiroline
  - chaîne soufrée avec hydroxy- ou oxo-
- **B**. chaîne aliphatique linéaire, $CH_3(CH_2)_n$- pour n=0 à 19, par ex. n=0 R=méthyle donne la glucocapparine, n=1 R=éthyle donne la glucolépidiine etc.
- **C**. chaîne aliphatique branchée, par ex. R=1-Méthyle éthyle donne la glucoputranjivine, R=1-Méthyle propyle donne la glucococochléarine etc.
- **D**. alcène, par ex. R=2-propényle donne la sinigrine
- **E**. chaîne alcoolique, par ex. R=2-Hydroxy-éthyle
- **F**. chaîne linéaire avec carbonyle, par ex. R=4-oxoheptile donne la glucocapanguline
- **G**. hydrocarbure aromatique, par ex. R=Benzyle donne la glucotropaéoline, R=4-Hydroxybenzyle donne la (gluco)sinalbine
- **H**. benzoate, par ex. R=2-Benzoyloxy-1-méthyléthyle donne la glucobenzosisymbrine
- **I**. indole, par ex. R=Indol-3-ylméthyle donne la glucobrassicine
- **J**. multiglycosylé et autres, par ex. R=4-(alpha-L-Rhamnopyranosyloxy)benzyle, R=3-Méthoxycarbonylpropyle donne la glucoerypestrine**[7]**.

References:

[1] Luca Zoia et col, Understanding the radical mechanism of lipoxygenases using 31P NMR spin trapping, Bioorganic & Medicinal Chemistry, (2011), **10:** 10-16.

[2] C. Charlier, C.Michaux, European *Journal of Medicinal Chemistry* (2003), **38**: 645-659.

[3]CheanHui Ng et col, Synthesis and Docking Studies of 2,4,6-Trihydroxy-3- Geranyla cetophenone Analogs as Potential Lipoxygenase Inhibitor, Molecules (2014), **19:** 11645-11659.

[4] Takashi Matsumoto ET col, Molecularcloning and aminoacid sequence of human 5-lipoxygenase, National Academy of Sciences (1988), **85:** 26-30.

[5] OlofRadmark et col, 5-Lipoxygenase: regulation of expression and enzyme activity, TRENDS in Biochemical Sciences, (2007),**32:** 323-341.

[6]Carola. R. etBengt S. Reversible calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5 –lipoxygenase, Nati. Acad. Sci. (1987), **84:** 7393-7397.

[7] D. Schamburg · D. Stephan (Eds.), Enzyme Handbock (Class 1.13-1.97: Oxidoreductases), Springer-Verlag Berlin Haideiberg, 1994, **8**: 159-166.

[8] Jason Hemak · David Gale · Thomas G. Brock, Structural characterization of the catalytic domain of the human 5-lipoxygenase enzyme, J Mol Model (2002) **8**:102–112.

[9]BOUDERSA Y, Etudes des mécanismes d'interactions des inhibiteurs de La 5-LOX, mémoire de Master, Université des frères Mentouri Constantine, 2016.

[10]V. R. Khayrullina et col, New Inhibitors of 5_Lipoxygenase Catalytic Activity Based on 2_ (3_Methylphenyl)propionic Acid and 4_Substituted Morpholine Derivatives, Biochemistry (Moscow),(2014), **79**: No. 4,376-384.

[11] SCHWARTZ, Ketty, *Inflammations et maladies: clés de compréhension*. 2011. Inserm, 74p.

[12] Dallegri F and Ottonello L (1997). Tissu injury in neutrohilic inflammation. Inflame Res. 10, 382-391.

[13] Whyte M (2000). Neutrophils.In Cellular mechanisms in airways inflammation. Page CP, Banner KH, Spina D Eds, Birkhaseur (Berlin), pp: 125 -146

[14] Botting RM and Botting JH (2000). Pathogenesis and mechanism of inflammation and pain: An overview. Clin Drug Investig.19, 1 -7.

[15] Rankin JA (2004). Biological mediators of acute inflammation. AACN Clin Issues, 15, 3-17.

[16] Blake DR, Bodamyali T, Stevens CR and Winyard PG (2000).Inflammation. In Free radicals and inflammation. Winyard PG, Blake DR and Evans CH Eds, Birkhauser (Berlin), pp: 11 -17.

[17] Anzai T, Yashikawa T, Kaneko H, Maekawa Y, Iwanag S, Asakura Y and Ogawa S (2004). Association between serum C-reactive protein elevation and left ventricular thrombus formation after anterior myocardial infection.Chest. 125, 384-389.

[18] Regnault JP (1992). Reactions immunitaires. In Agression et défense du corps humain. Vigot, (Paris), pp: 202 -225.

[19] Nathan C (2002). Points of control in inflammation.Nature.420 (6917), 846 -852.

[20] Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001, *294*, 1871-1875.

[21]Goodman, L. S.; Gilman, A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Molinoff, P. B.; Ruddon, R. W. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics; Ninth Editioned.; McGraw-Hill: New York, 1996; pp 1905.

[22] Capdevila, J. H.; Harris, R. C.; Falck, J. R. Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism. *Cell Mol Life Sci*2002, *59*, 780-789.

[23] Sarkis, A.; Lopez, B.; Roman, R. J. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and

epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. *CurrOpinNephrolHypertens*2004a, *13*,

205-214.

[24] Sarkis, A.; Roman, R. J. Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in

Hypertension. *Curr Drug Metab*2004b, *5*, 245-256.

[25]. Devouassoux G. (2017). Asthme, servisse de pneumologie, Hôpital de la Croix-Rousse.

[26]. Kelly L.-A., Jones S.-C., Eval M., Mullan J. (2012). Asthma self-management in adults: A review of current literature, Centre for Health Initiatives, University of Wollongong, Australia Graduate School of Medicine, University of Wollongong.).

[27] Quirce S, Dominguez-Orteza J, Barranco P. (2015). Anticholinergics for traitement of asthma.

[28].GINA, 2016.Guide de poche pour le traitement et la prévention de l'asthme (pour les adultes et les enfants de plus de 5 ans).

