

الجمهورية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar TELIDJI Laghouat
Faculté des Sciences
Département de Biologie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -
كلية العلوم
قسم البيولوجيا



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie
Option : Génie biologie

Thème

***Etude des structures tridimensionnelles
des complexes lipase-inhibiteur par outils
informatiques***

Présenté par :

Nadjat BELMAZOUZI

Aicha BELABBASSI

Encadré par : *M^{me} BENAROUS.Khedidja, Maître Assistant B*

JUIN 2012

Etude de structure tridimensionnelle des complexes lipase-inhibiteur par outils informatique

Résumé

Actuellement, les recherches scientifiques dans le domaine biologique dépendent en grande partie sur les outils bioinformatiques qui sont des moyens indispensables et complémentaires à la recherche expérimentale. Dans la première partie, nous avons fait une étude théorique sur les médicaments anti-inflammatoires et autres médicaments analgésiques et certaines maladies causées par l'activité lipasique. Dans la deuxième partie, nous avons construit les structures tridimensionnelles des inhibiteurs, puis nous avons précédé à l'optimisation de ces structures par minimisation d'énergie en utilisant le logiciel HyperChem. Ainsi, nous avons téléchargé les structures des lipases (lipase pancréatique humaine et lipase de *Candida rugosa*) à partir de la banque PDB (Protein Data Bank) et nous avons aligné les deux structures pour la comparaison en utilisant Bioedit et Pymol. Dans la troisième partie, nous avons réalisé l'amarrage (Docking) des inhibiteurs dans les deux enzymes après leurs optimisations à l'aide du logiciel GOLD. Nous avons trouvé que parmi les cinq médicaments choisis seulement l'Aspirine et le voltarène qui a révélé une grande affinité vis-à-vis les deux lipases.

Mots-clés : lipase, inhibition enzymatique, bioinformatique, pymol, BioEdit, HyperChem, GOLD, docking, la minimisation d'énergie.

دراسة البنية ثلاثية الأبعاد للمعقدات ليباز-مثبط بواسطة وسائل بيومعلوماتية

ملخص

تعتمد معظم الأبحاث العلمية في المجال البيولوجي على الوسائل البيومعلوماتية لما توفره من معلومات مفيدة في هذه البحوث التجريبية. في الجزء الأول، من هذا العمل قمنا بدراسة نظرية لبعض الأدوية المضادة للالتهابات والمسكنة للألام وذلك لاختيار مثبطات أنزيم الليباز ثم لخصنا بعض الأمراض الناتجة عن إنزيم الليباز. في الجزء الثاني، قمنا ببناء البنية ثنائية الأبعاد لخمس أدوية ثم اختيارها لندرس إمكانية تثبيطها لإنزيم الليباز ثم نقلها لبرنامج hyperchem حتى يتم تخفيض طاقتها. بعد ذلك استخرجنا البنية ثلاثية الأبعاد للأنزيمين (ليباز بنكرياس الإنسان و ليباز *candida rugosa* ثم تحميلها من بنك البروتينات (PDB) ثم قارناها باستعمال البرنامجين Pymol, Bioedit. في الجزء الأخير قمنا بعملية إرساء المثبطات الخمس لإنزيم الليباز باستعمال برنامج Gold, فوجدنا أن دواء voltarene, aspirine قد أظهر ألفة مهمة في اتجاه الأنزيمين.

الكلمات الدالة: الليباز, تثبيط إنزيمي, وسائل بيومعلوماتية, pymol, gold, hyperchem,, عملية الإرساء, خفض الطاقة

Belmazouzi ET Belabbassi

Structural study of lipase-inhibitor complexes using bioinformaticst ools

Abstract

Currently, scientific research in biology depends largely on bioinformatics tools that are essential and complementary means of experimental research. In the first part of this study, we made a theoretical study on the anti-inflammatory and analgesic drugs and some diseases caused by the lipase activity. In the second part, we constructed three-dimensional structures of the inhibitors, then we proceeded to the optimization of these structures by energy minimization using HyperChem software. Thus, we downloaded the structures of lipases (human pancreatic lipase and *Candida rugosa* lipase) from the bank pdb (Protein Data Bank) and we have aligned the two structures for comparison using Bioedit and Pymol. In the third part, we performed docking of inhibitors in both enzymes after their optimizations using the GOLD software. We found that among the five selected drugs only aspirin and voltarene, which revealed a high affinity toward the two lipases.

Keywords: lipase, enzyme inhibition, bioinformatics, pymol, BioEdit, HyperChem, GOLD, docking, energy minimization.

Dédicace

A mes chers parents tendres :

A celle qui m'a donné l'espoir de vivre, et réussir, de donner sans hésiter et de travailler avec une certaine perfection « ma mère ».

A ceux qui est le symbole de la générosité mon prof au lycée et mon cher père à la maison. Alors les fruits de tous mes efforts sont presque mures je vous les offrir.

Et à tous qui me donne :

L'Amour et La sollicitude : ma grand-mère.

*L'espoir : mes frères Marouane, Akram, Abdelrrahmane, Wissamet
ma sœur Anfal.*

*A mes amis : Amel, Amel.B, Nour El Houda, Fattí, Merieme,
Fatima.S, Fatima.L.*

*A mes voisins à la cité universitaire : Naïma, Mebarka, Aïcha.B,
Aïcha.L, Aïcha.G.*

*A ma cher amie tendre Nadjat : ma préfère amie quia toujours le
sens de l'humour et de la fidélité.*

*A tous ceux qui ont une relation de proche ou de loin avec la réalisation
du présent travail.*

Je dédie ce travail en espère la réussite et le succès.

Aïcha

Dédicace

Je dédie ce travail

A mon père qui est toujours été là pour moi, et qui m'a donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'il trouverait dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A ma mère : en vous, je vois la maman parfaite, toujours prête à se sacrifier pour le bonheur de ses enfants, qui m'a toujours soutenu et qui m'a fait tout possible pour moi.

A mon très chers frères : Ahmed et Bilel et mes très chères sœurs : Fadila, Zahra, Mbarka, Amina et Hourra : pour leurs affection, compréhension et patience.

A mes neveux et nièces : en leur souhaitant la réussite dans leurs études et dans leurs vies.

A mon meilleur amie et m'âme sœur Aicha.

A mes amis : Amel, B.Amel, Houda, K.Fatima, S.Fatima, Merieme, L.Fatima, Rokiya et Serine.

A mes collègues de promotion de la cinquième année Génie biologique.

A tous ceux qui m'ont aidé afin de réaliser ce travail, et a tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Nadjat

Remerciement

Au nom d'Allah le plus grand merci lui revient de nous avoir guidés vers le droit chemin, de nous avoir aidé tout au long de nos années d'étude.

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude ainsi que nos sincères remerciements à M^{me} BENAROUS Khedidja qui malgré les occupations et les responsabilités qu'elle assume, elle a toujours eu le temps pour nous conseiller et nous fournir la documentation nécessaire durant la réalisation de ce travail.

Nous adressons notre profond remerciement à notre collègue LINANI Abderrahmane pour sa collaboration, ses conseils et son soutien afin de réaliser ce travail.

Nos remerciements aux honorables membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Nos profondes reconnaissances à l'ensemble des enseignants du département de biologie pour leurs enseignements et conseils durant le cursus d'études.

Nous adressons nos remerciements les plus chaleureux à nos familles pour leur amour, leur patience et leur sacrifice qui s'inscrivent à chaque page de ce document.

Enfin, un grand remerciement à l'ensemble des personnes qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Sommaire

Introduction générale	1
CHAPITRE I : LES MEDICAMENTS ANTI-INFLAMMATOIRES ET ANALGESIQUES	3
1. CLASSIFICATION DES MEDICAMENTS.....	4
1.1. Médicaments anti-inflammatoire	4
1.1.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens ou Les corticoïdes.....	4
1.1.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	4
1.1.2.1. Anti-inflammatoires indiques.....	5
1.1.2.2. Anti-inflammatoires oxicams.....	5
1.1.2.3. Anti-inflammatoires arylcarboxyliques.....	5
1.1.2.4. Anti-inflammatoires anthraniliques (fénamates).....	5
1.1.2.5. Anti-inflammatoires pyrazolés.....	5
1.1.2.6. Anti-inflammatoires salicylés.....	5
1.1.2.7. Anti-inflammatoires propioniques	6
1.1.2.8. Les Anti-inflammatoires sélectifs ou coxibs ou anticox2	6
1.2. Médicaments analgésiques.....	6
1.2.1. Analgésiques du premier palier.....	6
1.2.2. Analgésiques du deuxième palier.....	7
1.2.3. Analgésiques du troisième palier	7
2. STRUCTURE DES MEDICAMENTS.....	7
3. LES LOGICIELS UTILISES.....	9
3.1. Hyperchem.....	9
3.2. BioEdit	9
3.3. PyMol.....	10
3.4. GOLD.....	11
4. CONSTRUCTION DES MEDICAMENTS EN 3D.....	11
5. OPTIMISATION DES MEDICAMENTS EN 3D	13
6. RESULTATS ET DISCUSSION.....	15
CHAPITRE II : LES LIPASES	16
1. STRUCTURE BIOCHIMIQUE ET LE MECANISME CATALYTIQUE.....	17
1.1. Les α/β hydrolases :.....	17

1.2. Mécanisme enzymatique d'hydrolyse :.....	18
2. LES MALADIES CAUSEES PAR LES LIPASES	21
2.1. L'obésité.....	21
2.2. L'acné.....	24
2.3. L'ulcère	27
2.4. La candidose.....	28
3. CHOIX DES LIPASES ET TELECHARGEMENT.....	33
4. COMPARAISON ENTRE LES STRUCTURES 3D DES DEUX ENZYMES	34
5. ALIGNEMENTS DES SEQUENCES DES ACIDES AMINES DES DEUX LIPASES	36
CHAPITRE III : DOCKING DES INHIBITEURS	37
1. OPTIMISATION DES DEUX LIPASES	38
2. DOCKING DES INHIBITEURS SUR LES DEUX LIPASES	39
3. DISCUSSION DES RESULTATS DU DOCKING	45
CONCLUSION GENERALE	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	49

Liste des tableaux

Tableau 1: les structures, formules brutes et noms chimiques des cinq médicaments choisis.....	7
Tableau 2. Valeurs d'énergie et de gradient des inhibiteurs avant et après la minimisation et leurs nombre des cycles minimisés.....	15
Tableau 3. Principales classes d'antifongiques et mode d'action	33
Tableau 4. Informations des deux lipases	34
Tableau 5. Les valeurs des distances interatomiques en °A des deux lipases	46

Liste des figures

Figure 1. L'interface graphique de l'Hyperchem.....	9
Figure 2. L'interface graphique de BioEdit.....	10
Figure 3. L'interface graphique du PyMol.....	10
Figure 4. L'interface graphique du GOLD.....	11
Figure 5. Structure des médicaments en 3D en boules et bâtonnets.....	12
Figure 6. La structure de paracétamol sous forme bâtonnets « sticks » à l'aide du PyMol.....	13
Figure 7. La structure d'indométacine sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol.....	13
Figure 8. La structure de voltarène sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol.....	14
Figure 9. La structure de piroxicam sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol.....	14
Figure 10. La structure d'aspirine sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol.....	15
Figure 11. Schéma du repliement α/β	18
Figure 12. Réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase en milieux aqueux.....	19
Figure 13. Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester.....	21
Figure 14. Structure tertiaire de la lipase pancréatique humaine.....	23
Figure 15. Le traitement des lipides alimentaires chez les vertébrés.....	23
Figure 16. Le mécanisme d'inhibition de la lipase pancréatique humaine par l'orlistat.....	24
Figure 17. Microphotographie de balayage électronique de <i>P. acnes</i>	25
Figure 18. Les différentes étapes du développement de l'acné.....	26
Figure 19. Microphotographie de transmission de <i>H pylori</i>	27
Figure 20. Les ulcères peptiques vus comme une altération de la muqueuse de couleur blanc-brun.....	28
Figure 21. Morphologie de <i>Candida glabrata</i>	29
Figure 22. Candidose buccale.....	30
Figure 23. Examen direct d'une hémoculture positive à l'aide d'un Microscope à fluorescence.....	31
Figure 24. Filaments et spores de <i>Candida albicans</i>	31
Figure 25. Aspect des colonies de différentes espèces de <i>Candida</i>	32
Figure 26. La page d'accueil du pdb.....	34
Figure 27. Comparaison des structures tertiaires des 2 enzymes de la lipase « LHP et LCR».....	35
Figure 28. Représentation de la partie commune entre les deux lipases.....	35
Figure 29. Comparaison de la succession des acides aminés des deux enzymes de la lipase.....	36
Figure 30. Structures 3D de la LCR en forme cartoon.....	38
Figure 31. Structure de la LHP en forme cartoon.....	39
Figure 32. La meilleure solution pour le docking de paracétamol sur la LCR.....	41
Figure 33. Les meilleures solutions pour le docking de l'indométacine sur LCR.....	42
Figure 34. Les meilleures solutions pour le docking de piroxicam sur LCR.....	42
Figure 35. La meilleure solution pour le docking de voltarène sur LCR.....	43
Figure 36. La meilleure solution pour le docking d'aspirine sur LCR.....	43
Figure 37. La meilleure solution pour le docking de paracétamol sur LHP.....	43
Figure 38. La meilleure solution pour le docking de l'indométacine sur LHP.....	44
Figure 39. La meilleure solution pour le docking de piroxicam sur LHP.....	44
Figure 40. La meilleure solution pour le docking de voltarène sur LHP.....	44
Figure 41. La meilleure solution pour le docking d'aspirine sur LHP.....	45

Liste des abréviations

A-B

AINS : anti-inflammatoire non stéroïdiens.

AIS : anti-inflammatoire stéroïdiens.

Ala : alanine.

Asp : aspartate.

BNG : B-NonylGlucoside

C-D

C : Candida.

Ca : calcium.

1CRL : code pdb pour la conformation ouverte de la CRL.

Cys : cystéine.

2D : bidimensionnelles.

3D: tridimensionnelle.

DI :distance interatomique.

F-G

Glu : glutamate.

GOLD: Genetic Optimisation for Ligand Docking.

Gly: glycine.

H-I

His: histidine.

IMC : indice de masse corporelle.

L

LCR : la lipase de *Candida rugosa*.

L,Leu: leucine.

LGH : lipase gastrique humaine.

LHP: Lipase pancréatique humaine.

1LPA:code pdb pour la conformation ouverte de la LPH.

M-N

NAG :N-acétyl-D-Glucosamine.

1N8S : code pdb pour la conformation fermée de la LPH.

O-P-R

OMS: organisation mondiale de la santé

PDB: Protein Data Bank.

PLC: phosphatidyle choline.

S-T

Ser: serine.

1TRH, 1GZ7 : code pdb pour la conformation fermée de la CRL.

V-Y

Val : valine.

VIH : virus d'immunodéficience humaine

INTRODUCTION
GENERALE

Les lipases appartiennent à la famille des hydrolases d'esters carboxyliques, appelées aussi triacylglycérol hydrolases (EC.3.1.1.3). Le rôle physiologique des lipases est d'hydrolyser les triglycérides en di-glycérides, mono glycérides, acides gras et glycérol. L'hydrolyse des liaisons esters des substrats lipidiques insolubles dans l'eau se produit à l'interface lipide-eau (Mats *et al.*, 1994). Ces enzymes présentes chez tous les organismes vivants, jouent un rôle clé dans la biochimie des lipides. Les lipases ont également la capacité de réaliser des réactions de synthèse telles que l'estérification (réaction entre un acide et un alcool), la transestérification (ester et alcool) et l'inter-estérification (ester et ester) ainsi que dans des réactions de transfert du groupement acétyl d'un ester sur d'autres nucléophiles tels que des amines ou des thiols. Les lipases présentent des propriétés catalytiques variables suivant les différentes espèces.

Les inhibiteurs de la lipase ont été un des outils les plus utilisés dans la caractérisation de la structure, les propriétés catalytiques, la spécificité du substrat et la sélectivité de la lipase. Ces inhibiteurs ont un intérêt pharmacologique élevé car ils peuvent aider dans la thérapie des maladies où les lipases jouent un rôle important comme l'obésité et les maladies infectieuses produites par les microorganismes lipolytiques (Schmid et Verger, 1998 ; Grippa *et al.*, 1999 ; Gupta *et al.*, 2004 ; Benarous, 2010).

Dans ce travail, nous allons utiliser les médicaments anti-inflammatoires et analgésiques qui portent dans leur structure une fonction ester ou amide comme des inhibiteurs pour les lipases. Nous allons étudier dans la première partie les structures tridimensionnelles des cinq médicaments que nous avons choisis ainsi les structures des deux lipases : la lipase de *Candida rugosa* et la lipase pancréatique humaine en utilisant des logiciels bioinformatiques. Dans la deuxième partie, nous allons étudier les complexes inhibiteur-enzymes des cinq inhibiteurs qui sont le paracétamol, indométacine, aspirine, piroxicam et voltarène par la réalisation d'un amarrage (docking) de ces cinq derniers.

CHAPITRE I :
LES MEDICAMENTS
ANTI-
INFLAMMATOIRES ET
ANALGESIQUES

1. CLASSIFICATION DES MEDICAMENTS

1.1. Médicaments anti-inflammatoire

Les anti-inflammatoires appartiennent à des classes chimiques très variées et agissent de façon purement symptomatique sur la réaction aspécifique des tissus à un agent agresseur (Muster, 2005). Ce sont des médicaments qui limitent l'amplitude et la durée des réactions inflammatoires. Ils atténuent les signes de l'inflammation (Denis, 2005). La classe des anti-inflammatoires comporte aujourd'hui de nombreux produits qui se regroupent en deux grandes familles : les anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens ou AINS (Buxeraud, 2007).

1.1.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens ou Les corticoïdes

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes de synthèse permettent d'obtenir une meilleure activité anti-inflammatoire et la dissociation entre les effets anti-inflammatoires et les effets physiologiques cortisoliques. Ils sont utilisés depuis plusieurs dizaines d'années dans la prise en charge de nombreuses pathologies présentant une composante inflammatoire (Faure, 2009). Ils ont tous une activité hormonale sur les régulations métaboliques (glucidique, protidique, lipidique notamment) et ils entraînent la mise au repos des surrénales par un mécanisme de freination hypothalamohypophysaire (Muster, 2005).

1.1.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

Les Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens regroupent l'ensemble des médicaments symptomatiques inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines. Ce mécanisme d'action commun confère aux AINS leurs propriétés et de leurs effets indésirables (Université Médicale Virtuelle Francophone, 2009). Ils sont utilisés principalement dans le traitement des douleurs articulaires ou osseuses, et comme antipyrétiques, comme antalgiques, ou comme antiagrégants (Philippe, 2006). La famille des AINS comporte de nombreuses substances appartenant à plusieurs

familles chimiques, dont le point commun est d'être des acides faibles (Dangoumau *et al.*, 2006). On distingue :

1.1.2.1. Anti-inflammatoires indiques

Le chef de file est l'indométacine, introduite en thérapeutique en 1963, pour le traitement chronique des affections rhumatismales (Moulin et Qoquelt, 2002). L'indométacine est un dérivé du 5-hydroxyindole doué de puissantes propriétés anti-inflammatoires (Schmi, 1987). Elle empêche la synthèse des prostaglandines et antagonise leur action sur les fibres lisses (Cohen, 1981).