[29] Dirkje Postma, Huib Kerstjens, Nick H. and Hacken (2008). Retracted article: Inhaled corticosteroids and long-acting beta-agonists in adult asthma: a winning combination in all?

[30] Chung K.F., Godard P., Adelroth E., Ayres J., Barnes N., Barnes P., Bel E., Burney P.,Chanez P., Connett G., Corrigan C., De Blic J., Fabbri L., Holgate S.T., Ind P., Joos G.,Kerstjens H., Leuenberger P., Lofdahl C-G., Mckenzie S., Magnussen H., Postma D.,Saetta M., Salmeron S., Silverman M. and Sterk P. (1999). Difficult/therapy-resistant asthma.

[31] MuireanniChroinin, IlanaGgreenstone, Toby, Jlasserron and Francine Ducharme., (2013). Addition of long-acting bêta-2-agonists to inhaled steroids as first line therapy for persistent asthma in steroid-naïve adults and children.

[32] kayna -Quirce S, Dominguez-Orteza J, Barranco P. (2015). Anticholinergics for traitement of asthma.

[33] Akihiko Tanaka, MD, PHD. (2015). Past, Present and Future Therapeutics of Asthma: A Review.

[34]. -Barnes PJ. (2011). Biochemical basis of asthma therapy

[35]. -Cosio BG. and Sariano JB. (2009). Theophyline again?Reasons for believing.

[36] Bellectose V., Devouassoux G.et Pacheco Y. (2011). Place de monteluast dans le traitement de l'asthme persistant léger à modéré.

[37] MasakazuIchinose, HisatoshiSugiura, HiroyukiNagase, Masao Yamaguchi, HiromasaInoue, HironoriSagara, Jun Tamaoki, YujiTohda, Mitsuru Munakata, Kohei ,Yamauchi and Ken Ohta (2017). Japanese guidelines for adult asthma 2017.

[38] Bhupendrasinh F., Chauhan E., Francine M. and Ducharme (2014). Anti-leukotriene agents compared to inhaled corticosteroids in the management of recurrent and/or chronic asthma in adults and children.

[39] Sebastian Heck, Juliane Nguyen, Duc-Dung Le, Robert BalsetQuoc Thai Dinh (2016). Pharmacological Therapy of Bronchial Asthma: The Role of Biologicals.

[40]. Green R.H., Brightling C.E., Pavord I.D. and Wardlaw A.J. (2003). Management of Asthma in adults: current therapy and future directions.

[41]. Rafael Firsztet Monica Kraft (2015). Pharmacotherapy of severeasthma.

[42] L'Her (2002).Révision de la troisième conférence de consensus en réanimation et médecine d'Urgence de 1988 : prise en charge des crises d'asthme aigues graves de l'adulte et de l'enfant (à l'exclusion du nourisson).

[43] : Pergola C, inhibiteurs de Werz O. 5-lipoxygénase: un examen des développements récents et des brevets. Expert OpinTher Pat. 2010; 20 : 355–375.

[44] : Drazen JM, Israël E, O'Byrne PM. Traitement de l'asthme avec des médicaments modifiant la voie des leucotriènes. N Engl J Med. 1999; 340 : 197–206.

[45] : Liu MC, Dubé LM, Lancaster J.Effets aigus et chroniques d'un inhibiteur de la 5-lipoxygénase dans l'asthme: un essai multicentrique randomisé de 6 mois. Groupe d'étude Zileuton. J Allergy Clin Immunol. 1996; 98 : 859–871.

[46]: Beierschmitt WP, McNeish JD, Griffiths RJ, Nagahisa A, Nakane M, Amacher DE. Induction des enzymes hépatiques microsomales métabolisant les médicaments par les inhibiteurs de la 5-lipoxygénase (5-LO): études chez le rat et la souris knock-out 5-LO. Toxicol Sci. 2001; 63: 15–21.

[47]: Jed W. Fahey *, Amy T. Zalcmann 1, Paul Talalay; The chemical diversity and Distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, 2000.

[48]: Fahey J.W., Zalcman A.T., Talalay P., *Phytochemistry*, **2001**, 56, 5-51

[49]: Ramirez, D.; Abellán-Victorio, A.; Beretta, V.; Camargo, A.; Moreno, D. A. Functional Ingredients FromBrassicaceae Species: Overview and Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.***2020**, *21* (6), 1998.

[50]: Speranza, J.; Miceli, N.; Taviano, M. F.; Ragusa, S.; Kwiecień, I.; Szopa, A.; Ekiert, H. IsatisTinctoria L.(Woad): A Review of Its Botany, Ethnobotanical Uses, Phytochemistry, Biological Activities, and Biotechnological Studies. *Plants***2020**, *9* (3), 298.

[51]: Zhang, M.; Xia, Z.; Yan, A. Computer Modeling in Predicting the Bioactivity of Human 5-Lipoxygenase Inhibitors. *Mol. Divers.***2017**, *21* (1), 235–246.

[52]: Srivastava, P.; Vyas, V. K.; Variya, B.; Patel, P.; Qureshi, G.; Ghate, M. Synthesis, Anti-Inflammatory, Analgesic, 5-Lipoxygenase (5-LOX) Inhibition Activities, and Molecular Docking Study of 7-Substituted Coumarin Derivatives. *Bioorganic Chem.***2016**, *67*, 130–138.

[53]: Mitra, S.; Bartlett, S. G.; Newcomer, M. E. Identification of the Substrate Access Portal of 5-Lipoxygenase. *Biochemistry***2015**, *54* (41), 6333–6342.

[54]: Pergola, C.; Jazzar, B.; Rossi, A.; Northoff, H.; Hamburger, M.; Sautebin, L.; Werz, O. On the Inhibition of 5-lipoxygenase Product Formation by Tryptanthrin: Mechanistic Studies and Efficacy in Vivo. *Br. J. Pharmacol.***2012**, *165* (3), 765–776.

[55]: Danz, H.; Stoyanova, S.; Thomet, O. A.; Simon, H.-U.; Dannhardt, G.; Ulbrich, H.; Hamburger, M. Inhibitory Activity of Tryptanthrin on Prostaglandin and Leukotriene Synthesis. *Planta Med.***2002**, *68* (10), 875–880.

[56]: Gadamer J. *Berichte Deutschen Chemischen Gesselschaft*, **1897**, 2322-2327.

[57]: Ettlinger M.G., Lundeen A.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 4172-4173.

[58]: Ettlinger M.G., Lundeen A.J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, *79*, 1764-1765

[59]: Kliebenstein D.J., Kroymann J., Mitchell-Olds T. *Current Opinion in Plant Biology*, **2005**, *8*, 264-271.

[60]: Halkier B.A., Du L.C., *Trends Plant. Sci.*, **1997**, *2*, 425-431.

[61] : Deimante CERNIAUSKAITE ; GLUCOSINOLATES - MYROSINASE : SDeimante CERNIAUSKAITEYNHÈSE DE SUBSTRATS
NATURELS ET ARTIFICIELS, INHIBITEURS ET PRODUITS DE TRANSFORMATION ENZYMATIQUE ; Univ technologique de Kaunas ,201013

[62]: Jie Jack Li, *Name Reactions 2nd Edition, Springer Ed.*, 2003, 240.

[63]: Gil V., MacLeod A.J., *Phytochemistry*, **1980**, *19*, 2547-2551.

Résultats et Discussion

I. Introduction

Le docking est une méthode très importante pour étudier et comprendre les réactions biologiques et par suite la conception de médicaments. Les méthodes du docking moléculaire sont basées sur le concept ‘’clé-serrure’’.

Ce travail consiste à étudier théoriquement (par modélisation moléculaire) les interactions entre 12 inhibiteurs et l’enzyme 5-lipoxygénase avec un seul élément de Co-cristallisation.

Premièrement, Nous avons, schématiser un organigramme résume tous les étapes de calcul qu`on a effectué pendant ce travail :

1-Protocol de calcul :

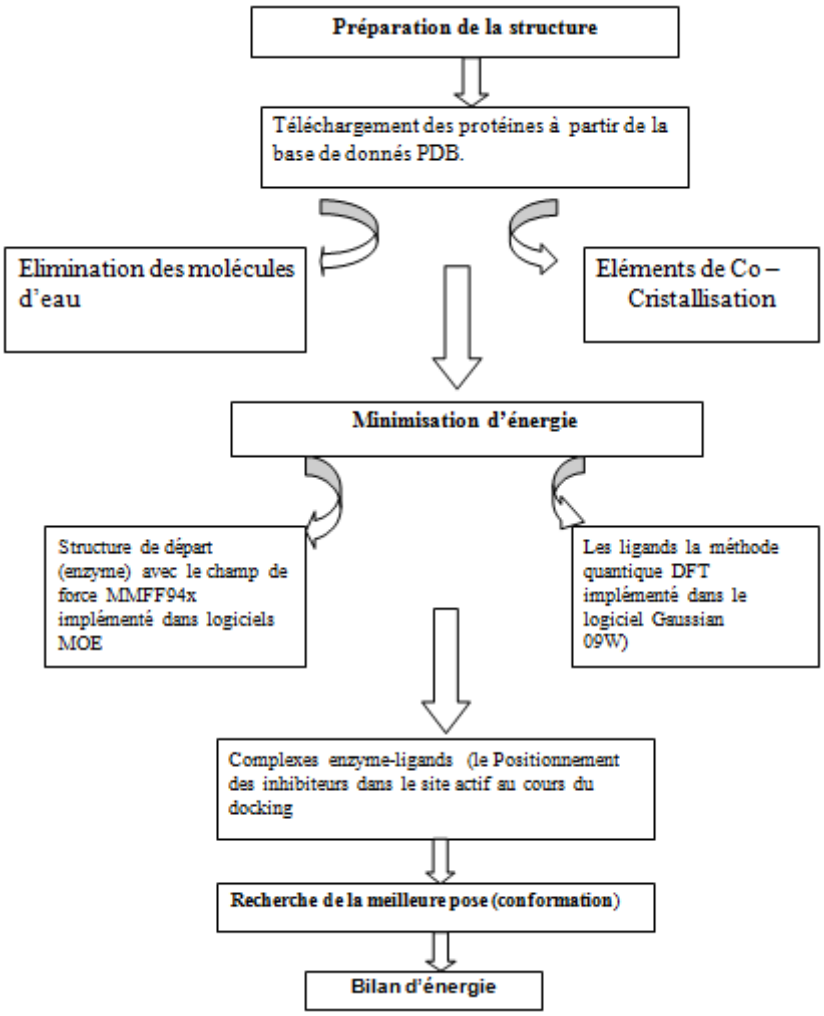


Figure 1 : schéma présentatrice le Protocol de calcul pour le docking moléculaire.

2. Les programmes utilisés

2.1. Le programme MOE (0901.version 2014) :

MOE (Molecular Operating Environment) : est un package de plusieurs logiciels utilisés dans la découverte et à la conception théorique (par ordinateur) de nouveaux entités biologiquement activespendant un temps très court.

Il permet le dessin, la minimisation des ligands pour avoir les meilleures conformations et positions, et également le docking de plusieurs ligands de manière successive.

MOE utilise une forme de docking flexible où le récepteur et le ligand changent de conformation et s'adaptent à l'environnement. L'enzyme et son ligand de co-cristalisation sont représentés c'est le cas de notre travail.

2.2. Le programme Gaussian 09W :

GAUSSIAN est un programme de chimie numérique, créé à l'origine par **John Pople** et publié en **1970 (Gaussian 70[1],**et depuis lors, il a été constamment mis à jour [**2,3].** Le nom vient de l'utilisation par Pople d'orbitales gaussiennes afin d'accélérer le calcul par rapport aux logiciels utilisant des orbitales de Slater. Cela a facilité le développement de la chimie informatique, en particulier des méthodes ab initio telles que Hartree-Fock-Roothan.