1.1.2.2. Anti-inflammatoires oxicams

L'exemple de cette classe est le piroxicam (FELDENE) : cette classe d'AINS, lorsqu'elle a apparue sur le marché, laissait présumer qu'elle serait prometteuse et riche de dérivés nouveaux. Des accidents sévères (notamment cutanés, syndrome de Lyell) ont entraîné le retrait volontaire du marché de deux spécialités (Moulin et Qoquelt, 2002).

1.1.2.3. Anti-inflammatoires arylcarboxyliques

L'exemple de cette classe est le diclofénac (voltarène) ; c'est un dérivé proche chimiquement à la fois des cétones et des anthraniliques possède l'indication « traitement des manifestations fonctionnelles de l'arthrose » (Moulin et Qoquelt, 2002).

1.1.2.4. Anti-inflammatoires anthraniliques (fénamates)

L'exemple de cette classe est l'acide niflumique (NIFLURIL) : ces dérivés constituent toute une série de substances analgésiques et antipyrétiques dotées de propriétés anti-inflammatoires, les indications sont celles de la phénylbutazone (Schmi, 1987). C'est une classe d'AINS peu différente des précédentes, donnant plutôt d'avantage d'incidents et d'accidents digestifs (Moulin, Qoquelt, 2002).

1.1.2.5. Anti-inflammatoires pyrazolés

L'exemple de cette classe est la phénylbutazone (BUTAZOLIDINE). Ce groupe d'AINS est, après l'aspirine, l'anciennement connu et utilisé (la phénylbutazone a été introduite en thérapeutique en 1949, en raison des accidents très sévères notamment sanguine (agranulocytoses, aplasies médullaires) observés lors de leur emploi. Les principaux sont l'antipyrine et l'amidopyrine, ce sont des antipyrétiques et des analgésiques dont le mode d'action est analogue à celui des salicylates (Schmi, 1987).

1.1.2.6. Anti-inflammatoires salicylés

L'exemple de cette classe est l'acide acétylsalicylique (ASPIRINE).L'aspirine est probablement le médicament le plus utilisé et le plus vendu dans le monde. Il est le chef de file des anti-inflammatoires non stéroïdiens, le point est bien établi de son mode d'action et de son effet inhibiteur de la synthèse des prostaglandines (Moulin et Qoquelt, 2002).

1.1.2.7. Anti-inflammatoires propioniques

Cette classe d'anti- inflammatoires est d'efficacité probablement moindre que les précédentes, mais, incontestablement sa tolérance est meilleure : ce fait explique la concurrence existante entre les diverses spécialités de ce groupe et aussi l'effort promotionnel intense que leur est consacré sur un marché de très grande vente (Moulin etQoquelt, 2002). Les dérivés de l'acide propionique ont montré des propriétés anti- inflammatoires et sont utilisés dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Schmi, 1987).

1.1.2.8. Les Anti-inflammatoires sélectifsoucoxibsouanticox2

On appelle COXIBs les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase qui présentent *in vitro* un rapport des pouvoirs inhibiteurs respectifs de la COX2 et de la COX1 supérieur à 50. Il s'agit cependant toujours d'une sélectivité et non d'une spécificité.L'efficacité des COXIBs n'est pas supérieure à celle des AINS classiques. Dans les syndromes banaux et en traitement de courte durée il n'y a pas de raisons de les préférer auxAINS et analgésiques-antipyrétiques courants(Dangoumauet *al.*, 2006).

1.2. Médicaments analgésiques

Les analgésiques sont des médicaments destinés à supprimer ou à atténuer les douleurs. Ils soulagent la douleur et estompent les sentiments douloureux de souffrance qui l'accompagnent. Ils sont soit périphériques,agissant à l'endroit de la douleur,soit centraux, agissant sur le système nerveux central(Denis, 2005).

L'O.M.S a proposé de classer l'ensemble des antalgiques en trois paliers ou niveaux correspondant à la puissance et au rapport avantage/inconvénient des analgésiques. A l'origine pour les douleurs cancéreuses, cette classification peut s'utiliser pour traiter toute douleur sur le plan symptomatique (Labrèze,2002).

CHPITRE I : LES MEDICEMENTS ANTI-INFLAMMATOIRE ET ANALGESIQUES

1.2.1. Analgésiques du premier palier

C'est celui de l'emploi des antalgiques non morphiniques à action périphérique et non opiacés : le paracétamol, l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (A.I.N.S.). Ils sont utilisés pour les douleurs légères et de faibles intensités. Ils sont d'efficacité réduite par rapport aux autres antalgiques (Stora, 2005).

1.2.2. Analgésiques du deuxième palier

Ce sont des morphiniques faibles : ils sont utilisés si la douleur persiste ou augmente. Il s'agit de la codéine, de dextropropoxyphène, du tramadol et de la noramidopyrine (métamizole sodique). On les retrouve dans les traitements des douleurs légères à moyennes, ils permettent de soulager une douleur de manière plus efficace que les médicaments de palier 1 (Stora, 2005).

1.2.3. Analgésiques du troisième palier

C'est celui des antalgiques morphiniques majeurs, il est composé de la morphine et des morphiniques (Stora, 2005). On distingue le palier 3a quand les agonistes morphiniques forts sont administrés par voie orale et le palier 3b quand ils le sont par voie parentérale ou centrale. Utilisés dans les douleurs sévères et dans les douleurs d'origine cancéreuse (Labrèze, 2002).

2. STRUCTURE DES MEDICAMENTS

Nous avons choisi cinq médicaments (paracétamol, indométacine, voltarene, piroxicam, aspirine), le tableau 1 présente la structure, nom chimique et formule brute pour chaque médicament.

Tableau 1: les structures, formules brutes et noms chimiques des cinq médicaments choisis

Médicaments	Nom chimique	Formule brute et Masse moléculaire (Da)	Structure
Paracétamol (analgésique)	N-acétyl- <i>p</i> -aminophénol	C ₈ H ₉ NO ₂ 151,162598	

CHPITRE I : LES MEDICMENTS ANTI-INFLAMMATOIRE ET ANALGESIQUES

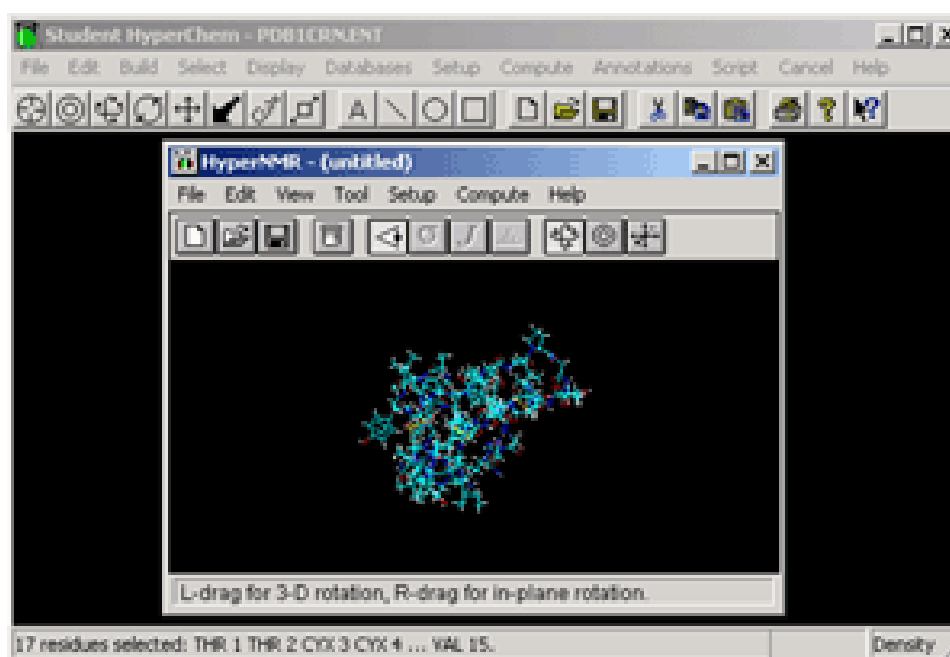
<p align="center">Indométacine (anti- inflammatoire)</p>	<p align="center">acide 1-(4- chlorobenzoyl)-5- méthoxy-2-méthyl-1H- indole-3-acétique</p>	<p align="center">$C_{19}H_{16}ClNO_4$ 357,787598</p>	
<p align="center">Voltarène (anti- inflammatoire)</p>	<p align="center">sodium 2-[2-(2,6- dichloroanilino)phényl e] acétate</p>	<p align="center">$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ 318,130493</p>	
<p align="center">Piroxicam (anti- inflammatoire)</p>	<p align="center">4-hydroxy-2-méthyl- N-2-pyridinyl-2H-1,2- benzothiazine-3- carboxamide de 1,1 dioxyde</p>	<p align="center">$C_{15}H_{13}N_3O_4S$ 331,346405</p>	
<p align="center">Aspirine (anti- inflammatoire)</p>	<p align="center">acide2- acétyloxybenzoïque</p>	<p align="center">$C_9H_8O_4$ 180,15742</p>	

Source : pubmedcompound

3. LES LOGICIELS UTILISENT

3.1. Hyperchem

L'hyperchem unit la visualisation 3D et l'animation avec des calculs de chimie quantique, biologie moléculaire, la mécanique et la dynamique, en mettant d'avantage l'outil de modélisation moléculaire à portée de main que tout autre programme de Windows.



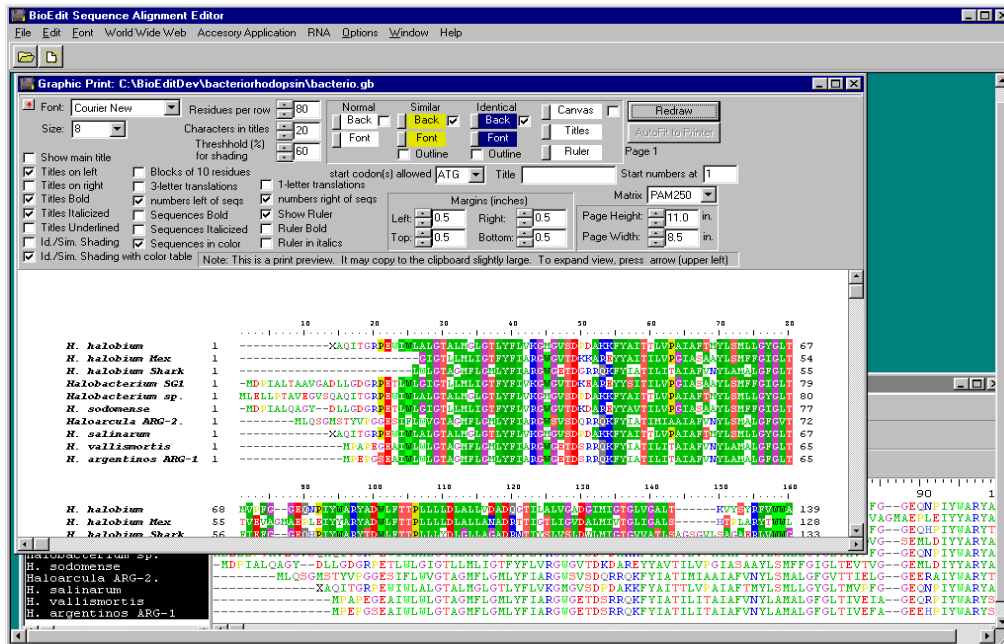
Source: <http://www.Hyperchem.com>

Figure 1.L'interface graphique de l'Hyperchem.

3.2. BioEdit

Le logiciel BioEdit est un éditeur d'alignement de séquences biologiques. Une interface intuitive avec des multiples fonctions pratiques permet l'alignement et la manipulation des séquences relativement faciles.

CHPITRE I : LES MEDICMENTS ANTI-INFLAMMATOIRE ET ANALGESIQUES

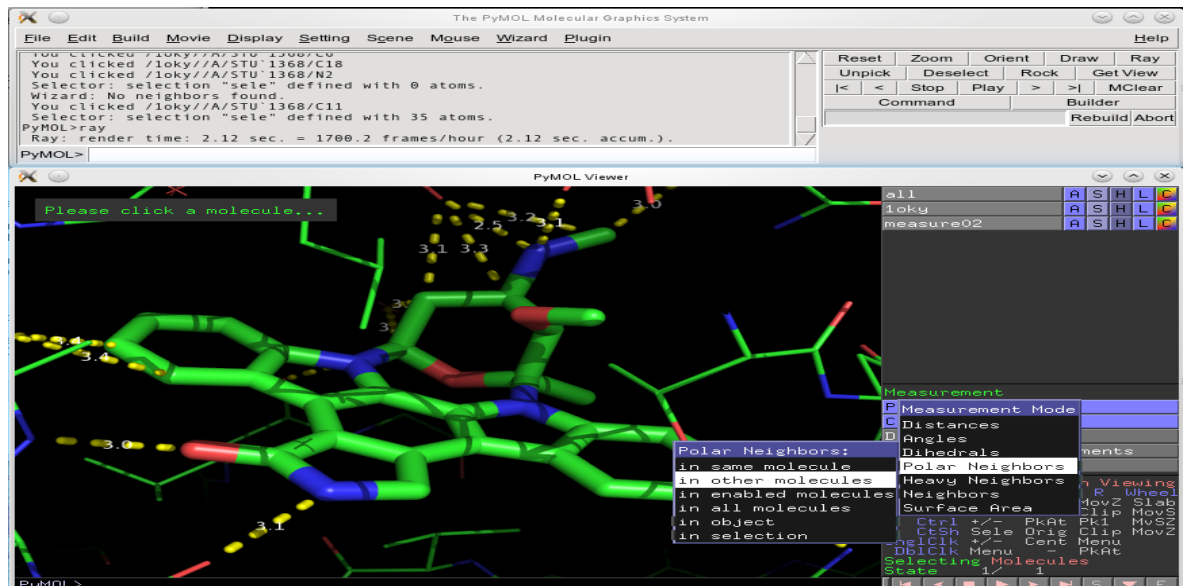


Source: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.html>

Figure 2. L'interface graphique de BioEdit.

3.3. PyMol

Le PyMol est un logiciel de visualisation moléculaire, édité par la société « DelanoScientific ». Il s'agit d'un logiciel gratuit.

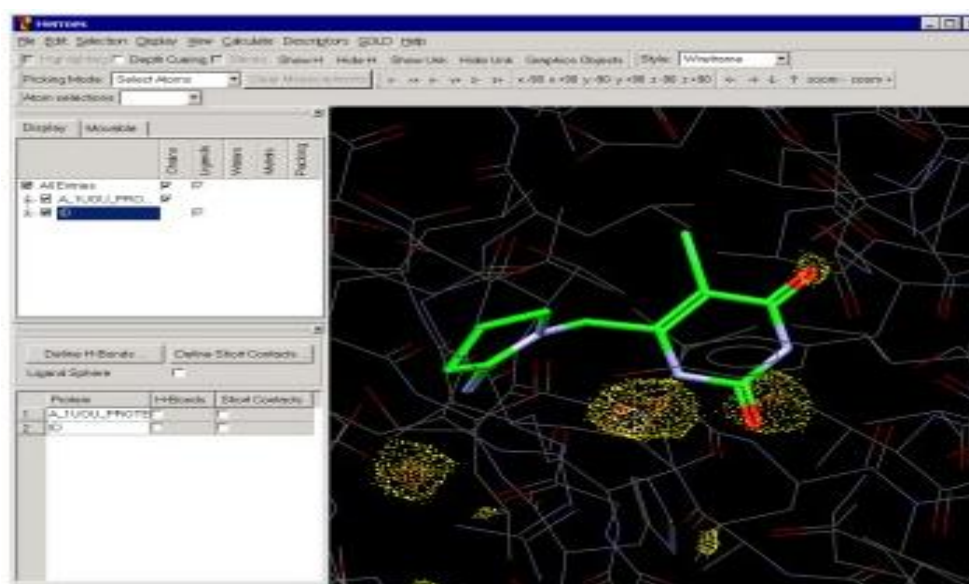


Source: <http://www.pymol.org>

Figure 3. L'interface graphique du PyMol.

3.4.GOLD

Le logiciel GOLD (Genetic Optimisation for ligand docking) utilise un algorithme génétique pour le docking de petites molécules (ou ligand) dans le site actif d'une protéine. GOLD considère le ligand comme flexible alors que la protéine est maintenue fixe sauf pour les groupements hydroxyles de certains résidus à savoir Tyrosine, Serine et Thréonine. GOLD a été paramétré avec un jeu de données de 314 complexes issus de PDB (Protein Data Bank, <http://www.pdb.org>), et la conclusion de ces tests est que GOLD prédit une solution similaire à la structure cristallographique dans 70-80% des cas.



Source: http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/

Figure 4. L'interface graphique du GOLD.

4. CONSTRUCTION DES MEDICAMENTS EN 3D

Nous avons construit les cinq inhibiteurs à l'aide du logiciel «ChemBio Office» selon la structure Lewis (figure 5). Nous avons sélectionné les atomes et les liés à des groupes fonctionnelles appropriés pour chaque inhibiteur, donc nous avons obtenus des structures bidimensionnelles. Ensuite nous avons converti les structures bidimensionnelles (2D) vers des structures tridimensionnelles (3D) à l'aide de ce logiciel.