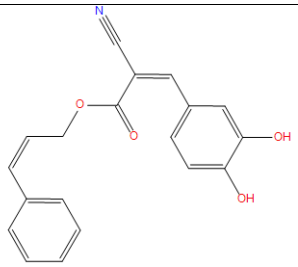
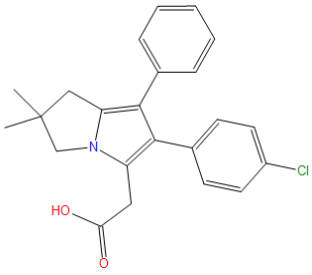
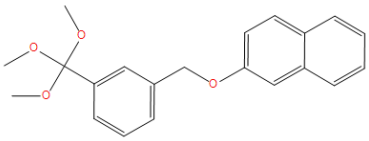
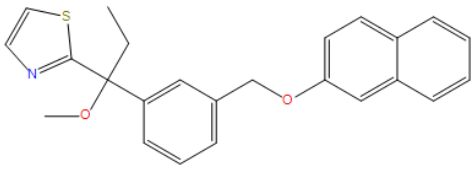
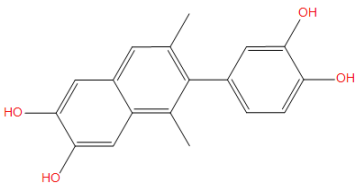
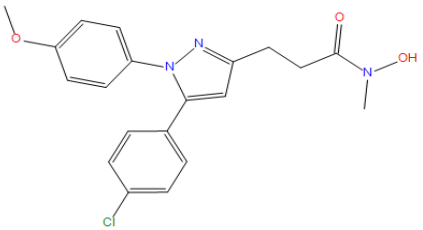
2.3. Test d'évaluation de MOE :

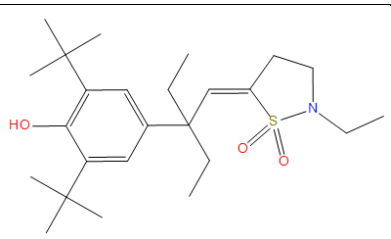
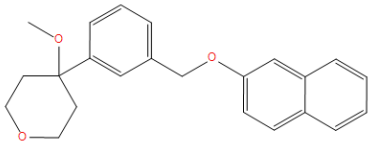
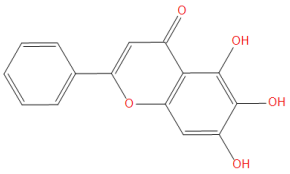
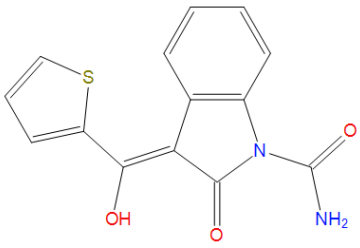
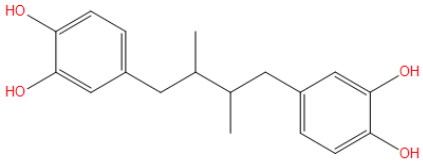
Dans ce travail on va faire une prédiction des inhibiteurs naturels à l'aide des méthodes quantiques et le logiciel du docking MOE, nous avons donc dû effectuer un test de fiabilité pour le programme MOE.

Ce test a été réalisé sur 11 inhibiteurs de la 5-LOX tirés de la littérature d'une façon aléatoire. Chaque inhibiteur est enregistré au format .pdb dans un répertoire spécifique pour son utilisation par MOE, le fichier .pdb est converti au format **.mdb** par **MOE**.

L'affinité calculée par MOE des (11) inhibiteurs de la 5-LOX est comparais avec les valeurs de leurs IC50 issues de la littérature des travaux précédents. Ces résultats sont indiqués en valeurs décroissantes du score obtenu par MOE dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : résultats du docking de l'enzyme 5-LOX (code : 5ec9) avec 11 inhibiteurs de littérature

	Score (kcal/mol)	IC_{50}	Ligand-interactions	Longueur (A°)	E (kcal/mol)
cdc 	-8.5767	15	H-donor	3.71 faible	-1.8
licofelone 	-8.3765	210	H-donor Pi-pi	3.99 faible 3.87 faible	-0.7 -0.0
methoxybutylmetylether 	-8.1381	400	H-donor	3.42 moyenne	-0.9
thiazole 	-7.956	400	/		
bis-catechol 	-7.483	800	/		
tepoxaline 	-7.1667	1700	H-acceptor H-acceptor 5-ring 6-ringphe	2.8 forte 2.97 forte 3.97faible	-5.4 -2.0 -0.0

s-2474 	-7.0123	2500	/		
methoxytetrofuranne 	-6.7507	700	/		
baicalein 	-6.3227	9500	/		
tenidap 	-5.9881	30000	/		
NDGA :Nordihydroguaiaretic acid 	-7.4716	200	H-donor	3.37 moyenne	-2.3

Conclusion :

En remarque que le classement des scores des inhibiteurs est en bon accord avec le classement des **IC50**de ces mêmes inhibiteurs (sauf pour l'inhibiteur NDGA), donc il existe une bonne corrélation entre l'affinité et l'activité biologique expérimentale (**IC50**) des inhibiteurs étudiés. A l'issue de cette analyse, nous pouvons conclure une nouvelle fois que MOE est un programme de docking performant.

3. Traitement de l'enzyme 5-LOX:

Nous avons téléchargé l'enzyme 5-lipoxygénase à partir de la base de données PDB " • Protein Data Bank " (www.rcsb.org/pdb).

Enzyme 5-LOX : code d'accès **5ec9**, est Co- cristallisée avec l'inhibiteur 5-LO: **4-[(11S, 15R)-4, 4, 7, 7-tetramethyl-16-oxatetracyclo-[8.6.0.03, 8.011, 15] hexadeca-1(10), 2, 8-trien-11-yl] benzoicacid**

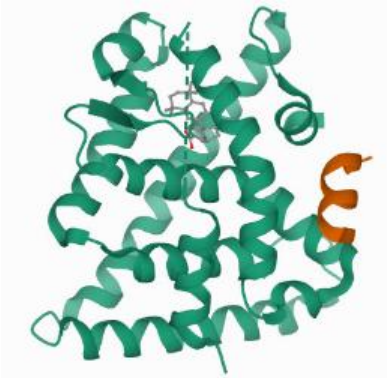
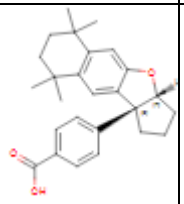
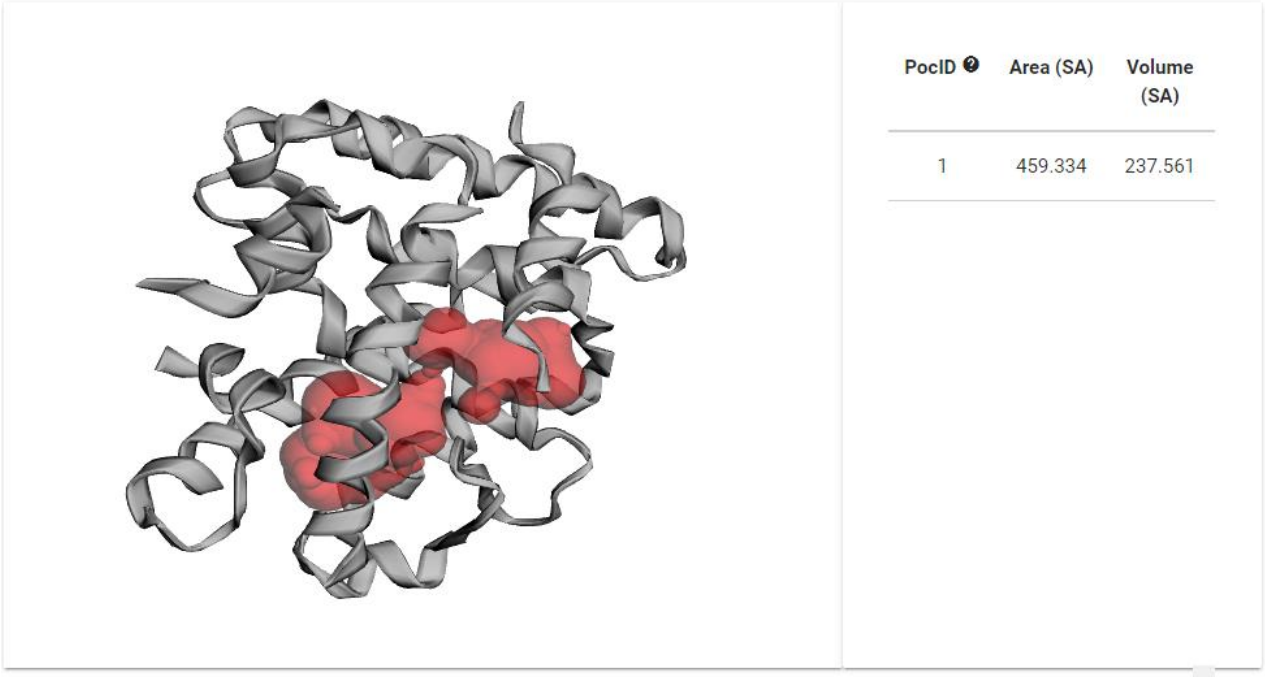


Figure2:enzyme 5-LO code d'accès 5ec9 (site : PDB)

Tableau 2: Données cristallographique pour l'enzyme 5-LOX

Enzyme	Inhibiteur de co-cristallisation	Classification	Résolution	Chaine	Longueur	Angle
5-LOX	 5-LO	Transcription	2.30 A°	A, B	a=68,252 b=68,252 c=106,273	α=90 β=90 γ=90



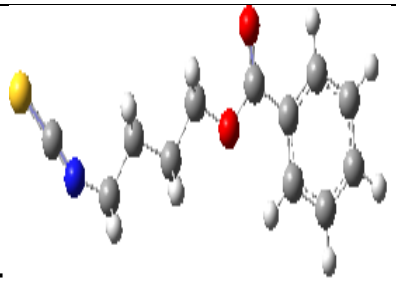
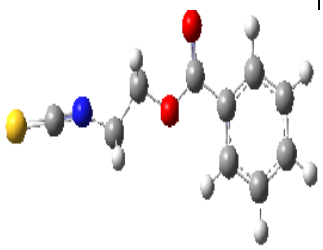
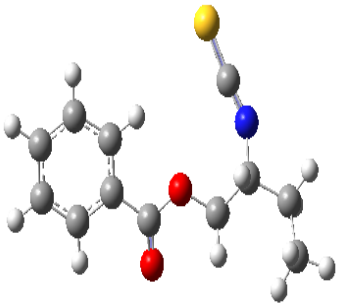
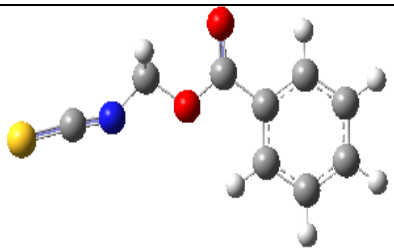
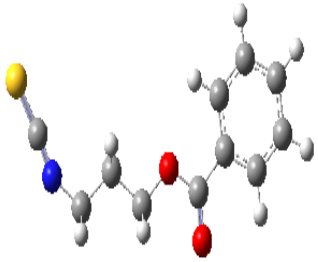
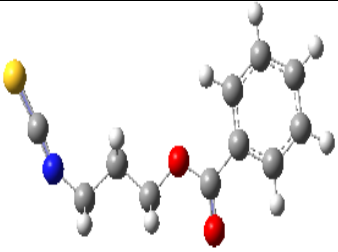
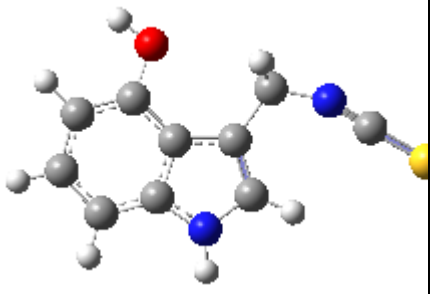
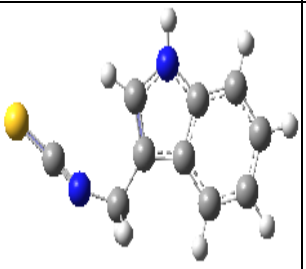
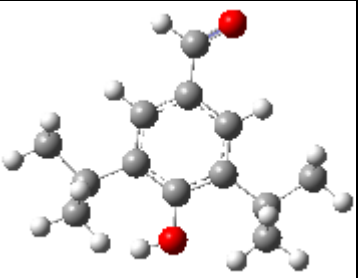
PocID	Area (SA)	Volume (SA)
1	459.334	237.561