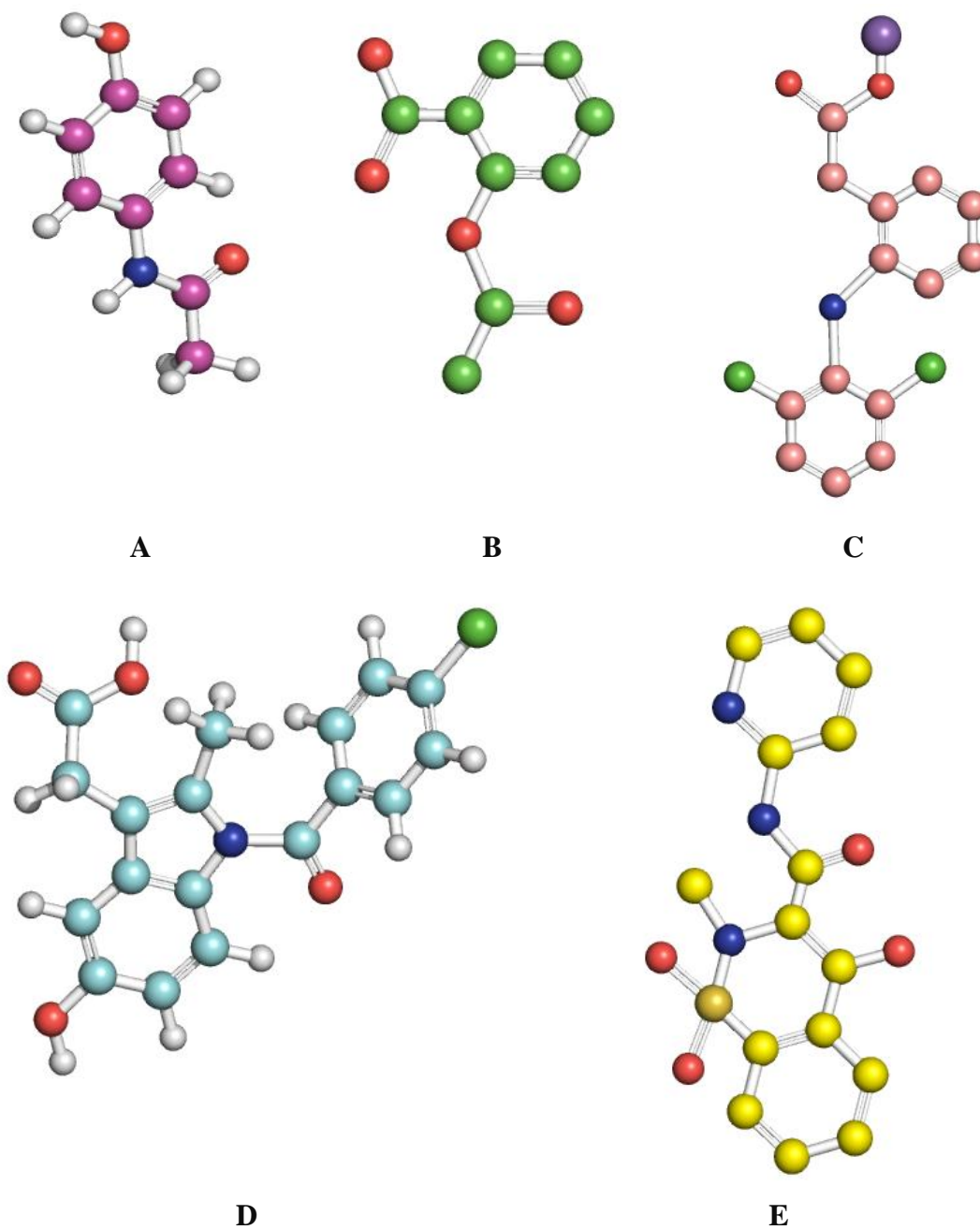


Figure 5. Structure des médicaments en 3D en boules et bâtonnets.
(A) paracétamol, (B) aspirine, (C) voltarène, (D) indométacine, (E) piroxicam.

5. OPTIMISATION DES MEDICAMENTS EN 3D

Après la construction des molécules inhibitrices, nous avons fait l'optimisation géométrique de ces inhibiteurs à l'aide du logiciel « Hyperchem » ainsi que la minimisation de l'énergie et de gradient jusqu'à la valeur 0,1 pour rendre les inhibiteurs plus stables énergétiquement (figure 6, 7, 8, 9 et 10).

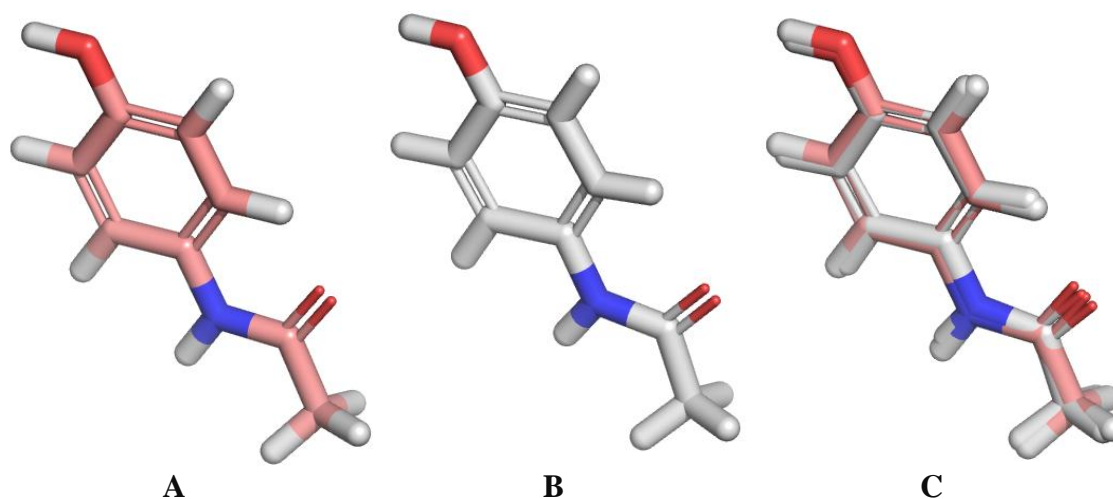


Figure 6. La structure de paracétamol sous forme bâtonnets « sticks » à l'aide du PyMol. (A) structure avant la minimisation d'énergie. (B) structure après la minimisation d'énergie. (C) superposition entre les deux structures.

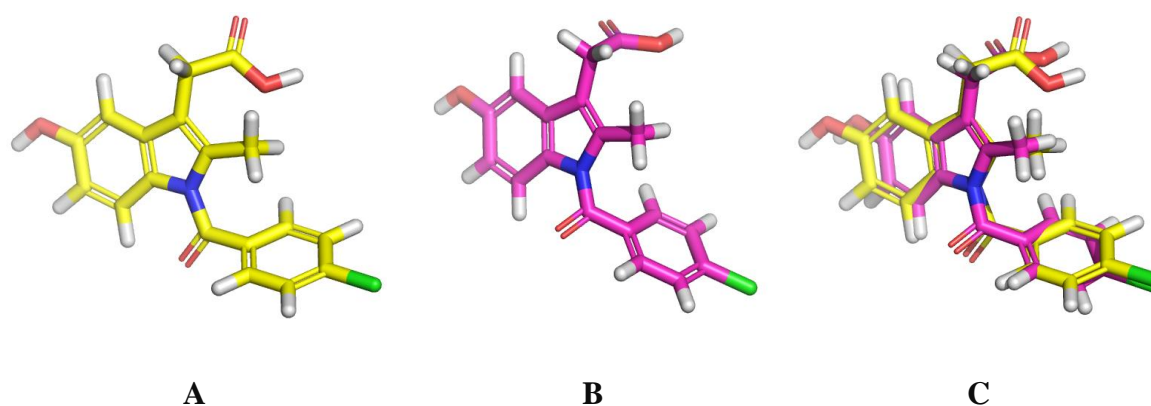


Figure 7. La structure d'indométacine sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol. (A) structure avant la minimisation d'énergie. (B) structure après la minimisation. (C) superposition entre les deux structures.

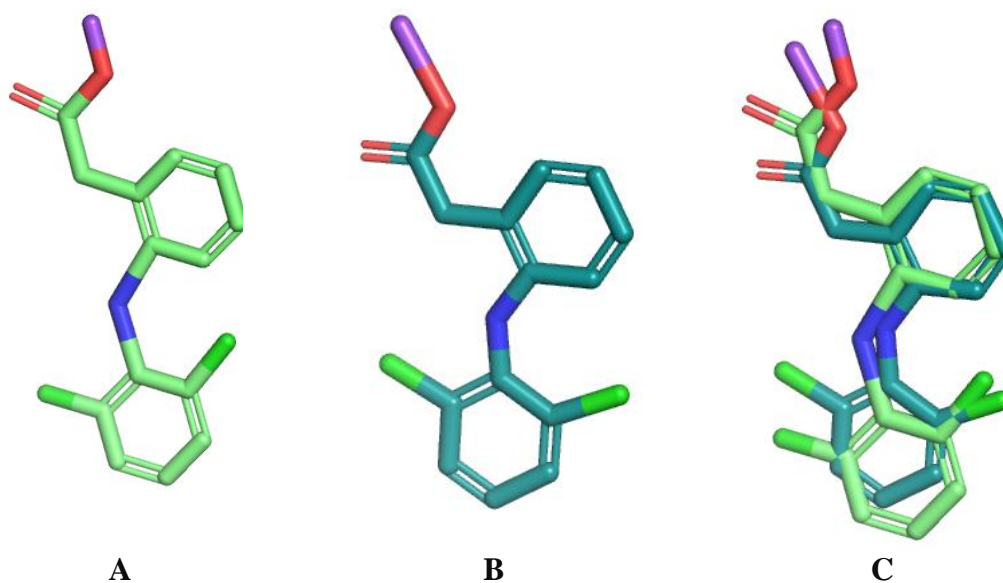


Figure 8. La structure de voltarène sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol.
(A) structure avant la minimisation d'énergie. (B) structure après la minimisation. (C) superposition entre les deux structures.

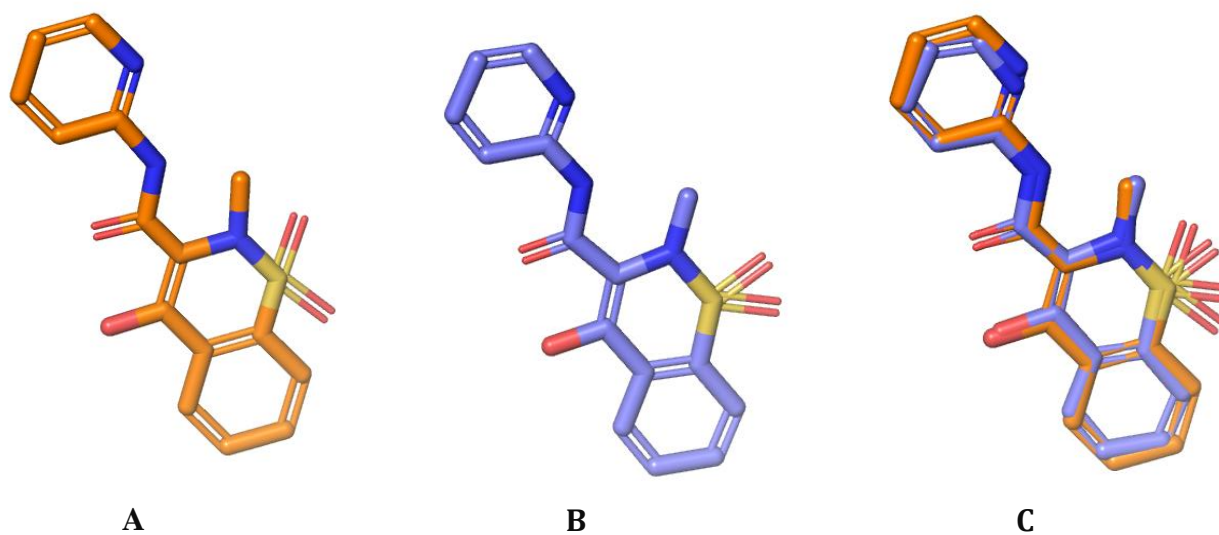


Figure 9. La structure de piroxicam sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol.
(A) structure avant la minimisation d'énergie. (B) structure après la minimisation. (C) superposition entre les deux structures.

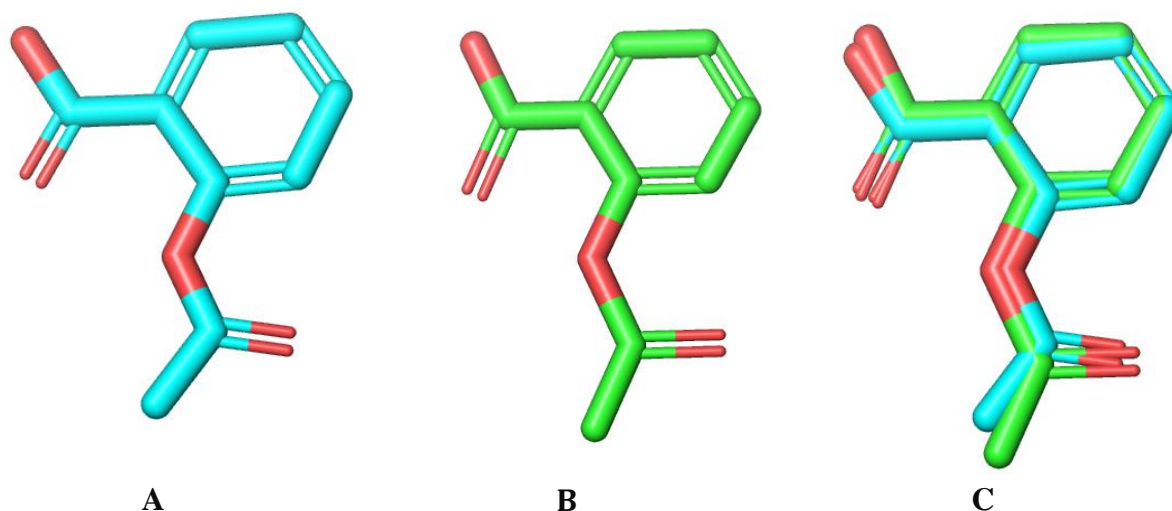


Figure 10. La structure d'aspirine sous forme bâtonnets à l'aide du PyMol.
 (A) structure avant la minimisation d'énergie. (B) structure après la minimisation. (C) superposition entre les deux structures.

6. RESULTATS ET DISCUSSION

Nous avons fait une minimisation d'énergie pour chaque médicament supposé d'être inhibiteur pour un but de restreindre leurs positions géométriques initiales afin de faciliter l'utilisation de ces structures dans le docking, le tableau 2 représente les valeurs d'énergie avant et après la minimisation ainsi le nombre des cycles minimisés.

Tableau 2. Valeurs d'énergie et de gradient des inhibiteurs avant et après la minimisation et leurs nombre des cycles minimisés.

Médicaments	Avant minimisation		Après minimisation		Nombre des cycles minimisés
	Energie (Kcal/mol)	Gradient	Energie (Kcal/mol)	Gradient	
Paracétamol	64,657819	37,825349	10,873770	0,079656	34
Indométacine	174,385311	41,608947	29,339247	0,088384	250
piroxicam	1273,184364	454,272466	186,363629	0,094406	57
Voltarène	889,246566	347,326059	24,081635	0,083081	78
Aspirine	129,718239	77,964932	9,398122	0,088845	39

En comparant le nombre de cycles de chaque médicament avec sa masse moléculaire (Présenté dans le tableau 1), nous avons enregistré l'existence d'une relation proportionnelle entre la masse moléculaire et le nombre de cycles de minimisation. Par contre, aucune relation n'a été trouvée pour l'énergie et le gradient car elle dépend de plusieurs facteurs comme : structure, atomes hétérogènes, électronégativité...

CHAPITRE II : LES LIPASES

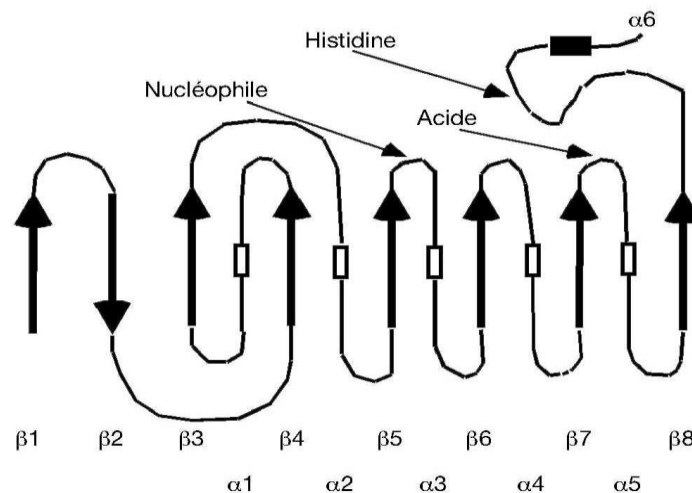
1. STRUCTURE BIOCHIMIQUE ET LE MECANISME CATALYTIQUE

Les lipases sont des enzymes ubiquitaires qui jouent un rôle central dans tous les aspects du métabolisme des graisses. Chez les humains et autres vertébrés, une variété de lipases pour contrôler la digestion, l'absorption, et la reconstitution de la graisse, ainsi que le métabolisme des lipoprotéines (Desnuelle, 1986). Chez les plantes, par exemple, les lipases sont abondantes dans les tissus de réserve d'énergie (Hassanien et Mukherjee, 1986). Les microorganismes sont également connus pour produire un large éventail de lipases extracellulaires des enzymes de dégradation (Lie *et al.*, 1991). Les premières structures cristallographiques publiées ont été celle de la lipase du champignon filamentueux *Rhizomucormiehei* (Brady *et al.*, 1990) et celle de la lipase pancréatique humaine (Winkler *et al.*, 1990). Depuis lors, ce sont plus de 60 structures tridimensionnelles qui sont accessibles au NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Bien que les séquences peptidiques montrent très peu de similitude entre elles, principalement en raison de l'hétérogénéité de leur origine, les lipases présentent dans l'ensemble la même structure tridimensionnelle (Ollis *et al.*, 1992 ; Derewenda, 1994). Différents travaux ont cependant permis le regroupement des lipases en sous-familles en fonction de leurs origines et de leurs rôles physiologiques respectifs (Anthons *et al.*, 1995 ; Drablos *et al.*, 1997 ; Arpigny *et al.*, 1999). Cependant, la découverte constante de nouvelles lipases ainsi que leurs caractérisations conduiront à l'évolution de cette classification. Récemment, l'analyse de la relation séquence-structure-fonction de 1367 séquences protéiques correspondant aux 806 lipases répertoriées dans la base de données LED (*Lipase Engineering Database*; <http://www.led.uni-stuttgart.de>) a permis de les classer en 16 superfamilles et 38 familles homologues (Pleisset *et al.*, 2000 ; Fischer *et al.*, 2003).

1.1. Les α/β hydrolases :

Le repliement α/β est le motif de base de nombreuses hydrolases telles que les lipases et les estérases mais également l'acétylcholine estérase, la carboxypeptidase, la diène lactone hydrolase, l'haloalkane déhalogénase. Ces enzymes ont tous en commun un domaine structural central typique formé par 8 feuillets β connectés par 6 hélices α formant un repliement dit α/β (Ollis *et al.*, 1992).

Autour de ce domaine central, viennent se greffer diverses structures peptidiques responsables des propriétés catalytiques de l'enzyme ainsi que de sa spécificité de substrat. Le site catalytique des lipases est constitué d'une sérine, d'une histidine et d'un acide carboxylique (Asp, Glu) dont l'ordre d'apparition dans la séquence primaire est Ser-Asp/Glu-His. De plus, la sérine catalytique est généralement incluse dans le penta peptide Gly-X1-Ser-X2-Gly où X1 et X2 représentent un acide aminé variable. Ce penta peptide est, en général, la seule portion de séquence peptidique conservée chez les lipases. La sérine catalytique est toujours située dans un coude nucléophile situé à l'extrémité C-terminale du 5^e feuillet β et immédiatement suivi d'une hélice α (Figure 11). L'histidine de la triade catalytique est située à l'extrémité carboxy-terminale du dernier feuillet constituant le repliement α/β tandis que l'acide carboxylique est généralement situé à l'extrémité du 7^e feuillet, sauf pour la lipase pancréatique où il est situé à l'extrémité du 6^e feuillet (Derewenda *et al.*, 1992 ; Dodson *et al.*, 1992 ; Cygler *et al.*, 1999).



Source : (Egloff *et al.*, 1995).

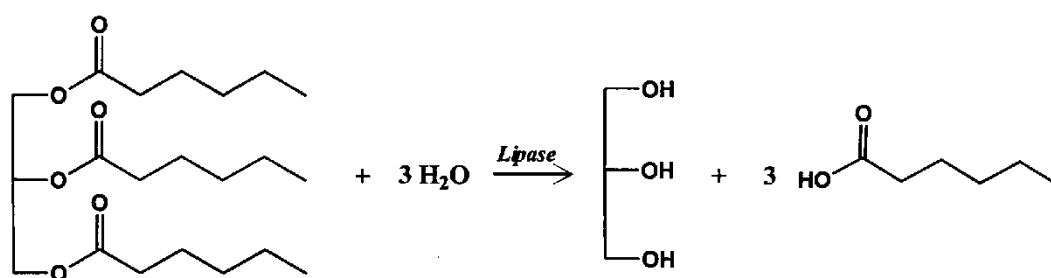
Figure 1. Schéma du repliement α/β .

Les flèches représentent les feuillets β et les rectangles les hélices α . Le rectangle noir représente le volet amphiphile

1.2. Mécanisme enzymatique d'hydrolyse :

Les triacylglycérolacyl-hydrolases, ou lipases (E.C.3.1.1.3), sont des enzymes atypiques par leur mécanisme d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du micro-environnement de l'enzyme, elles peuvent agir en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique. En tant qu'hydrolases, elles sont responsables

du catabolisme des triglycérides, leurs substrats préférentiels, en acide gras et en glycérol (Patrick Fickers *et al.*, 2008, Benarous, 2010).



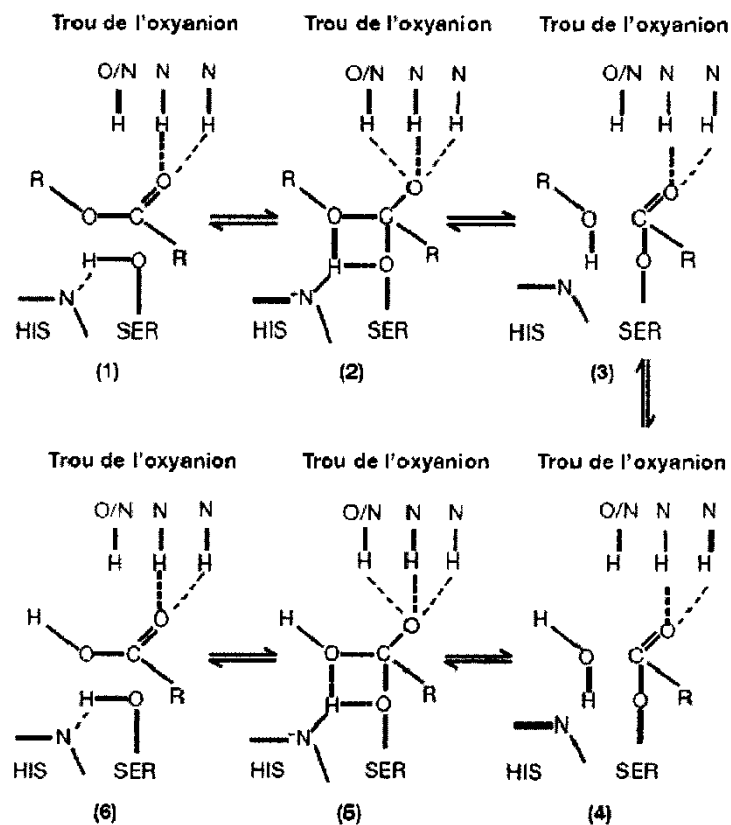
Source : (K.E.Jaeger *et al.*, 1994 ; Benarous,2010 ;Linani ,2011)

Figure 2. Réaction d'hydrolyse catalysée par la lipase en milieu aqueux

Le mécanisme enzymatique des lipases montre quelques similitudes avec celui des protéases à sérine active. Contrairement aux autres hydrolases, le site actif des lipases est généralement recouvert d'une boucle peptidique formée par une hélice α amphiphile d'une quinzaine d'acides aminés qui agit comme un volet (*lid*) (Schraget *al.* 1991; Derewenda *et al.*, 1992 ; Grochulski *et al.*, 1994) (Figure 12 et 13). Lorsque cette hélice recouvre le site actif, l'enzyme est dans sa forme fermée ou inactive. Dans cette conformation, la face hydrophobe de cette hélice amphiphile est en interaction avec des résidus hydrophobes entourant le site actif tandis que sa face hydrophile interagit avec des molécules d'eau. Le substrat ne peut donc pas être en interaction avec la triade catalytique. Dans la forme active ou ouverte de l'enzyme et suite au mécanisme d'activation interfaciale, il y a un déplacement de l'hélice α constituant le volet. La face hydrophobe de l'hélice orientée auparavant vers l'intérieur du site actif s'expose au solvant, créant une surface hydrophobe supposée interagir avec l'interface eau/corps gras. Le site actif de l'enzyme est alors accessible au substrat. La résolution de structures cristallographiques des lipases de *R. miehei* (Brzozowski *et al.*, 1991), de *Geotrichum candidum* (Schraget *al.*, 1993) et de la lipase pancréatique humaine (Winkler *et al.*, 1990 ; Miled *et al.*, 2000) a permis de mettre en évidence l'existence de cette hélice amphiphile recouvrant le site catalytique. Pour expliquer cette observation, l'hypothèse la plus plausible est qu'il existe, en solution aqueuse, un équilibre entre forme ouverte et forme fermée de l'enzyme et que le passage vers la forme ouverte correspond au déplacement de cette hélice α amphiphile recouvrant le site actif. Sur la base de données cristallographiques, certains résidus, différents de ceux de la triade catalytique, semblent être importants dans le mécanisme catalytique. Ces résidus

forment ce que l'on dénomme le trou de l'oxyanion (*oxyanionhole*). Leur rôle serait essentiellement de stabiliser des intermédiaires réactionnels, tels que les intermédiaires tétraédriques. Pour la lipase de *Humicolalanuginosa*, l'azote des fonctions amides de Ser83 et de Leu147 ainsi que le groupement hydroxyle de la Ser83 forment des liaisons hydrogènes avec les intermédiaires tétraédriques. Dans le cas de la lipase de *Candida rugosa*, ce sont les azotes des fonctions amides des Gly123 et Gly124 ainsi que l'Ala 210 qui semblent remplir la même fonction (Beer *et al.*, 1996).

L'hydrolyse d'un ester carboxylique par la triade catalytique peut se décomposer en six grandes étapes (Figure 13). Tout d'abord, le carbone de la fonction carboxylique du substrat subit une attaque nucléophile du groupement hydroxyle de la sérine dont le caractère nucléophile est augmenté par le résidu histidine suite à la formation d'une liaison hydrogène. L'anneau imidazole de l'histidine devient alors protoné et chargé positivement. Cette charge positive est stabilisée par une charge d'un résidu acide (Asp ou Glu) (1). Il en résulte la formation d'un premier intermédiaire tétraédrique, stabilisé par deux liaisons hydrogènes avec des résidus du trou de l'oxyanion (2). Par la suite, il y a libération d'une molécule d'alcool, formation de l'acyl-enzyme (3) et attaque nucléophile de l'acyl-enzyme par une molécule d'eau (4). Cette seconde attaque nucléophile aboutit à la formation d'un second intermédiaire tétraédrique, stabilisé par le trou de l'oxyanion (5). Finalement, il y a libération de l'acide gras et retour de l'enzyme dans sa conformation initiale (6) (Jaeger *et al.*, 1994; Wrinkler *et al.*, 1994 ; Beer *et al.*, 1996).



Source : Beer et al., 1996

Figure 3. Représentation schématisée de l'hydrolyse d'une liaison ester.
 (1) complexe de Michaelis non-covalent; (2) intermédiaire tétraédrique 1; (3) acylenzyme et libération de l'alcool; (4) attaque nucléophile de la molécule d'eau; (5) intermédiaire tétraédrique 2; (6) libération de l'acide gras.

Le mécanisme d'action de la lipase pancréatique met en œuvre des phénomènes plus complexes. Uneco-lipase est nécessaire pour assurer la fixation de l'enzyme sur le substrat. Le mécanisme d'activation interfaciale est dans ce cas sujet à controverse. En effet, Hermoso et ses collaborateurs ont démontré en 1997 que le système lipase-colipase-micelles (= sels biliaires) est activé dans l'eau avant de rejoindre l'interface (Hermoso et al., 1997).

2. LES MALADIES CAUSEES PAR LES LIPASES

2.1. L'obésité

L'obésité se définit médicalement comme une inflation de la masse grasse entraînant des conséquences sur le bien-être physique, psychologique et social. L'obésité humaine témoigne d'une mise en échec du système de régulation des réserves énergétiques par des facteurs externes (modes de vie, environnement) et/ou internes (psychologiques ou

Etude des structures tridimensionnelles des complexes lipase-inhibiteur par outils informatiques

biologiques en particulier génétiques et neuro-hormonaux) (Basdevant *et al.*,2004 ; World Health Organization « WHO »,1998in Basdevant,2006).

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre la prise d'énergie et la dépense énergétique; c'est-à-dire, quand un individu ingère plus que le corps dépense, la prise d'énergie excessive est stockée en cellules de graisse du corps qui agrandissent ou augmentent en nombre (Marsha Marcus et Jennifer Wildes, 2009).

La mesure de la masse grasse étant difficilement objectivable en pratique médicale courante, l'obésité se définit(WHO, 1998 in Sanguignol, 2008).Aujourd'hui par l'indice de masse corporelle (IMC) qui se calcule en divisant le poids (en kilos) par la taille (en mètre) au carré : $IMC (kg/m^2) = Poids/Taille^2$.

On parle de poids normal si le chiffre trouvé est compris entre 18,5 et 24,9 kg/m^2 .

On parle de surpoids si le chiffre trouvé est compris entre 25 et 29,9 kg/m^2 .

On parle d'obésité à partir du chiffre 30 kg/m^2 . Les obésités sont classées en trois stades :

- l'obésité de classe 1 : entre 30 et 34,9 kg/m^2 , dite obésité modérée ;
- l'obésité de classe 2 : entre 35 et 39,9 kg/m^2 , dite obésité sévère ;
- l'obésité de classe 3 : à partir de 40 kg/m^2 , dite obésité morbide(Sanguignol, 2008)

Un lien de causalité entre l'obésité et de nombreuses complications appelées comorbidités a été établi. Celles-ci peuvent être : soit à risque vital (risque cardiovasculaire, coronaropathies, diabète et certains cancers), soit source de handicaps importants (risque respiratoire, pathologie ostéoarticulaire, problèmes dermatologiques et de fertilité) (American Gastroenterological,2002 in Merroucheet *al.*,2005).Ces comorbidités peuvent diminuer l'espérance de vie des patients (Sjoström LV,1992 in Merroucheet *al.*,2005).La prédominance de l'obésité a été significativement augmentée au cours des 30 dernières années, et environ 32 % des adultes dans les états unis sont actuellement obèses (Stolley *et al.*,2008).

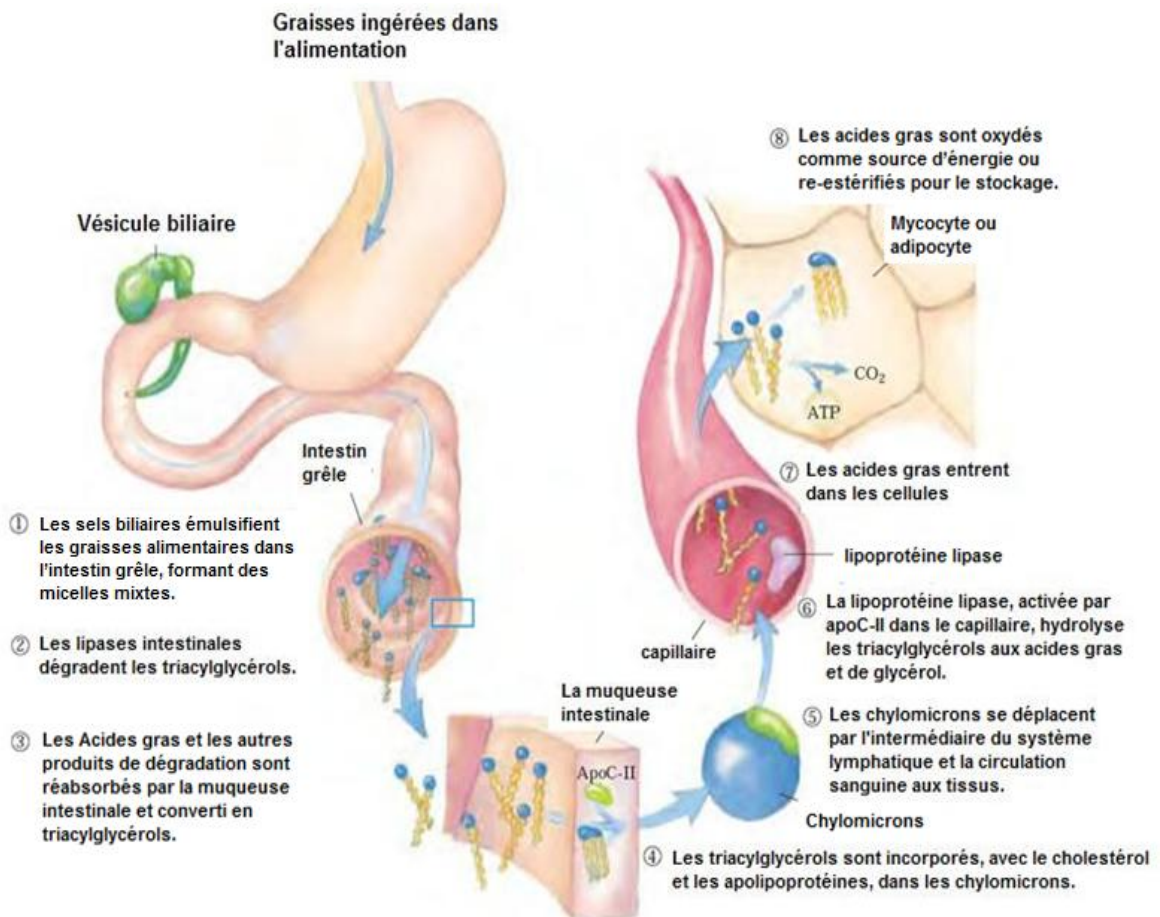
La lipase pancréatique (figure 14) est le principal enzyme responsable de la digestion des lipides alimentaires. Elle agit principalement sur les diglycérides libérés par la lipase gastrique. Elle est sécrétée dans le duodénum et fonctionne à des pH légèrement alcalins, contrairement à la lipase gastrique. Les produits de la lipolyse sont, suite à son action, véhiculés à l'aide des agents tensioactifs naturels que sont les sels biliaires. L'activité de la lipase pancréatique peut s'exercer en présence ou en absence des sels biliaires. En leur absence, la lipase s'adsorbe d'abord à l'interface lipide/eau avant d'hydrolyser les esters carboxyliques. Par contre, en présence de ces sels biliaires, la lipase pancréatique est

inactive, mais son activité est restaurée par un cofacteur protéique appelé colipase (figure15) (Borgstrom *et al.*, 1973).



Source : Van Tilbeurgh *et al.*, 1993, code pdb 1LPA

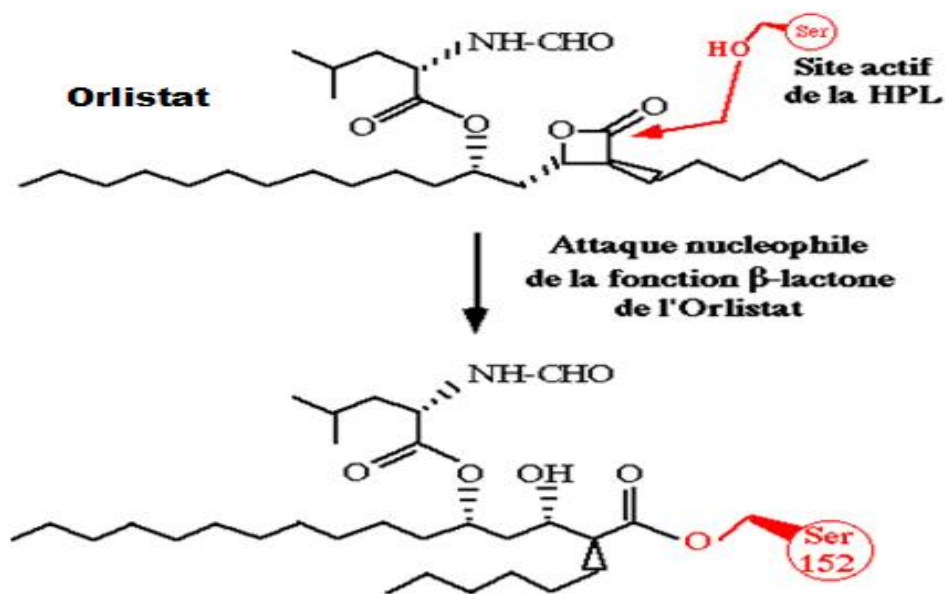
Figure 4. Structure tertiaire de la lipase pancréatique humaine. Les acides aminés du site actif sont en bleu Ser 152, His 263 et Asp 176



Source : Nelson et Cox, 2005

Figure 5. Le traitement des lipides alimentaires chez les vertébrés. Ladigestion et l'absorption des lipides alimentaires se produisent dans l'intestin grêle, et Les acides gras libérés à partir de triacylglycérols sont emballés et livrés aux muscles et les tissus adipeux

L'orlistat (tétrahydrolipstatine) est un inhibiteur compétitif de la lipase qui appartient à une nouvelle classe des médicaments anti-obésité. Il empêche la lipolyse des triglycérides diététiques (TG), et réduit ainsi l'absorption intestinale suivante de la graisse. La lipase pancréatique humaine (LPH) a été la cible principale dans le développement d'Orlistat (figure 16). L'inhibition de la lipase gastrique humaine (LGH) par Orlistat" a été également étudiée *in vitro* mais n'avait pas été encore étudiée au cours des repas d'essai. Dans les études les plus cliniques, les effets d'Orlistat ont été estimés indirectement à partir des gros niveaux fécaux d'excrétion, mais l'inhibition exercée sur les lipases digestives et les niveaux de la lipolyse n'ont pas été mesurés simultanément *in vivo* (Frédéric Courrière *et al.*, 2001).