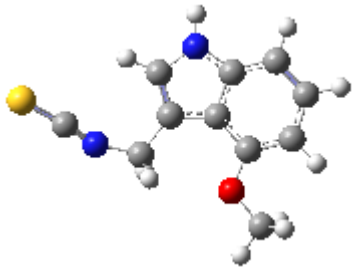
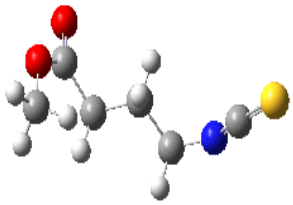
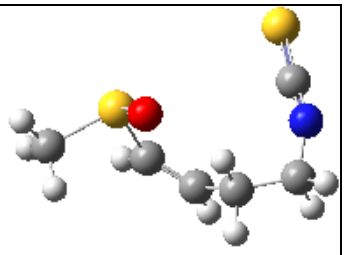
Figure3 : Volume de cavité enzymatique des résidus: (GLU239 LEU240 VAL242 GLU243 PRO244 VAL265 ILE268 CYS269 ALA271 ALA272 LYS274 GLN275 THR278 LEU279 TRP282 TRP305 ASN306 LEU309 ILE310 SER312 PHE313 HIS315 ARG316 SER317 ILE318 ALA319 ILE324 LEU325 LEU326 ALA327 GLY329 VAL342 ILE345 PHE346 VAL349 LYS364 LEU367 ARG371 CYS432 HIS435 LEU436 PHE439)

4. Traitement des inhibiteurs :

Nous avons utilisé l'interface graphique de Gaussian (GaussView) pour dessiner tous les inhibiteurs étudiéset pour l'optimisation nous avons utilisé une méthode quantique DFT (**b3LYP**) implémenté dans le logiciel Gauussian 09w avec la base **6-31G(d).**

Tableau 3 : schématisation des inhibiteurs via logiciel GaussView

 **H5**	 **H6**	 **H7**
 **H8**	 **H9**	 **H10**
 **I23**	 **I28**	 **I43**

 I48	J1 	 J111

II. Doking moléculaire

Dans cette étape nous avons étudié à l'aide du programme MOE les interactions entre le site actif de l'enzyme 5-LOX et les inhibiteurs pour former un complexe stable.

Après formation d'un complexe récepteur-ligand la conformation la plus stable (le niveau énergétique le plus bas) va être adaptée.

1. Résultats

1.1- Distances

Les distances des interactions entre les acides aminés du site actif de l'enzyme 5-LOX et les groupements des inhibiteurs sont mesurés, et les résultats sont regroupés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : les résultats de l'enzyme 5-LOX (code : 5ec9) avec les 12 inhibiteurs

Inhibiteurs	Acide aminé	Interaction	Distance A°
H5	/	/	/
H6	/	/	/
H7	/	/	/
H8	CYS (432)	H-donor	4.48
H9	/	/	/
H10	/	/	/
I28	/	/	/
I43	ILE (268) PHE (313)	Pi-H Pi-Pi	3.78 3.95
I47	/	/	/

I48	/	/	/
J1	/	/	/
J111	/	/	/

Tableau 5: les résultats de l'enzyme 5-LOX (code : 5t4e) avec l'inhibiteurs **Zileuton**

Inhibiteur	**Acide aminé**	**Interaction**	**Distance A°**
Zileuton	ARG **(**316)	H-acceptor	3.18

- ✓ En examinant ces résultats, nous remarquons que les distances mesurées varient entre 3,78 Å et 4,48 Å pour tous les complexes étudiés.

Anne.Imberty, (1991) considère que les interactions entre 2,5 Å et 3,1 Å sont fortes, celles entre 3,1 Å et 3,55 Å sont moyennes, et les interactions supérieures à 3,55 Å sont faibles ou absentes.

- ✓ l'inhibiteur **H8** forme une interaction faible avec l'acide aminé: CYS (une distance 34,48 Å).
- ✓ L'inhibiteur **I43** forme deux interactions faibles avec les acides aminés: ILE 268 (une distance 3,78 Å) et PHE 313 (une distance 3,95 A°).
- ✓ L'interaction de l'inhibiteur zileuton avec l'acide aminé : ARG 316 est forte (une distance de 3,19 A°).

1.2- Les énergies des interactions :

L'évaluation des énergies d'interaction entre les différents inhibiteurs étudiés et l'enzyme 5-LOX a été réalisé à l'aide du docking moléculaire, les résultats de calcul obtenus sont présentés dans le tableau suivant

Tableau 6 : Bilan d'énergie (Enzyme 5-LOX) :

Ligands	Energie Kcal/mol	Ligands	Energie Kcal/mol
H5	-6,7841	I28	-5,5736
H6	-5,9318	I43	-5,8951
H7	-6,0753	I47	-6,3328
H8	-5,8657	I48	-5,5991
H9	-6,5167	J1	-4,971
H10	-6,4021	J111	-5,3476

Zileuton	-5,4957		

D'après les résultats obtenus, nous notons que les inhibiteurs H5, H6, H7, H8, H9, H10, I28,I43,I47 et I48 ont des énergies plus stables que le médicament Zileuton par contre les inhibiteurs J1 et J111 ont des énergies plus forts que le médicament Zileuton.

1.3. La toxicité

Les molécules actives biologiquement doivent respecter les 5paramètres de la règle de Lipinski :

- Pas plus de 5 obligation d'hydrogène donateurs (groupes de l'OH et de NH).
- Pas plus de 10 accepteursd'obligation d'hydrogène (notamment N et O).
- Poids moléculaireinferieur de 500.
- LogPinferieur de 5.

Le programme MOE prend en considération ces règles de Lipinski, et il nous a permis d'obtenir les propriétés des ligands suivantes :

- Toxicité
- Poids moléculaire
- La masse moléculaire

Tableau 7: toxicitédes inhibiteurs selon la règle de Lipinski

ligands	H5	H6	H7	H8	H9	H10	I28	I43	I47	I48	J1	J111	Zileuton
Toxicité	no	no	no	no	No	No	no	no	no	No	no	no	yes

On note que les inhibiteurs sont non toxiques par contre le médicament Zileuton est toxique.