Source : Courrière *et al.*, 2001

Figure 6. Le mécanisme d'inhibition de la lipase pancréatique humaine par l'orlistat

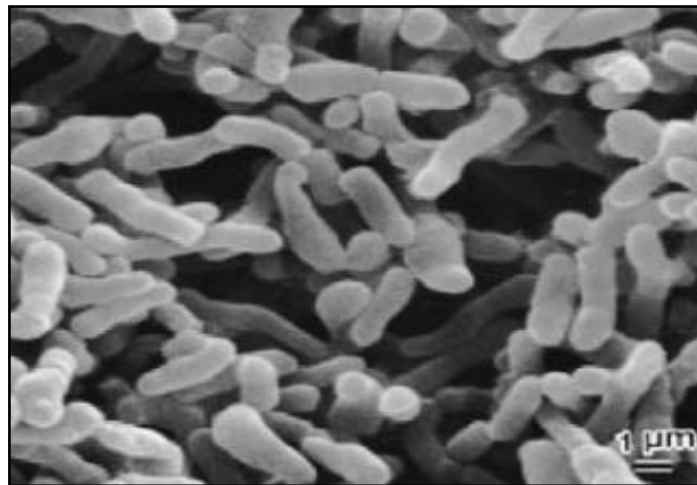
2.2.L'acné

L'acné, est la maladie la plus commune associée à la bactérie *Propionibacterium acnes* (connue aussi sous le nom de *Corynebacterium acnes/parvum*, figure 17) (Jappe, 2003 ; Toyoda et Morohashi, 2001). Est une pathologie inflammatoire chronique du follicule pilosébacé évoluant par poussées. Elle touche 70 à 80 % des adolescents et peut être à l'origine de cicatrices. Elle apparaît à la puberté et disparaît le plus souvent à l'âge adulte (Dreno, 2010). L'acné touche les adolescents entre 12 et 18 ans. Les jeunes adultes de plus de 20 ans, particulièrement les femmes, peuvent être également atteints (Pawin *et al.*, 2007 in Dreno, 2010).

L'acné est une éruption folliculaire qui commence comme un comédon, prospère alors une inflammation qui entraîne à la formation de papules et pustules rouges. Plusieurs patients souffrant d'acné subir une résolution complète de leur lésions ne présentent aucun symptôme restants, alors que d'autres patients ont l'acné continue ou de longue durée et comme conséquences, ils auront des cicatrices et des chéloïdes (figure 18).

Les lésions initiales non inflammatoires ont été vérifiées par la microscopie optique et par microscopie électronique (Toyoda et Morohashi, 2001). Ceci conduit à un micro comédon, qui va progresser vers un comédon fermé ou ouvert.

Les lésions inflammatoires sans doute commencent lorsque la prolifération de *Propionibacteriumacnes* attire les neutrophiles aux follicules sébacés. Le contenu diffuse dans le derme qui déclenche l'inflammation. Dans la plupart des cas, l'inflammation disparaît progressivement, subsistent sur quelques jours à 2 semaines. Comme il a été largement connu, l'organisme prédominant est *P. acnes*(Puhvelet *al.*,1975 in Higaki, 2003).



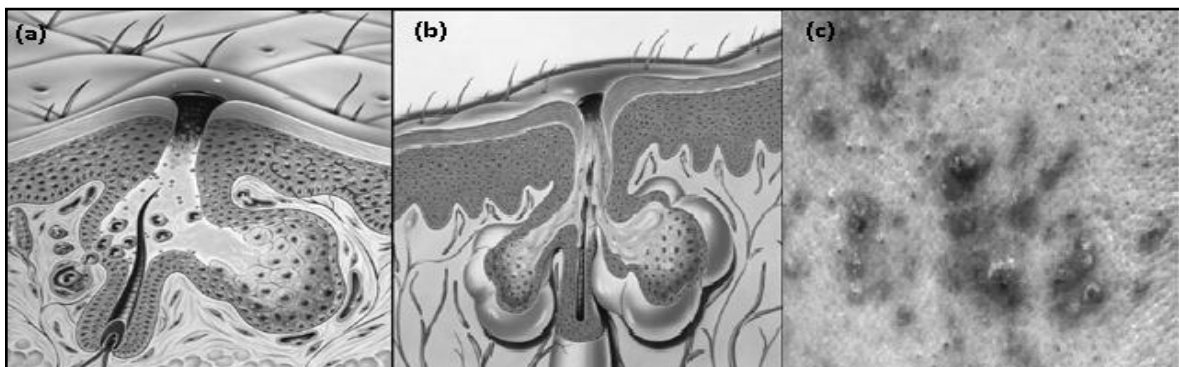
Source : Toyoda et Morohashi, 2001

Figure 7. Microphotographie de balayage électronique de *P. acnes*

La multiplication de *P. acnes*, la surproduction de sébum, et l'hyper kératinisation folliculaires sont trois facteurs consécutifs physiologiques dans la pathogenèse de l'acné. Il est bien établi que l'abondance des acides gras libres dans les lésions détectées en tant que formes d'acné par l'effet de la lipase de *P. acnes* sur les triglycérides sébacées. Les acides gras libres stimulent l'épithélium folliculaire suffisamment pour aboutir à sa rupture, qui permet alors d'obtenir ceux à travers le derme et pour induire l'inflammation (Higaki, 2003). Marples *et al.* (1971 in Higaki, 2003) a signalé qu'une diminution des acides gras

libres précède une baisse dans le nombre de *P. acnes*. L'injection intradermique des acides gras libres dans les sujets sains provoque de graves l'inflammation (Strauss et Pochi, 1965 in Higaki, 2003). La lipase de *P. acnes* elle-même peut agir comme un facteur chimiotactique (Lee *et al.*, 1982 in Higaki, 2003), et il est probable que d'autres facteurs contribuent et qui ont été traités légèrement jusqu'à ce jour (Puhvelet Sakamoto, 1978 in Higaki, 2003). De ce fait, l'importance de la lipase de *P. acnes* dans l'acné a également été fortement confirmée (Kellum, 1968 in Higaki, 2003).

La lipase de *P. acnes* a quelques propriétés intéressantes. Elle clive aux positions α et β des triglycérides simultanément, en libérant des acides gras libres et de glycérol. La lipase de *P. acnes* est stable et active au pH compris entre 5 et 8; si le pH est inférieur à 5, l'activité de *P. acnes* lipase est plus faible. Bien que d'autres facteurs aient été récemment discutés avec l'égard de la pathogenèse de l'acné, la lipase de *P. acnes* a toujours été considérée comme un élément important dans la pathogenèse de l'acné. En outre, nous ne devrions pas ignorer l'existence de phosphatase acide et la protéase, qui sont des enzymes extracellulaires produites par *P. acnes* (Ingham et Cunliffe, 1981 in Shuichi Higaki, 2003) Ces enzymes peuvent également être d'importance dans l'acné inflammatoire.



Source : Sheen, 2004 ; Benarous, 2010

Figure 8. Les différentes étapes du développement de l'acné.

(a): Les follicules pileux obstrués et infectés forment des acnés sous la peau. (b): L'infection survient quand les bactéries entrent dans un follicule pileux obstrué, faisant devenir le secteur autour de follicule gonflé et douloureux. (c): Les papules sont petites, des boutons rouges se forment quand un comédon fermé éclate et l'infection se propage aux tissus environnants

La thérapie d'acné consiste à la réduction de la production de sébum, réduction de l'hypercornification, inhibition de la croissance de *P. acnes* (et la réduction de la synthèse et/ou l'activité des enzymes de *P. acnes* et des antigènes pro-inflammatoires), et réduction de l'inflammation. L'acné douce est traitée en utilisant des composés comme : les rétinoïdes (tretionine, tazarotene, adapalene), qui sont sebostatiques, kératolytiques, et les médicaments anti-inflammatoires, ou le peroxyde de benzoyle, qui sont kératolytiques et

anti-*P. acnes*. Ces composés ont une efficacité limitée, ainsi l'acné douce modérée exige la combinaison des traitements précédents avec des antibiotiques tels que les tétracyclines (tétracycline, clindamycine, minocycline, etc.) ou les macrolides (érythromycine ou roxithromycine).

2.3.L'ulcère

L'Helicobacter pylori (appelée aussi des *Campylobacter pylori/pyloridis*) est à Gram négatif, à forme spirale, flagellé (unipolaire ou bipolaire) (figure 42). Cette bactérie a été principalement trouvée chez l'homme et d'autres animaux (primats, chats, etc.), elle vit dans les segments antrale et fundique de l'estomac (entre la couche de la muqueuse et la surface des cellules épithéliales figure 19), et dans le duodénum. Le mode de la transmission de l'infection de *H. pylori* n'est pas encore bien identifié (Nagorni, 2000; <http://www.helicobacterspain.com> in Ruiz, 2005).

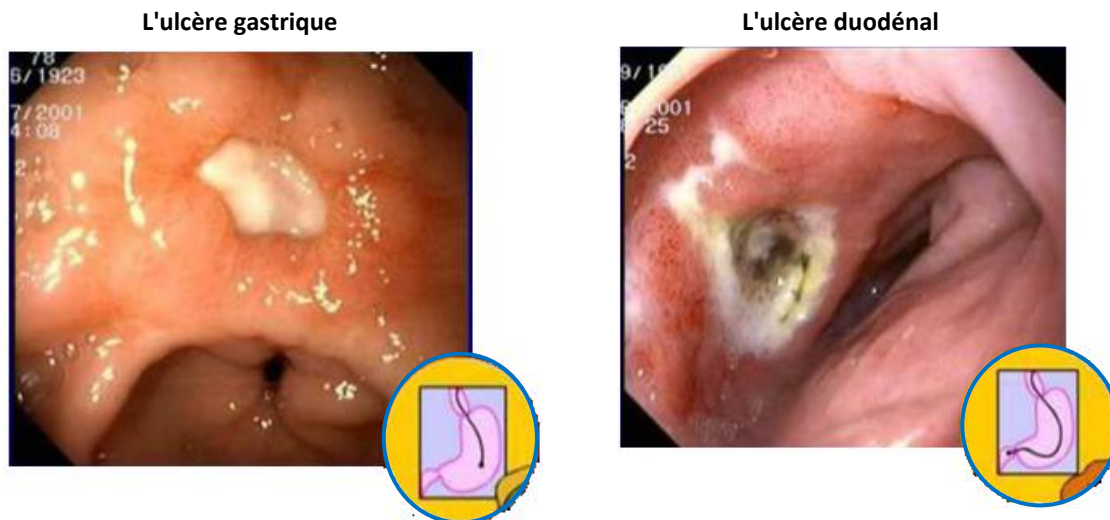


Source : <http://www.helicobacterspain.com> in Ruiz, 2005.

Figure 9. Microphotographie de transmission de *H. pylori*

H. pylori a suscité un grand intérêt car elle a été isolée par Warren et Marshall en 1983 (Nagorni, 2000) à partir de biopsies gastriques, car elle provoque l'une des plus infections répandues dans le monde entier. *H. pylori* colonise environ 60% de la population mondiale, mais une prévalence plus élevée est associée au statut socio-économique faible, surpeuplement et d'âge plus élevé, étant aussi élevée que 90% chez les adultes des pays en développement. La plupart des individus infectés développent des gastrites asymptomatiques, mais pour environ 1 personne sur 10, l'infection à *H. pylori* est associée au développement de gastrite chronique, ulcères gastro-duodénaux (ulcères sur la paroi de l'estomac ou du duodénum; Figure 20), ou systémiques, les maladies cardiovasculaires,

respiratoires, neurologiques, auto-immunes, et lacroissance troubles, entre autres maladies (Nagorni, 2000; <http://www.helicobacterspain.com> in Ruiz, 2005).



Source : <http://www.helicobacterspain.com> in Ruiz, 2005

Figure 10. Les ulcères peptiques vus comme une altération de la muqueuse de couleur blanc-brun

L'approche thérapeutique la plus acceptée recommande un inhibiteur de la sécrétion acide par les cellules pariétales (Inhibiteurs de la pompe à protons: comme l'oméprazole, Pantoprazol, etc; ou antagonistes des récepteurs H_2 : ranitidine, famotidine, etc) et deux antibiotiques (clarithromycine ou le métronidazole en association avec l'amoxicilline), ou amoxicilline en association avec le métronidazole ou la tétracycline (Pernaet *al.*, 2003). Toutefois, des études récentes ont montré des résultats décevants avec ces régimes, principalement en raison de la situation d'urgence rapide de la résistance bactérienne aux antibiotiques utilisés (Nagorni, 2000). Ainsi, la recherche sur les thérapies alternatives est en cours, y compris l'utilisation de composés antiulcéreux obtenus à partir de médicaments à base de plantes qui, généralement, ils ont un large éventail d'activités bénéfiques tels que les anti-*Hpylori*, anti-inflammatoires, et effets antioxydants, l'inhibition de la sécrétion acide ... (Borrelli et Izzo, 2000).

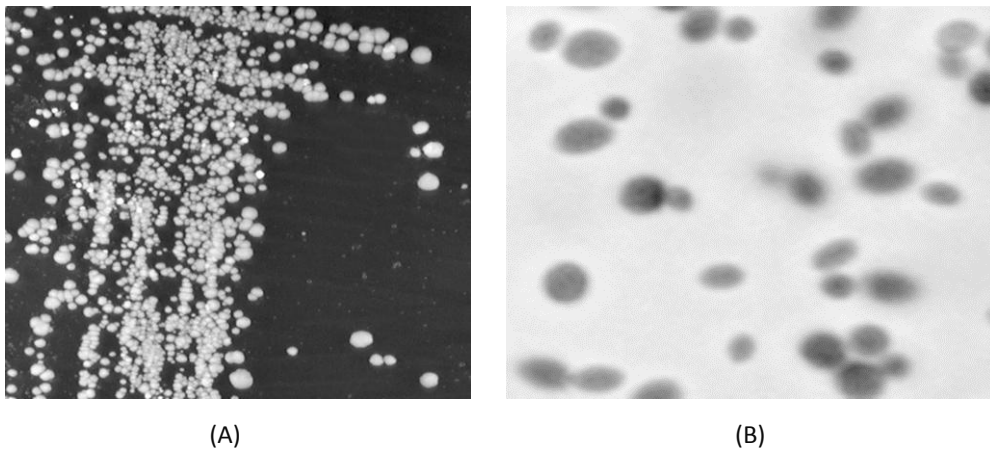
2.4. La candidose

Les candidoses sont des mycoses cosmopolites de fréquence croissante dues à des levures du genre *Candida*. Cet agent saprophyte endogène ou exogène peut se comporter en opportuniste sur des terrains favorisant, tels que les patients des services d'hématologie ou

de soins intensifs chez lesquels ils sont fréquemment associés. Dans ce contexte, les candidoses invasives sont associées à une mortalité élevée (Essendoubi, 2007).

Les *Candida*, sont des micro-organismes commensaux, endo- ou exogènes, diversement adaptés au parasitisme et dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisants, dits « facteurs de risque », locaux ou généraux (Develoux et Bretagne, 2005).

Le genre *Candida* comprend environ 200 espèces dont les plus rencontrées en pathologie humaine sont : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* (figure 21), *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* et *C. dubliniensis* (Fitzpatrick, 2006 ; James *et al.*, 2006 ; Lodder, 1970 in Beuchr, 1970).



Source : Vandeputte, 2008

Figure 11. Morphologie de *Candida glabrata*.

(A) Observation macroscopique de colonies sur milieu de Sabouraud (taille réelle). (B) Observation en microscopie photonique de blastospores en suspension dans du bleu lactique (grossissement x 1000)

Les infections à *Candida* sont responsables soit d'invasions multi viscérales (systémique) soit de formes localisées cutanéomuqueuses (superficielle). (Touyaret *al.*, 2010). Les candidoses superficielles sont très répandues et peuvent toucher l'ensemble des muqueuses et la peau (Figure 22). Les candidoses orales concernent à la fois les personnes immunocompétentes et immunodéprimées, plus de 80% des patients infectés par le virus d'immunodéficience humaine (VIH) développent une candidose orale au cours de la maladie. *C. albicans* constitue encore aujourd'hui l'agent principal impliqué dans les candidoses de la sphère oropharyngée et oesophagiennes. *C. albicans* est également responsable de la grande majorité des cas, près de 90%, des candidoses digestives (Gales, 2009).



Source : Abdelkhaled et al., 2005

Figure 12. Candidose buccale

Les levures peuvent se disséminer à partir d'une colonisation des muqueuses suivie d'un passage dans le flux sanguin, ce qui correspond à une candidose systémique d'origine endogène. Il peut y avoir également apparition d'une candidose systémique à partir d'une origine exogène comme un cathéter. En France, *C. albicans* représentait, en 2006, la source majeure de candidoses invasives parmi les infections nosocomiales à *Candida* en milieu hospitalier (Hennequin et al., 2008 in Gales, 2009). Ainsi une colonisation à *Candida* peut induire des infections viscérales profondes touchant un organe (le foie, les reins en particulier) ou l'ensemble de l'organisme. Il faut alors distinguer les candidoses profondes, des candidémies, les candidoses systémiques recouvrant ces deux types de candidoses avec plusieurs sites touchés. Les candidoses profondes correspondent à l'atteinte d'au moins un organe ou un site stérile par *Candida*. Les candidémies, ou septicémies à *Candida*, sont définies par une hémoculture positive. Les candidémies ont une incidence de 1 à 24 cas pour 100 000 individus et sont associées à une mortalité supérieure à 30% (Gudlaugsson et al., 2003 ; Wisplinger et al., 2004 in Gales, 2009).

Le diagnostic des candidoses repose sur la recherche d'éléments fongiques dans les lésions, par l'examen direct du prélèvement, et par l'isolement de *Candida* en culture suivi de l'identification de l'espèce.

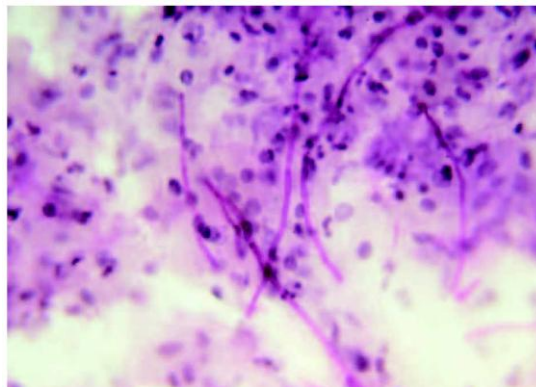
L'examen direct du prélèvement permet une orientation rapide du diagnostic. Il se fait au microscope, à l'état frais entre lame et lamelle. Il est facilité par l'emploi de colorants pour accentuer les contrastes. En particulier, l'emploi d'agents clarifiants (Calcofluor®),

Blankophor®, Uvitex®) permet de mieux identifier les éléments fongiques sous réserve d'employer un microscope à fluorescence avec des jeux de filtres adéquats (Figure 23). L'examen à faible grossissement permet de lire rapidement un matériel important. Les levures apparaissent sous forme arrondie ou ovale, de 6 à 8 µm dans leur plus grande longueur (Figure 24). La présence de filaments oriente vers les espèces capables d'en produire et élimine ainsi *C. glabrata*, incapable de filamenter. Les levures sont également visibles sur des frottis colorés au Gram (les levures sont à Gram positif), mais la lecture à un fort grossissement pour observer les bactéries diminue la sensibilité de cet examen (Develoux M et Bretagne S, 2005).



Source : Develoux M et Bretagne S, 2005

Figure 13. Examen direct d'une hémoculture positive à l'aide d'un Microscope à fluorescence En utilisant un agent clarifiant (Blankophor®). Examen à faible grossissement ($\times 200$) montrant des levures bourgeonnantes Sans filament identifiées après culture comme *Candida kefyr*



Source : Agbo-godeau et Guedj, 2008

Figure 14. Filaments et spores de *Candida albicans* à l'examen direct d'un frottis après coloration à l'acide périodique Schiff

Les produits sont ensemencés sur deux milieux de culture en tube: milieu gélose-glucose de Sabouraud enrichi en chloramphénicol éliminant les contaminants bactériens, et milieu gélose-glucose de Sabouraud enrichi en actidione qui inhibe ou

retarde le développement de levures saprophytes de la peau. L'isolement de la levure se fait en 24 à 48 heures. Elle se fait par le test de blastèse ou test de filamentation des levures. La culture en milieu pomme de terre-carotte-bile (PCB) est spécifique de *Candida albicans* par la formation de chlamydospores caractéristiques, terminales ou latérales, rondes ou ovales, à parois épaisses de 6 à 12 μm de diamètre (Figure 25). Le procédé de Taschdjian est basé sur la formation de filaments dans le sérum (quelques gouttes d'une suspension de levures dans 0,5 ml de sérum humain sont incubées de 2 à 4 heures à 37 °C; seul *Candida albicans* filamente dans le sérum). Les autres levures sont étudiées par test d'assimilation des sucres ou fermentation des sucres, qui permet d'identifier des espèces occasionnellement pathogènes: *Candida tropicalis*, *Candida pseudo-tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* (Agbo-godeau et Guedj, 2008).



Source : Develoux et Bretagne, 2005

Figure 15. Aspect des colonies de différentes espèces de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*) sur un milieu chromogène

L'arsenal antifongique s'est considérablement diversifié ces dernières années avec la commercialisation de nouvelles formulations lipidiques de l'amphotéricine B, le développement de nouvelles molécules dans des classes d'antifongiques connues (voriconazole) et l'apparition d'un nouvel antifongique (caspofungine) dans une nouvelle classe d'antifongiques, les échinocandines. Les principales familles et leurs modes d'action sont résumés dans le Tableau 3. Le traitement antifongique, quelle que soit la gravité des levures, ne se conçoit qu'en prenant en compte les facteurs dermiques, locaux et généraux, et leur traitement. La suppression des facteurs locaux a un rôle majeur dans les atteintes cutanées. L'ablation de matériel étranger est souvent un prérequis pour la stérilisation des

foyers lors des candidoses profondes. Il ne faut pas non plus oublier l'intérêt de la chirurgie qui doit être discutée dans certaines localisations (Develoux et Bretagne, 2005).

Tableau 1. Principales classes d'antifongiques et mode d'action

Produit	Cible	Activité
Amphotéricine B	Stérols membranaires	Formation de pores membranaires, fuite osmotique
Flucytosine ^a	Acides nucléiques	Altération de la synthèse d'ADN
Azols	Inhibition de la C-14- α -déméthylase	Altérations des stérols membranaires
Allylamine ^b	Inhibition de la squalène-2,3-époxydase	Altérations des stérols membranaires
Caspofungine	Synthèse du β -(1-3)-glucane de la paroi	Altération de la paroi, fuite osmotique

Source : Develoux M et Bretagne S, 2005

^a. La flucytosine ne se prescrit jamais en monothérapie. Le dosage sanguin est souhaitable pour éviter les surdosages sources des effets secondaires.

^b. Les allylamines n'ont pas d'autorisation de mise sur le marché pour les levures.

3. CHOIX DES LIPASES ET TELECHARGEMENT

Nous avons choisi deux enzymes : lipase pancréatique humaine (LPH) et lipase de *Candida rugosa* (LCR) dont nous avons téléchargé à partir de la PDB « Protein Data Bank » (figure 26) (qui représente une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (ou structure 3D) des macromolécules biologiques : protéines, essentiellement, et acides nucléiques), par l'insertion de leurs codes dans la banque (PDB-ID : 1LPA, PDB-ID : 1CRL), respectivement. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

Nous avons sélectionné ces structures des deux enzymes (LCR, LPH) pour les raisons suivantes :

- Haute représentation (résolution) qui révèle sur le site actif.
- La conformation ouverte active pour chaque enzyme accessible au substrat.



Source : www.pdb.org

Figure 16. La page d'accueil du pdb

4. COMPARAISON ENTRE LES STRUCTURES 3D DES DEUX ENZYMES

Les informations structurales des deux lipases sont présentées dans le tableau 4 qui sont obtenues à partir des fichiers PDB.

Tableau 2. Informations des deux lipases

La lipase	Lipase pancréatique humaine	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
Code PDB	1LPA (open) 1N8S (Closed)	1CRL (open) 1TRH, 1GZ7 (Closed)
Nombre des acides aminés	534 Gly 6-Val 90 (chaîne A) Lys 1-Cys 449(chaîne B)	534 Ala1-Val534
Nombre de chaîne	2	1
Ligand	PLC452, BNG 450, CA 451	NAG990, NAG991, NAG994

Après une visualisation des structures tridimensionnelles par le logiciel PyMol, nous avons remarqué que la lipase pancréatique humaine « LHP » de code pdb 1LPA pour la conformation ouverte (open) et de code pdb 1N8S pour la conformation fermée (closed) présente une structure tridimensionnelle tertiaire constituée de 9 hélices α (colorés en rouge en forme cylindrique), de 21 feuillets β (colorés en jaune en flèche) et des coudes α et β (figure 27).

La lipase de *Candida rugosa* « LCR » de code pdb 1CRL pour la conformation ouverte (open) et de code pdb 1TRH pour la conformation fermée (closed) présente une structure tertiaire constituée de 16 hélices α (colorés en rouge en forme cylindrique), de 14 feuillets β (colorés en jaune en flèche) et des coudes α et β (figure 27).

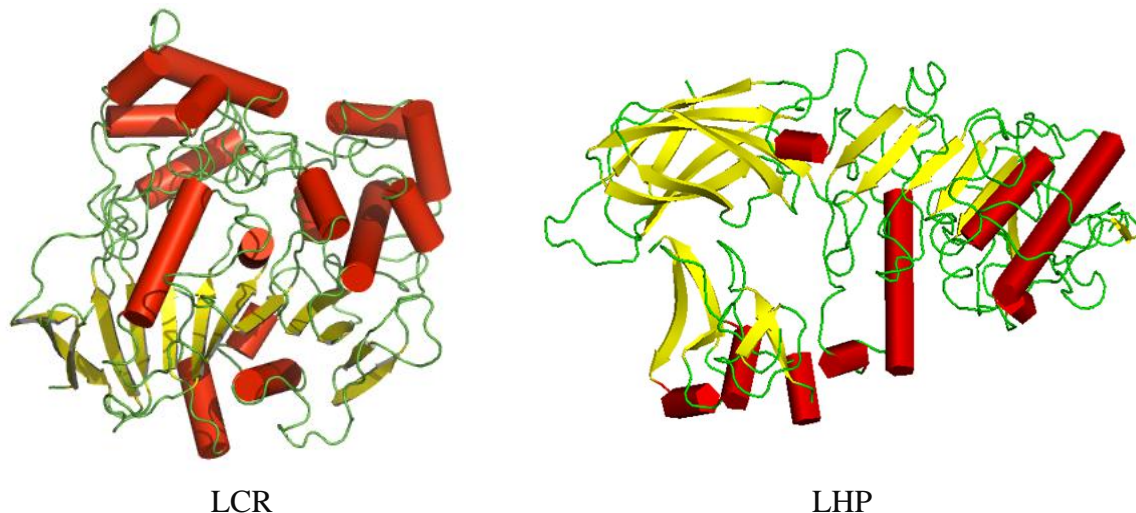


Figure 17. Comparaison des structures tertiaires des 2 enzymes de la lipase « LHP et LCR»
Hélices α colorés en rouge en forme cylindre, feuillets β colorés en jaune en forme flèche.

La lipase pancréatique humaine et la lipase de *candida rugosa* représentent des parties communes représentée par la présence de 9 feuillets β ($\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4, \beta_5, \beta_6, \beta_7, \beta_8, \beta_9$) et les 4 hélices α (A, B, C et F) (figure 28).

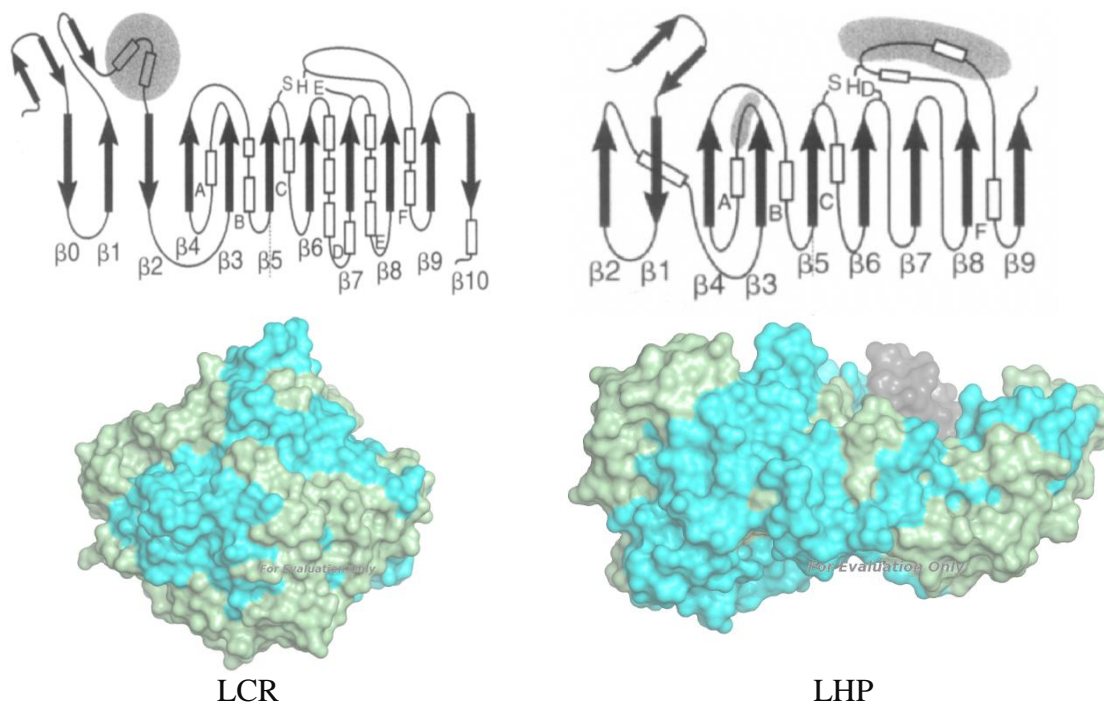


Figure 18. Représentation de la partie commune entre les deux lipases
La partie commune sous forme de surface (en bleu cyan) et la partie différente sous forme de surface (en vert clair). La colipase de la lipase pancréatique humaine est représentée en gris foncé.

5. ALIGNEMENTS DES SEQUENCES DES ACIDES AMINES DES DEUX LIPASES

L’alignement des acides aminés des deux lipases (figure 29) montre une faible ressemblance et similarité en acides aminés seulement 41 acides aminés identiques (7,67%) et 47 acides aminés similaires (8,80%) malgré que les deux lipases possèdent la même triade catalytique (Ser, His, Glu/Asp), ceci est due à la biosynthèse de chaque lipase.

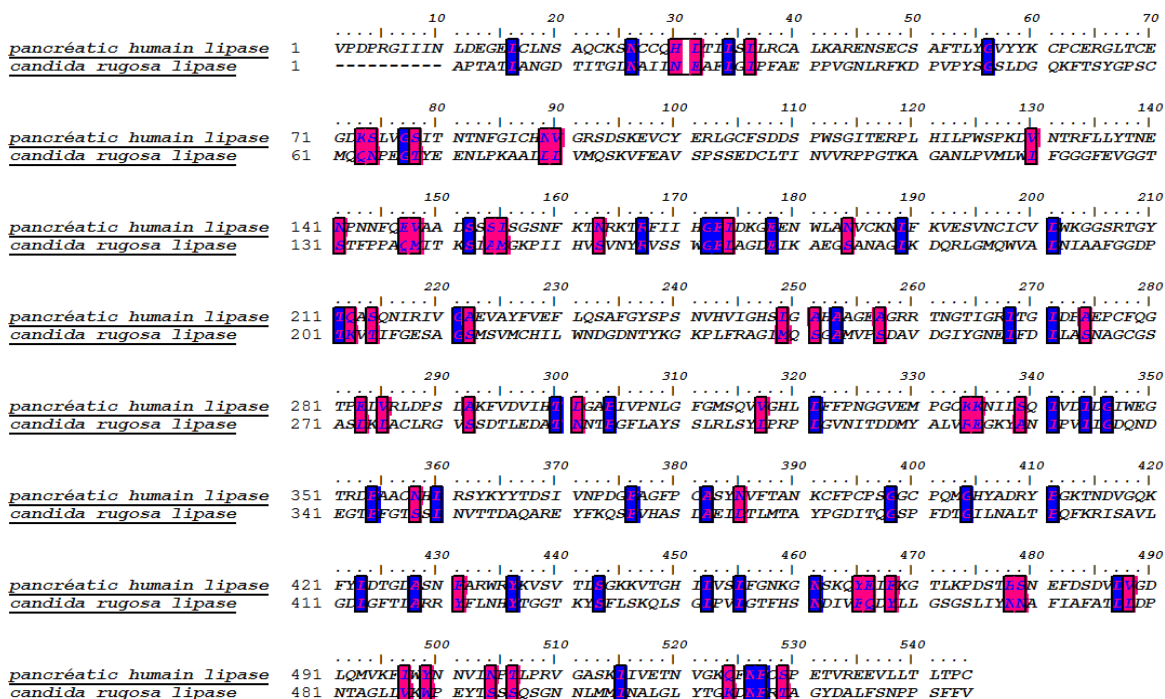


Figure 19 .Comparaison de la succession des acides aminés des deux enzymes de la lipase La LHP et la LCR (acides aminés identiques en bleu, acides aminés similaires en rose).

CHAPITRE III : DOCKING DES
INHIBITEURS

1. OPTIMISATION DES DEUX LIPASES

Après avoir téléchargé les enzymes, nous avons fait l'optimisation géométrique des deux enzymes : LHP et LCR à l'aide du logiciel Hyperchem ainsi la minimisation d'énergie (figure 30 et 31).

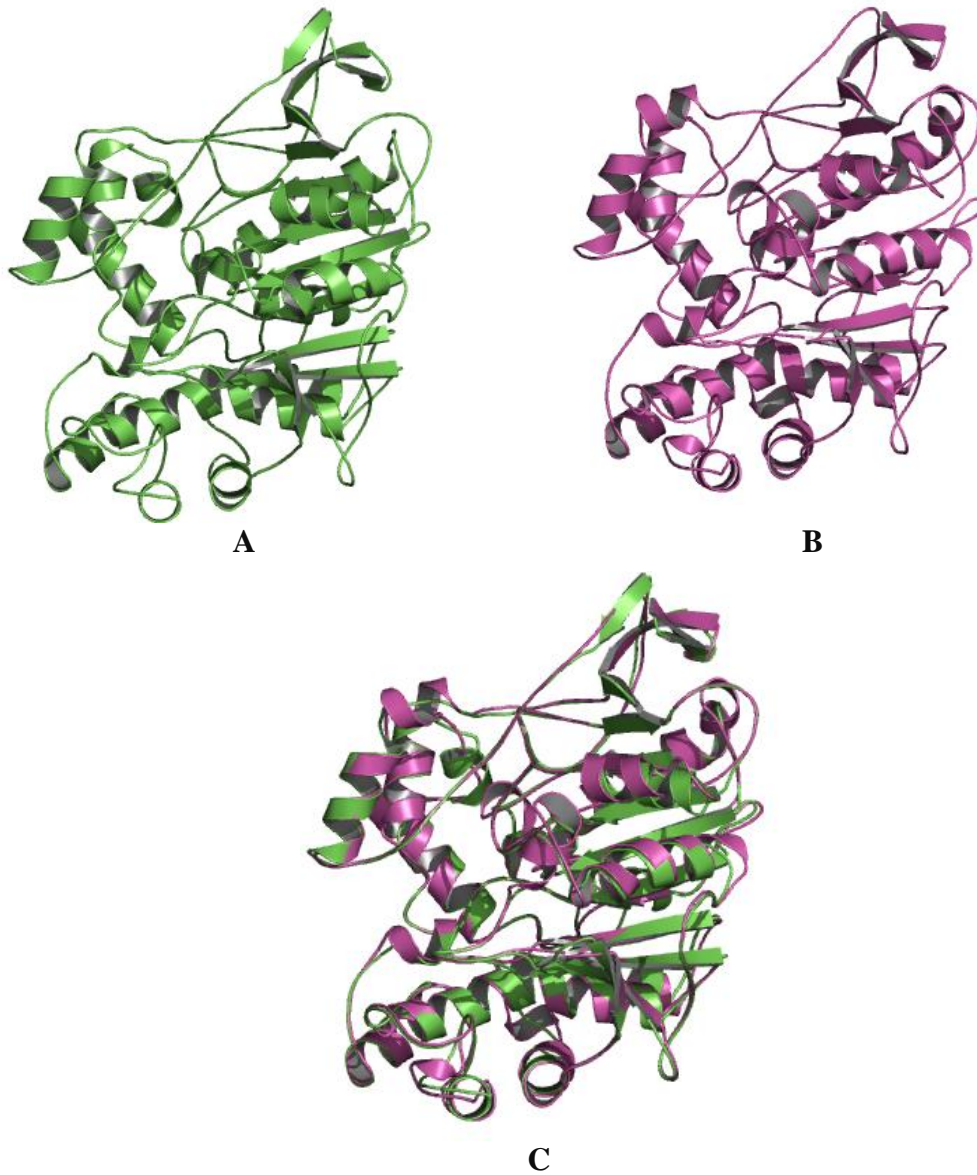


Figure 1. Structures 3D de la LCR en forme cartoon.
(A) avant minimisation, (B) après minimisation, (C) superposition entre les deux structures.