III. Dynamique Moléculaire :

La dynamique moléculaire est, comme son nom l'indique, une méthode de simulation moléculaire de l'évolution temporelle (dynamique). Elle est basé sur l'utilisation de la relation fondamentale de la dynamique (ou loi de Newton).

Le but de la dynamique moléculaire dans cette étude est d'examiner le comportement ducomplexe (enzyme-ligand) à une température donnée (300 K), pour connaître la stabilité de meilleur complexe formé (5-LOX-H5).

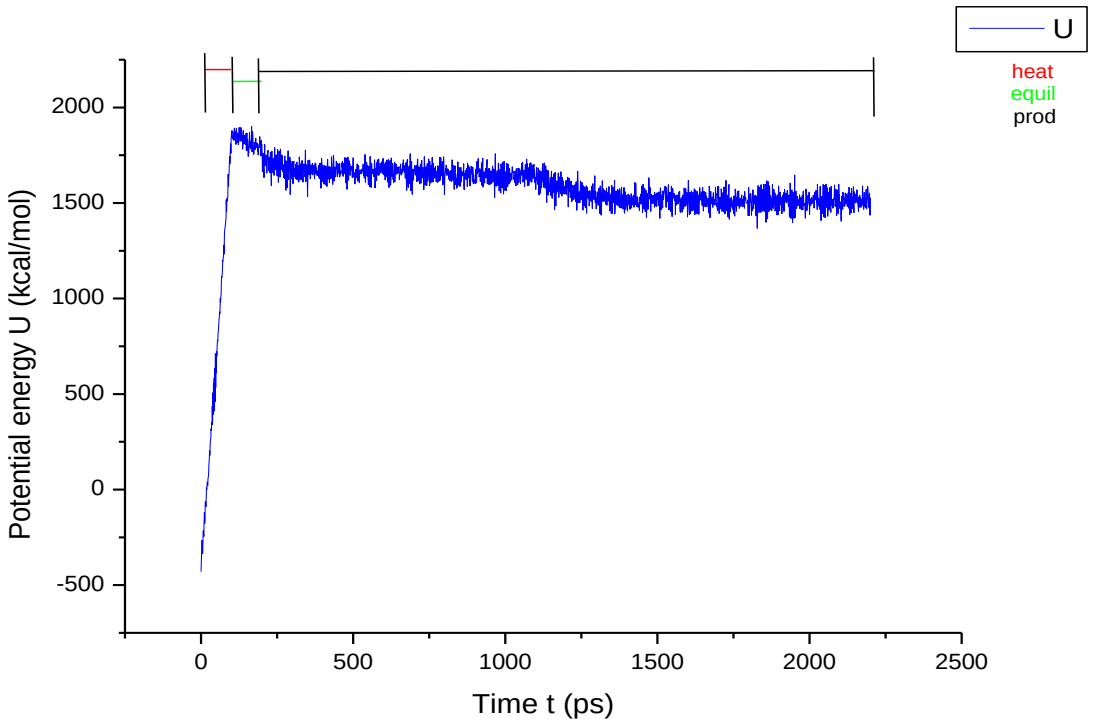


Figure 3 : la dynamique moléculaire de complexe 5-LOX-ligand H5

Le graphe suivant représente la dynamique moléculaire de complexe 5-LOX-ligand H5 en remarque 3 étapes :

Chauffage : dans cette étape l'énergie potentielle augmente avec l'augmentation de la températureen fonction de temps.

Equilibrage : dans cette étape la température est constante et les conformations cherchent leurs stabilités.

Production : dans cette étape en remarque que il y'a une stabilité entre 1400 (ps) et 2250 (ps)

IV. Analyse des résultats :

les résultats obtenus, nous montrent que les complexes formés entre l'enzyme **5**-LOX et les ligands H5, H6, H7, H8, H9, H10, I28, I43, I47 et I48 ont respectivement les énergies les plus basses : -6,7841 kcal/mol, -5,9318kcal/mol, -6,0753 kcal/mol,-5,8657 Kcal/mol, -6,5167 Kcal/mol, -6,4021 Kcal/mol, -5,5736 Kcal/mol,-5,8951 Kcal/mol,-6,3328 Kcal/mol et -5,5991 Kcal/mol, ces complexes ont des énergies plus faibles que le médicament Zileuton (-5,4957 Kcal/mol) et on remarque que :

- le ligand H5 possède l'énergie la plus faible, donc c'est le plus stable.

-les complexes formés entre l'enzyme 5-LOX et les ligands J1 et J111 possèdent respectivement des énergies (-4,971 Kcal/mol et -5,3476 Kcal/mol) plus fortes que le médicament Zileuton (-5,4957 Kcal/mol).

.- Selon les résultats de toxicité obtenus par le logiciel MOE, tous les ligands sont non toxiques, mais Zileuton est toxique ce qui est confirmé par les effets indésirables de ce médicament.

-D'après les résultats de dynamique moléculaire on peut dire que le complexe 5-LOX-ligand H5 est stable.