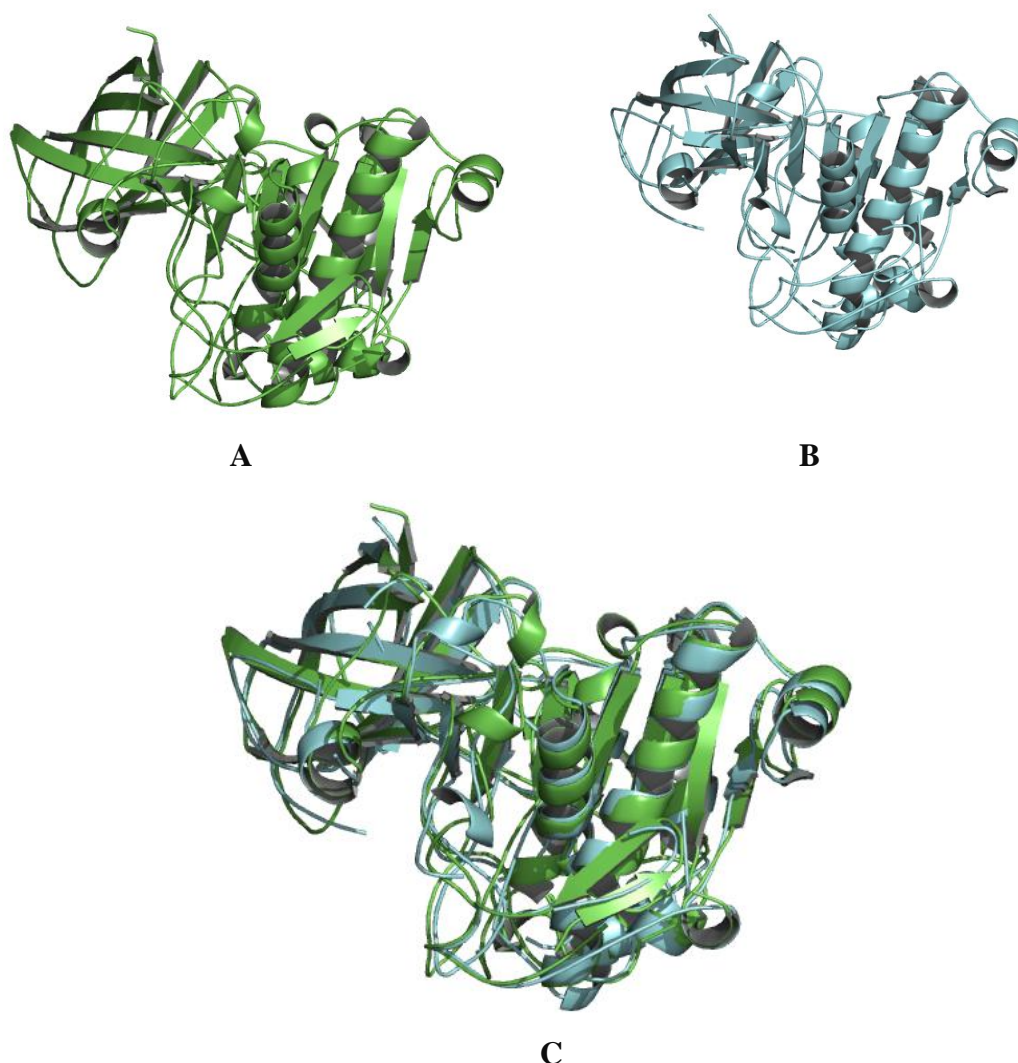


Figure 2. Structure de la LHP en forme cartoon.
(A) avant minimisation, (B) après minimisation, (C) superposition entre les deux structures

2. DOCKING DES INHIBITEURS SUR LES DEUX LIPASES

Le docking ou Amarrage est l'insertion d'un ligand au niveau d'un site récepteur d'une macromolécule en utilisant des logiciels bioinformatiques en collaboration avec l'algorithme génétique, ce phénomène est utilisé pour l'étude des réactions de complexation généralement dans le domaine pharmacologique afin de déterminer les différents paramètres de cette fixation ainsi que son mécanisme catalytique, à titre d'exemple l'étude du complexe inhibiteur–transcriptase inverse du virus de SIDA afin de trouver un nouveau médicament contre cette maladie mortelle (Seal *et al.*, 2011).

Après le docking nous avons obtenu des nombreuses solutions, nous allons accepter et refuser les solutions selon des critères bien déterminés.

➤ La LCR :

- Le docking de paracétamol:
Nous avons obtenu 3 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution 1) et refusé les autres car l'acide aminé serine (Ser 209) doit former une liaison covalente avec le groupement hydroxyle de paracétamol (figure 32) pour former l'intermédiaire tétraédrique, ce qui nécessite une distance interatomique faible.
- Le docking de l'indométacine:
Nous avons obtenu 6 solutions, nous avons accepté 2 solutions (solution 1 et 2) et refusé les autres car le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine (Ser 209) doit former une liaison covalente avec le groupement hydroxyle de l'indométacine (figure 33).
- Le docking de piroxicam:
Nous avons obtenu 3 solutions, nous avons accepté 2 solutions (solution 1 et 2) et refusé les autres en se basant sur le même critère de sélection (figure 34).
- Le docking de voltarène :
Nous avons obtenu 10 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution 6) et refusé les autres (figure 35).
- Le docking de l'aspirine:
Nous avons obtenu 3 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution 1) et refusé les autres (figure 36).

➤ La LHP

- Le docking de paracétamol :
Nous avons obtenu 3 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution 3) et refusé les autres car le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine (ser152) doit former une liaison covalente avec le groupement hydroxyle de paracétamol (figure 37).
- Le docking de l'indométacine:
Nous avons obtenu 10 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution 3) et refusé les autres car le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine (ser152) doit former une liaison avec le groupement hydroxyle de l'indométacine (figure 38).

- Le docking de piroxicam:
Nous avons obtenu 3 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution2) et refusé les autres (figure 39).
- Le docking de voltarène:
Nous avons obtenu 10 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution10) et refusé les autres car le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine (ser152) doit former une liaison covalente avec l'oxygène de la fonction ester de voltarène (figure 40).
- Le docking d'aspirine:
Nous avons obtenu 4 solutions, nous avons accepté une seule solution (solution1) et refusé les autres car le groupement hydroxyle de l'acide aminé serine (Ser152) doit former une liaison covalente avec l'atome d'oxygène du groupement carboxylique de l'aspirine (figure 41).

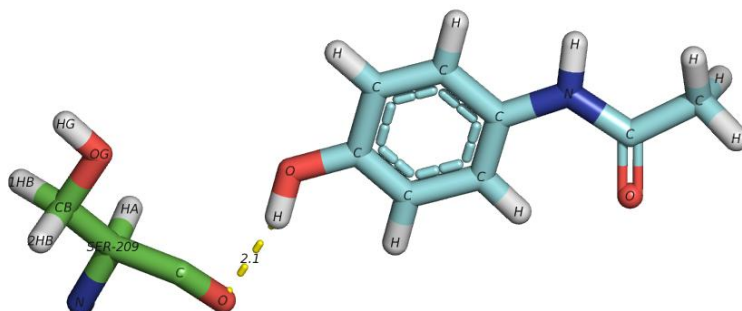


Figure 3. La meilleure solution pour le docking de paracétamol sur la LCR

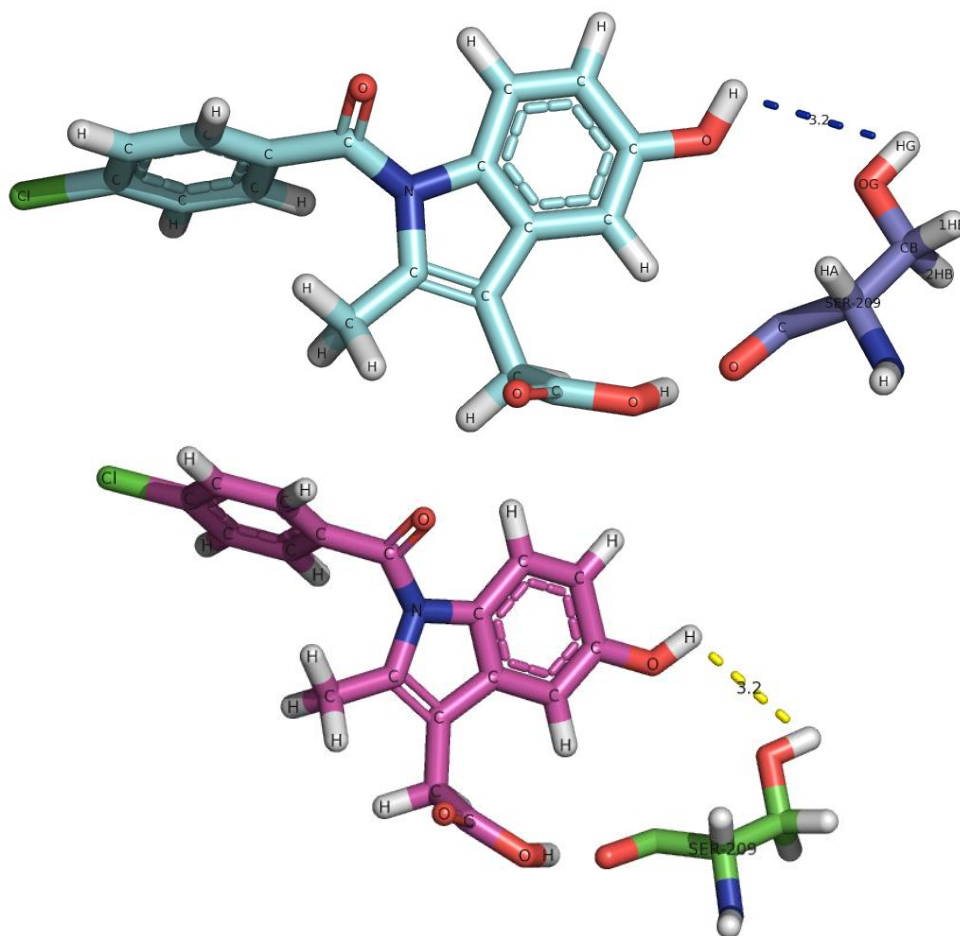


Figure 4. Les meilleures solutions pour le docking de l'indométacine sur LCR

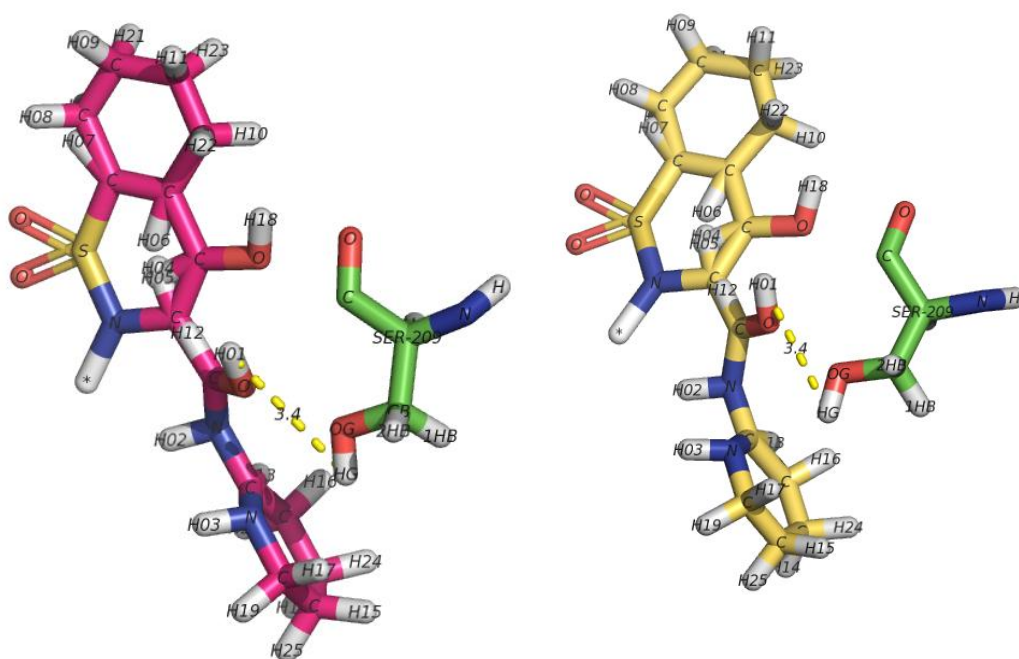


Figure 5 . Les meilleures solutions pour le docking de piroxicam sur LCR

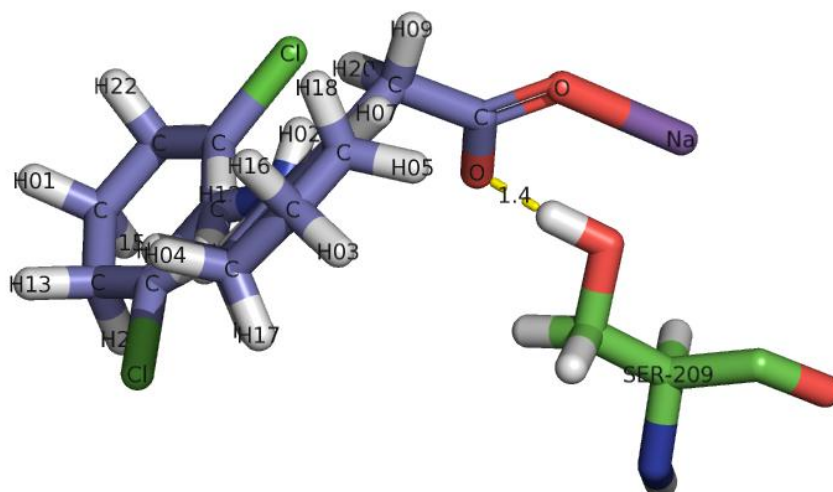


Figure 6. La meilleure solution pour le docking de voltarène sur LCR

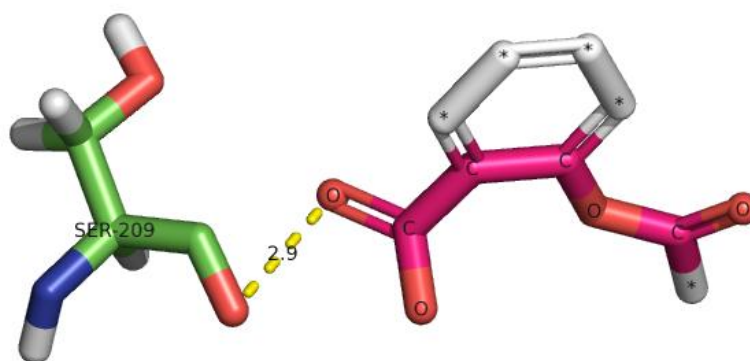


Figure 7 . La meilleure solution pour le docking d'aspirine sur LCR

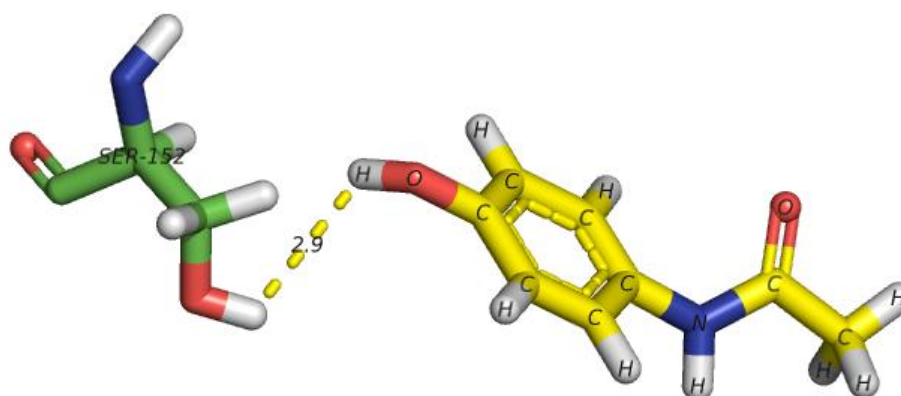


Figure 8. La meilleure solution pour le docking de paracétamol sur LHP

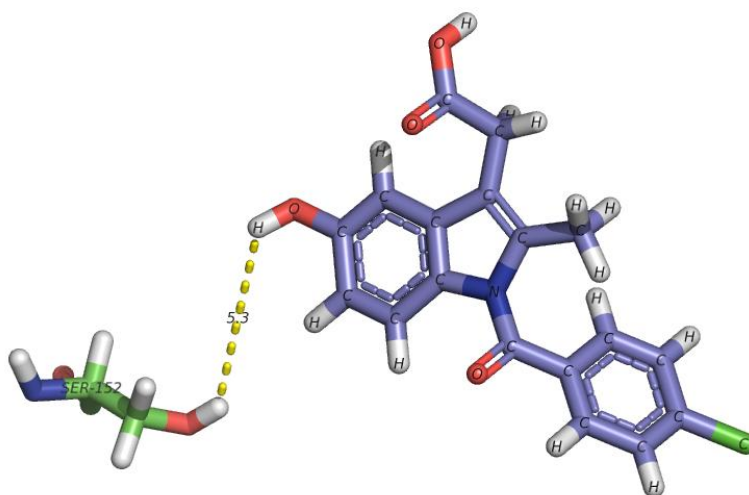


Figure 9. La meilleure solution pour le docking de l'indométacine sur LHP

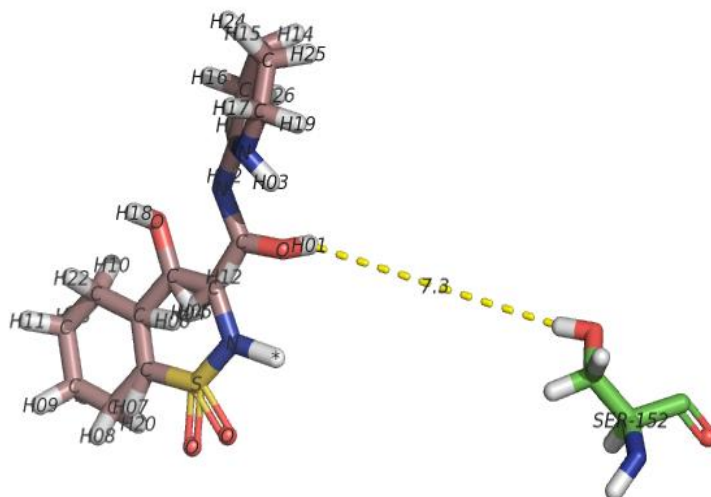


Figure 10 . La meilleure solution pour le docking de piroxicam sur LHP

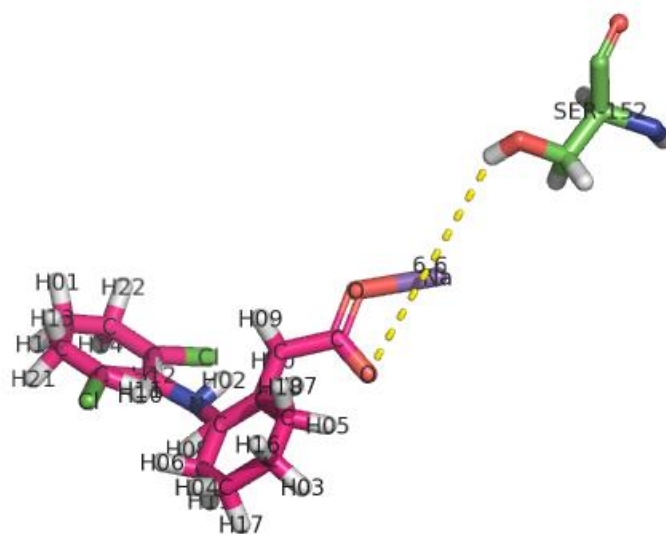


Figure 11. La meilleure solution pour le docking de voltarène sur LHP

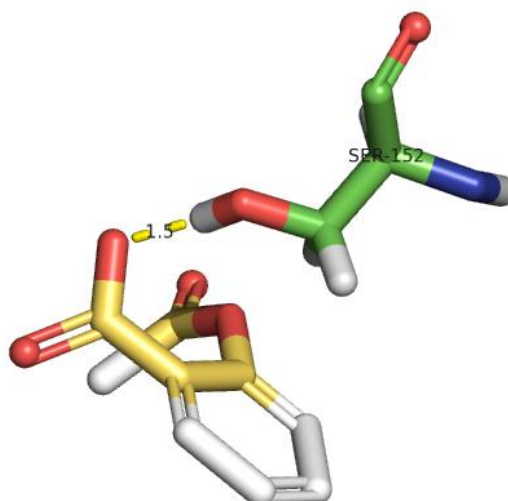


Figure 12. La meilleure solution pour le docking d'aspirine sur LHP

3. DISCUSSION DES RESULTATS DU DOCKING

Ces médicaments sont utilisés quotidiennement par les malades qui ont des inflammations et des douleurs et ne sont pas destinés contre l'inhibition des lipases, le but d'étudier leurs possibilités d'inhiber la LHP et la LCR est d'identifier leurs effets indésirables sur le corps humains ou leurs possibilités de traiter la candidose. Le facteur commun entre ces médicaments et les inhibiteurs connus de la lipase est la présence des fonctions chimiques caractéristiques dans leurs structures.

Une faible distance interatomique « DI » implique une grande affinité vis-à-vis l'enzyme et une accessibilité importante du site actif vers l'inhibiteur. A partir des valeurs des distances interatomiques présentées dans le tableau 5, nous avons enregistré que le voltarène a présenté la valeur de DI la plus faible (1,4 °A) suivi de paracétamol (2,1 °A) et l'aspirine (2,9 °A) pour la LCR, nous proposons que ce médicament peut être diagnostiqué afin de traiter avec d'autres médicaments la candidose. L'indométacine et le piroxicam présentent des distances plus élevées (deux fois supérieure à celle du voltarène) qui interprète une affinité moins importante vis-à-vis la LCR.

Pour la LHP, nous avons enregistré que l'aspirine a présenté l'affinité la plus élevée avec une DI la plus faible (1,4 °A) suivi du Paracétamol (2,9 °A), mais les autres médicaments ne présentent pas une affinité car ils montrent des distances supérieures à 5°A (indométacine, piroxicam et voltarène), nous pouvons dire que ces

médicaments ne présentent aucune possibilité ni de traiter l'obésité ni d'influencer négativement sur l'activité lipolytique de la LHP.

En comparant ces valeurs des DI des différents médicaments et pour les 2 enzymes avec l'orlistat (Linani, 2011 ; Benarous et Linani, 2011) qui est un inhibiteur compétitive puissant contre la lipase, nous trouvons qu'aucun de ces médicaments possède le même pouvoir inhibiteur. En revanche, la crocétine est classée troisième de point de vue affinité après le volarène et le paracétamol avec une valeur de DI de 2,7 °A pour la LCR mais elle a présenté la meilleure affinité pour la LHP avec une valeur de DI de 1,1 °A.

Cette différence d'affinité entre les deux enzymes est interprétée par la différence d'origine et la biosynthèse des deux lipases.

Tableau 1. Les valeurs des distances interatomiques en °A des deux lipases

Inhibiteur	LCR	LHP
Paracétamol	2,1	2,9
Indométacine	3,2	5,3
Piroxicam	3,4	7,3
Volarène	1,4	6,6
Aspirine	2,9	1,5
Orlistat*	0,5	0,5
Crocétine*	2,7	1,1

**Source : Linani, 2011, Benarous et Linani, 2011.*

CONCLUSION GENERALE

La bioinformatique est constituée par l'ensemble des concepts et des techniques nécessaires à l'interprétation informatique de l'information biologique. En absence d'expériences, le traitement informatique des séquences peut par exemple déceler la fonction biologique potentielle d'un gène par la recherche de critères spécifiques (signaux, structures secondaires ou tertiaires...) ou par la recherche de similitudes entre séquences.

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié les structures spatiales des cinq médicaments (paracétamol, indométacine, piroxicam, voltarène et aspirine) proposés d'être des inhibiteurs des lipases grâce à l'existence des fonctions chimiques caractéristiques à l'inhibition qui sont : la fonction amide, carboxylique et esters afin de réaliser le docking de ces inhibiteurs sur les deux enzymes : lipase pancréatique humaine et lipase de *Candida rugosa*. Dans la deuxième partie, nous avons étudié les structures spatiales de ces deux enzymes afin d'illustrer les différences, nous avons trouvé que la triade catalytique est conservée pour les deux enzymes mais l'architecture du site est différente qui est expliqué par les résultats d'alignement (ressemblance et similarité des acides aminés).

Nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie au docking des cinq inhibiteurs proposés de présenter un type d'inhibition compétitif. Nous avons enregistré plusieurs solutions de docking pour les deux enzymes avec leurs inhibiteurs par le calcul des distances interatomiques au niveau des complexes enzyme-inhibiteur. Nous avons trouvé que le voltarène a montré l'affinité la plus élevée vis-à-vis la LCR par rapport aux autres médicaments avec une valeur de DI de 1,4 °Å, ce qui le permet d'être proposé pour traiter la candidose. Alors que l'aspirine a présenté la même affinité avec une valeur de DI de 1,5 °Å vis-à-vis la LHP.

L'ensemble de ce travail nous a permis donc de mieux connaître l'intérêt de l'étude bioinformatique des complexes enzyme-inhibiteur. Ainsi, de nombreuses perspectives peuvent être envisagées. Les tests enzymatiques *in vitro* et *in vivo* sont fastidieux car la cristallisation des protéines complexées avec leurs inhibiteurs n'est pas réalisables, d'une part, l'extraction et l'obtention de la lipase humaine pancréatique est pratiquement difficile mais nous pouvons facilement acheter la lipase de *Candida rugosa* et d'autre part la cristallisation des protéines ainsi que l'analyse des données consomme un temps imaginaire. Nous proposons à travers cette étude d'identifier les molécules inhibitrices suivies de leur étude bioinformatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A-B

Agbo – godeau S et Guedj. 2008. *Mycoses buccales*. Département de pathologie de la mycose buccale. Services de stomatologie et chirurgie maxillo-facial hôpital pitié salpêtrière, paris. France .p.1-7.

Anthonsen H. et al. 1995. *Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution*. Biotechnol.Annu. Rev., 1, 315-371.

Arpigny J.L& Jaeger K.E. 1999. *Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties*. Biochem. J., 343, 177-183.

Barbara Sheen. 2004. *Diseases and disorders: acne*, Lucent Books, p 11, 12, 15.

Basdevant A. 2006. *L'obésité : origines et conséquences d'une épidémie*. Université Pierre-et-Marie-Curie.paris.France .p.562-569.

B. Dreno. 2010. *L'acné: actualités ;Acné: What's new?*.Service de dermatologie.France, 23,249-253.

Beer H. D., Wohlfahrt G., Mccarthy J. E. G., Schomburg D., Schmid R. D. 1996. *Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants*.Prote in Eng.,6, 506-517.

Benarous K. 2010. *Etude de l'effet inhibiteur des extraits naturels sur la lipase*. Mémoire de magister, université Amar telidji-laghouat.p 120.

Benarous K., Linani A. 2011. *Selection of orlistat as a potential inhibitor for lipase from Candida species*, Bioinformation, 7(3): 125-129.

Beucher B. 16 novembre 2007. *Spécificité antigénique de l'Als3p de Candida albicans et implication de cette protéine dans l'interaction avec les constituants de l'hôte*. Thèse de doctorat.Université d'angers .P.5, 143

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Borgstrom B., Erlanson C. 1973. *Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents.* Eur. j. biochem., 37, 60-68.

Borrelli, F. and Izzo, A., 2000. *The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies.* *Phytother. Res.*, 14, 581-591.

Brady L. et al. 1990. *A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerol lipase.* *Nature*, 343, 767-770.

Brzozowski A. M., Derewenda D., Derewenda Z. S., Dodson G. G., Lawson D. M., Turkenburg J. P., Bjorkling F., Høge-Jensen B., Patkar S. A., Thim L. 1991. *A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex.* *Nature*, 351, 491-494.

Buxeraud J., 2007. *Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.* actualité pharmaceutique n°460

C-D

Cohen Y. 1981. *Abrégé de pharmacologie*, Masson, Paris, 245-251.

Cristian Ruiz Rueda. May 2005. *Microbial lipases with interest in biotechnology and infectious diseases: isolation, characterization and inhibition by natural substances*, PhD Thesis, Barcelona university, biology faculty, microbiology department, Spain, p 475.

Carrière, F., Renou, C., Ransac, S., Lopez, V., De Caro, J., Ferrato, F., De Caro, A., Fleury, A., Sanwald-Ducray, P., Lengsfeld, H., Beglinger, C., Hadvary, P., Verger, R., Laugier, R. 2001. *Inhibition of gastro-intestinal lipolysis by Orlistat™ during digestion of test meals in healthy volunteers.* *Am. J. Physiol., Gastrointest. Liver Physiol.* 281: G16-G28.

Cygler M. & Schrag J.D. 1999. *Structure and conformational flexibility of Candida rugosa lipase.* *Biochim. Biophys. Acta*, 1441, 205-214.

Dangoumau J. Moore N. Molimard M. Fourrier-Reglat A. Latry K Haramburu. Miremont-Salame G. Titier K. 2006. *Pharmacologie générale*, université Victor Segalen-Bordeaux. Département de pharmacologie. P.1-547.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

David L.Nelson, Michael M. Cox. 2005. *Lehninger principles of biochemistry*, Fourth Edition, p 1130.

Denis S. 2005. *Pharmacologie B.P* (cahier du préparateur en pharmacie)

Derewenda Z. 1994. *Structure and function of lipases*. *Adv. Protein Chem.*, 45, 1-52.

Derewenda Z., Derewenda U. & Dodson G. 1992. *The crystal and molecular structure of the Rhizomucor miehei triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution*. *J. Mol. Biol.*, 227, 818-839.

Desnuelle P. 1986. In "*Molecular and Cellular Basis of Digestion*" (P. Desnuelle, ed.), pp. 275-296. Elsevier, Amsterdam.

Dodson G., Lawson D. & Winkler F. 1992. *Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation*. *Faraday Discuss.*, 93, 95-105.

Drablos F & Petersen S. 1997. *Identification of conserved residues in family of esterase and lipase sequences*. *Methods Enzymol.*, 284, 28-61.

E-F-G

Egloff M.P. et al. 1995. *Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase*. *Protein Sci.*, 4, 44-57.

Essendoubi M. 12 novembre 2007. *Identification et typage par (micro)spectroscopie IRTF des levures du genre Candida d'origine clinique*. thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne unité de formation et de recherche de pharmacie., p 48.1-173

Faure S. 2009. *Anti-inflammatoires stéroïdiens n°478*. faculté de pharmacie, Angers., p 51.

Fitzpatrick, D. A., M. E. Logue, J. E. Stajich, and G. Butler, 2006. *A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis*. *BMC Evol Biol* 6:99.

Fichers P, Destain J, Thonart P. 2008. *Les lipases sont des hydrolases atypiques* : principales caractéristiques et applications. Université de Liège. Centre Wallon de Biologie Industrielle (CWBI). Service de Technologie microbienne. Belgique. P 119-130.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Fischer M. & Pleiss J. 2003. *The lipase engineering database: a navigation and analysis tool for protein families*. Nucleic Acids Res., 31, 319-321.

Gales A. 9 Octobre 2009. *rôle central des monocytes/macrophages dans la défense anti-infectieuse ; implication de la polarisation M2 et des marqueurs associés Dectine-1, Récepteur Mannose et Interleukine-10*, Université Toulouse III - Paul Sabatier, p 67.1-156.

Grippa E., Valla R., Battinelli L., Mazzanti G., Saso L., Silvestrini B. 1999. *Inhibition of Candida rugosa lipase by berberine and structurally related alkaloids, evaluated by high-performance liquid chromatography*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63, 1557-1562.

Grochulski P., Li Y., Schrag J. & Cygler M. 1994. *Two conformational states of Candida rugosa lipase*. Protein Sci., 3, 82-91.

Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, et al. 2003. *Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited*. Clin Infect Dis 37:1172-7.

Gupta. R., Gupta. N, and Rathi, P. 2004. *Bacterial lipases : an overview of production, purification and biochemical properties*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 763-781.

H-J

Hassanien F.R and Mukherjee K.D. 1986. J. Am. Oil Chem. Soc. 63,893-897.

Hennequin C, Ancelle T, Beretta S . 2008. *Outbreaks of nosocomial candidiasis in France 1996-2006*. J Hosp Infect 68:377-80.

Hermoso J. 1997. *Neutron crystallographic evidence of lipase-colipase complex activation by a micelle*. Embo J., 16, 5531-5536.

Jaeger K.E, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Van Heuvel M, Misset O. 1994. *Bacterial lipases*. Fems Microbiol. Rev., 15, 29-63.

James T. Y, Kauff F, Schoch C.L, Matheny P.B, Hofstetter V, Cox C.J, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch H.T, Rauhut A, Reeb V, Arnold A.E, Amtoft A, Stajich J.E, Hosaka K, Sung G.H, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis J.M, Slot J.C, Wang Z, Wilson A.W, Schussler A, Longcore J.E, O'Donnell K, Mozley-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Standridge S, Porter D, Letcher P.M, Powell M.J, Taylor J.W, White M.M, Griffith G.W, Davies D.R, Humber R.A, Morton J.B, Sugiyama J, Rossman A.Y, Rogers J.D, Pfister D.H, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker R.A, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Spotts R.A, Serdani M, Crous P.W, Hughes K.W, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner W.A, Lucking R, Budel B, Geiser D.M, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett D.S, Lutzoni F, McLaughlin D.J, Spatafora J.W, and Vilgalys R. 2006. *Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny*. Nature 443:818-22.

Jappe U. 2003. *Pathological mechanisms of acne with special emphasis on propionibacterium acnes and related therapy*. Acta Derm. Venereol. 83, 241-248.

K-L-M

Kaddour A, Brahim, Noelle Mayembo, Sylvianne Ostermeyer, Jean Denis Mettoudi et Danielle Ginisty . 2005. *Anomalies de la cavité buccale*, Faculté de médecine René Descartes Paris V, Service de stomatologie et chirurgie maxillofaciale pédiatriques. vol, 8, n° 5-6, p 1-400.

Lachke, S. A., S. Joly, K. Daniels, and D. R. Soll. 2002. *Phenotypic switching and filamentation in Candida glabrata*. Microbiology 148:2661-7264.

Lie E, Persson A, Molin G., 1991. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 19-20.

Linani A. 2011. *Comparaison entre les iso-enzymes de la lipase en utilisant l'outil informatique*, mémoire de licence. Université de Laghouat. p.42.

Lodder, J. 1970. *The yeasts : a taxonomy study*, Norths Holland publishing company, London.

Marsha D. Marcus, Jennifer E. Wildes. 2009. *Obesity : Is it a Mental Disorder ?*, Int J Eat Disord ; 00, 000-000.

Master D. 2005. *Médicaments de l'inflammation anti-inflammatoires*. Service de stomatologie et chirurgie maxillofaciale, centre hospitalier régional universitaire, B.P. 426, 67091 Strasbourg cedex, France.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mats M. & Kari H. 1994. *Kinetics of triglyceride lipase*. In : Wooley P. & Petersen S.B., eds. *Lipase*. Cambridge, UK : Cambridge University Press, 159-180.

M. Develoux, S. Bretagne. 2005. *Candidoses et levures diverses*, p 1, 8, 10.

Melinda R. Stolley, Marian L. Fitzgibbon, Linda Schiffer, Lisa K. Sharp, Vichy Singh, Linda Van Horn and Alan Dyer. 2008. *Obesity reduction black Intervention Trial (ORBIT) : Six-month results*. *Obesity*, 17, 100-106.

Miled N., De Caro A., De Caro J. & Verger R. 2000. *A conformational transition between an open and closed form of human pancreatic lipase revealed by a monoclonal antibody*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1476, 165-172.

Merrouche M, B. Coffin. 2005. *Obésité : prise en charge, indications et méthodes du traitement endoscopique et chirurgical* *Obesity: management, indications and methods for endoscopic and surgical treatment*. Service d'hépatogastro-entérologie, Paris. France. p 189-200.

Moulin M, Quoquelt A. 2002. *Pharmacologie : connaissances et pratiques*, 2^{éd}, Masson, Paris, 393-406.

N-O-P

Nagorni A. 2000. *Helicobacter Pylori at the end of the second millenium*. *Facta universitatis* (university of Nis) series : Medicine and biology, 7, 15-25.

N. Touyar, R. Abilkassim, H. Naoui, W. El Mellouki, B. Lmimouni. 2010. *Candidose cutanée congénitale : à propos d'un cas* *Congenital cutaneous candidiasis: A case report and review*. *Journal de Mycologie Médicale*. p.116-119.

Ollis D. et al. 1992. *The alpha/beta hydrolase fold*. *Protein Eng.*, 5, 197-211.

Pawin H, Chivot M, Beylot C, Faure M, Poli F, Revuz J. 2007. *Living with acne. A study of adolescents' personal experiences*. *Dermatology* ;215:308—14.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Perna. F, Gatta. Figura. N, Ricci. C, Tampieri. A, Holton. J, Miglioli. M and Varia.D. 2003. *Susceptibility of Helicobacter pylori to Metronidazole*. Am. J. Gastroenterol. 98(10),2157-2161.

Philippe L. 2006. *Pharmacologie*. Faculté de médecine. Service de pharmacologie. Université Pierre et Marie Curie. p.02-349.

Pleiss J. et al. 2000. *Lipase engineering database understanding and exploiting sequence-structure relation ship*. J. Mol. Catal. Part B: Enzymatic, 10, 491- 508.

S

Sanguinol F. 2008. *L'obésité : une maladie chronique multifactorielle*. n°(76) :13-6. p 16.

Schmid R. and Verger R. 1998. *Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications*. Angew. Chem. Int. Ed. 37,1608-1633.

Schmi H. 1987. *Eléments de pharmacologie*, Flammarion, Paris, 196-201.

Schrag J.D. & Cygler M. 1993. 1.8 *A refined structure of the lipase from Geotrichum candidum*. J. Mol. Biol., 230, 575-591.

Schrag J., Li Y., Wu S. & Cygler M. 1991. *Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from Geotrichum candidum*. Nature, 351, 761-764.

Sebastien F. 2009. *Anti-inflammatoires stéroïdiens*. Faculté de pharmacie, Angers (49). n°487. p 51-56.

Shuichi Higaki. 2003. *Lipase inhibitors for the treatment of acne*, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 22,377-384.

U- V-W

Université Médicale Virtuelle Francophone. 2009. Item 174 : *Prescriptions et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens*. p 19. Support de Cours (Version PDF).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Vandeputte P. 2008. *Mecanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez Candida niversité d'angers.glabrata*, these de doctorat. Université d'angers. p156.

Van Tilbeurgh H., Egloff M.P., Martinez C., Rugani N., Verger R., Cambillau C. 1993. *Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography*, Nature, 362, 814-820.

Winkler F.K., D'Arcy A. & Hunziker W., 1990. *Structure of human pancreatic lipase*. Nature, 343, 771-774.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, 2004 *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clin Infect Dis 39:309-17.

Winkler F. & Gubernator, 1994. *Structure and mechanism of human pancreatic lipase*. In: Wooley P. & Pettersen S., eds. Lipase. Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp 23-48.

WHO World Health Organization, June 1997. *Obesity: Preventing and managing the global epidemic*. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, 3-5

World Health Organization, 1998. *Obesity: preventing and managing the global epidemic*, in: WHO, Report of a WHO Consultation on Obesity (WHO/NUT/NCD/98.1), Genève, Suisse.