Tableau 8 : les propriétés de meilleur ligand H5

Ligand	**H5**
Toxicité	Non
Poids	235,31 g/mol
Log P	2,46
Log S	-3,5

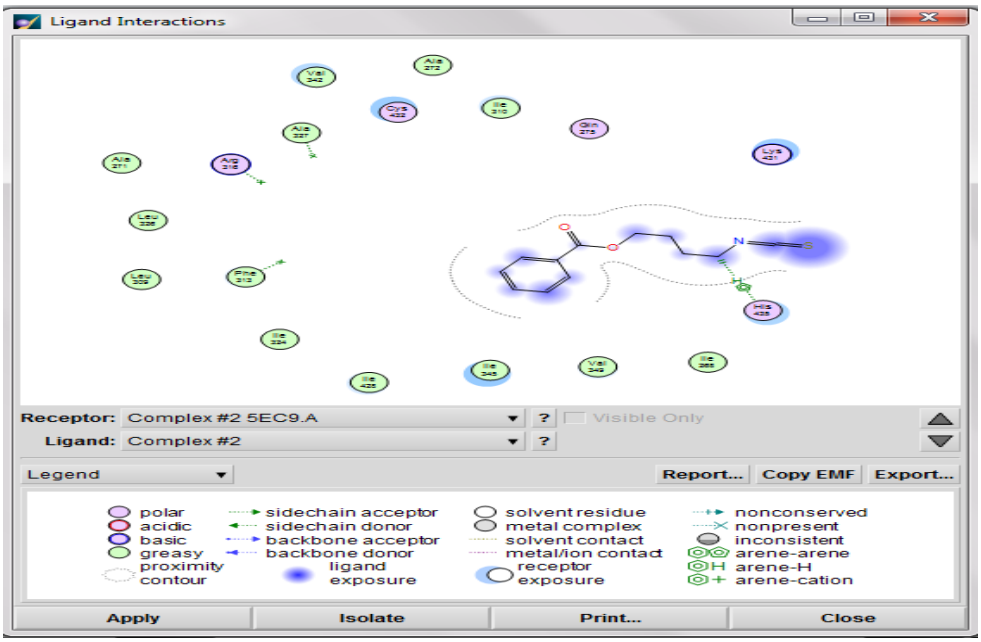


Figure 4: résultat du docking du complexe enzyme 5-LOX et le ligand H5 (Meilleur inhibiteur)

Reference:

[1] R W. J. Hehre, W. A. Lathan, R. Ditchfield, M. D. Newton, and J. A. Pople, Gaussian 70 (Quantum Chemistry Program Exchange, Program No. 237, 1970).

[2] *Computational Chemistry*, David Young, Wiley-Interscience, 2001. Appendix A. A.2.4 pg 336, Gaussia

[3] « Publisher's note: Sir John A. Pople, 1925-2004 », *Journal of Computational Chemistry*, Wiley Interscience, vol. 25, n° 9, 2004, fmv-vii

[4]A Imberty.,*Glycobiology*. 6 (1991):631- 642.

Conclusion générale

1. Conclusion :

Les résultats du docking (criblage virtuel) d'inhibition de la 5-LOX avec les 12 inhibiteurs utilisés montrent que les inhibiteurs H5,H6,H7,H8,H9,H10,I28,I43,I47 et I48 ont des énergies plus stables que Zileuton, mais il n'y a pas d'interactions fortes entre le site actif de la 5-LOX et les groupements des inhibiteurs responsables de l'interaction, par contre les ligands J1 et J111 possédant des énergies moins stables que Zileuton.

En conclusion, à la lumière des résultats obtenus dans ce travail, qui porte sur

L'étude théorique (par des méthodes de Modélisation moléculaire) de l'inhibition de la 5-LOX dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs non toxiques pour remplacer Zileuton. Nous proposons le ligand-H5 comme le meilleur inhibiteur de cette série de glucosinolates.

2- Perspectives :

Comme perspectives nous envisageons de terminer ce travail par :

- l'utilisation d'autres logiciels de docking moléculaire pour confirmer les résultats obtenus.

-tester d'autres séries de Brassicaceae et d'autres familles des glucosinolates afin de proposer les meilleurs inhibiteurs.

-une étude expérimentale in vitro et / ou in vivo permettra de vérifier les résultats théoriques obtenus

- calculer et quantifier le RMSD (Root Mean Square Deviation) entre deux conformations superposées (le complexe calculé avec le logiciel et le complexe trouvé expérimentalement).

- prendre en considération la solvatation qui a été négligé dans notre travail.

ملخص

- في هدا العمل تم التطرق لدراسة تثبيط إنزيم 5-LOX نظرا لدوره المهم في العملية الالتهابية (الربو).
- الالتحام الجزيئي هو نهج نظري لدراسة تفاعل ligand مع الإنزيم الموجود على المستوى الجزيئي .
- تم استخدام برنامج MOE لدراسة تثبيط إنزيم 5-Lipoxygénase نظريا عن طريق سلسلة من الغلوكوزينولات .
- من نتائج الالتحام الجزيئي، وجدنا أن مثبطات H5,H6,H7,H8,H9,H10,I28,I43,I47,I48 لديها طاقات أكثر استقرارًا من Zileuton، و لكن لا يوجد التفاعلات القوية بين الموقع النشط لـ5-LOXو مجموع المثبطات المسؤولة عن التفاعل، باستثناء H8وI43 مع ملاحظة أن هناك تفاعلات ضعيفة
- بالإضافة إلى ذلك، يؤكد اختبار السمية أنZileuton عقار سام.

Résumé

- Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur l'inhibition de la 5-lipoxygénase (5-LOX) en tant qu'enzyme impliquée dans l'inflammation (l'asthme).
- Le docking moléculaire est une nouvelle approche théorique qui permet d'étudier les interactions d'un ligand avec l'enzyme au niveau moléculaire.
- Le programme MOE, a été utilisé pour étudier in silico l'inhibition de l'enzyme 5-lipoxygénase par une série des glucosinolates de brassicaceae.
- D'après les résultats de docking moléculaire, Nous avons constaté que les inhibiteurs H5,H6,H7,H8,H9,H10,I28,I43,I47 et I48 ont des énergies plus stables que Zileuton, mais il n'y a pas d'interactions fortes entre le site actif de la 5-LOX et les groupements des inhibiteurs responsables de l'interaction, sauf , pour le H8 et le I43 en remarque que il y'a des faibles interactions.
- En plus, le teste de la toxicité confirme que zileuton est un médicament toxique.

Abstract

- In our work, we have focused on the inhibition of 5-lipoxygenase (5-LOX) as an enzyme involved in inflammation (asthma).
- Molecular docking is a new theoretical approach to study the interactions of a ligand with the enzyme at the molecular level.
- The MOE program was used to study in silico the inhibition of the enzyme 5-lipoxygenase by a series of glucosinolates from brassicaceae.
- From the results of molecular docking, We found that the inhibitors H5, H6, H7, H8, H9, H10, I28, I43, I47 and I48 have more stable energies than Zileuton, but there is no strong interactions between the active site of 5-LOX and the groups of inhibitors responsible for the interaction, except, for H8 and I43, note that there are weak interactions.
- In addition, the toxicity test confirms that zileuton is a toxic drug.