

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة عمار ثليجي - الأغواط
Université Amar TELIDJI Laghouat
كلية العلوم
Faculté des sciences
قسم البيولوجيا
Département de biologie



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie appliquée

Thème

Etude *in-silico* de l'activité inhibitrice de la lipoxygénase par certains flavonoïdes

Présenté par :

Melle BENHENNI Khaoula

Melle BENSALAM Amira

Devant le jury composé de :

Présidente : Mme. NEBEG Halimad MCA Université Laghouat

Examinatrice : Melle. ZAKHROUF ZohraMAA Université Laghouat

Encadreur : SIFI Ibrahim MCA Université Laghouat

Soutenu publiquement le : 22/06/2022

Dédicace

Je dédie ce modeste travail de fin d'étude ;

A mes chers parents DJELLOUL et OUMELKHEIR, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères sentiments, pour leur patience illimitée, leurs encouragements contenus, leurs aides, en témoignage de mon profond amour et respect pour leurs grands sacrifices, que dieu leur prête bonheur et longue vie.

A ma chère sœur MERJEM et ma belle-sœur KHEDIDJA

A mes chers frères LAMINE et ABDERRAHIM

A mon beau-frère SAMI

Qui ont toujours su me motiver. Un grand merci pour leurs encouragements et leur soutien moral.

A l'adorable nièce RANIA et mes neveux ADEM et MOHAMED.

A tous mes amies, tout particulièrement MAROUA et

MAYSSOUNE

A AMIRA, chère amie avant d'être binôme.

A toute personne qui porte le nom BENHENNI, je dédie ce travail à tous ceux qui ont participé à ma réussite.

KHAOULA

Dédicace

Je dédie humblement ce manuscrit à :

A mes chers et respectueux parents MOHEMMED et NACIRA, vraiment aucune dédicace ne saurait exprimer mon attachement, mon amour et mon affection, je vous offre ce modeste travail en témoignage de tous les Sacrifices et l'immense tendresse dont vous m'avez toujours su me combler.

Merci d'être toujours là pour moi

A Mes chères Sœurs, mes bougies : IMANE et DJIHAD pour leurs Encouragements et leur soutien.

A ma très chère cousine : KAOUHER, symbole de tendresse et de fidélité

A mes chers frères CHERIF, AISSA Et ABDENOUR

A mon beau-frère : SEDIK

AUX fleurs de mon cœur : YAHIA, DALLAL, RODINA, ADEM Et ABDELALIM.

A tous mes amis et plus spécialement mon binôme : « KHAOULA »

A ma très chère MAYA.

A toute ma famille BENSALEM.

A toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de

Ce mémoire.

AMIRA

Remerciement

*Tout d'abord merci beaucoup (الله) de nous donner la patience, la force et le courage pour compléter ce travail. Il Nous est agréable d'exprimer nos remerciements les plus sincère à notre encadrant Mr. **SIFI Ibrahim**, Maître de conférences (A) à l'université **Amar Téliidji-LAGHOVAT** pour son aide, son encouragement, ses orientations judicieuses, sa disponibilité et surtout pour sa patience tout au long de ce travail.*

*C'est avec un grand plaisir que nous remercions Mr. **BECHEUR Mourad**, pour sa confiance qu'il nous a accordé.*

*Un grand merci à Mme. **NEBEG Halima** pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury.*

*Nos profonds remerciements vont aussi Melle. **ZAKHROUF Zohra**, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

Nos enseignants pour leur soutien et leur dévouement durant toutes nos années d'étude.

Sans oublier de remercier nos très chers parents.

Sommaire

Dédicaces

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste d'abréviations

Liste des annexes

Introduction générale 2

Synthèse bibliographique

1. Les flavonoïdes 5

1.1. Définition et structures des flavonoïdes : 5

1.2. La classification des flavonoïdes : 5

1.3. La biosynthèse des flavonoïdes : 8

1.4. Distribution et localisation : 9

1.5. Activités biologiques 10

2. Les lipoxygénases 11

2.1. Définition générale : 11

2.2. Propriétés biochimiques des lipoxygénases : 12

2.3. Structure de lipoxygénase : 13

2.4. La voie métabolique de lipoxygénases : 16

Matériels et méthodes

1. Le Docking moléculaire 19

2. Matériels d'études : 20

3. Méthodes : 23

3.1. Préparation de la protéine : 23

3.2. Préparation de ligand : 26

3.3. Génération du protomol : 26

3.4. Docking moléculaire : 27

Résultats et discussion

1. La fiabilité du programme MOE 29

1.1. Test RMSD 29

2. L'analyse visuelle des interactions 31

3. Propriétés ADMET	40
3.1. Propriétés physico-chimiques	40
3.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	42
3.3. Excrétion	44
3.4. Test de toxicité :.....	45
4. Discussion.....	45
Conclusion et perspectives.....	49
Références bibliographiques	51

Liste des figures

Figure 1: La structure des flavonoïdes : enchainement C6-C3-C6 par logiciel ChemDraw. (Harborne <i>et al.</i> , 2001)	5
Figure 2: La structure des squelettes de base des flavonoïdes par logiciel ChemDraw.....	7
Figure 3: Voie de biosynthèse des flavonoïdes. (Milane, 2004)	9
Figure 4: La structure 3D de la lipoxygénase (PDB 4nre) obtenu par logiciel MOE.	13
Figure 5: Le rôle de la lipoxygénase obtenu par le programme ChemDraw.	15
Figure 6: La voie métabolique de lipoxygénase.....	17
Figure 7: L'interface de la page d'accueil du logiciel MOE.	20
Figure 8: L'interface graphique de ChemDraw.....	21
Figure 9: L'interface de la page d'accueil du RCSB PDB.	21
Figure 10: L'interface graphique de SwissADME.....	22
Figure 11: L'interface graphique de la plateforme ADMETlab.....	23
Figure 12: Protomol généré pour le complexe 4nre obtenu par le programme MOE.	27
Figure 13: Résultats en % obtenus par MOE à deux intervalles de RMSD (Å).	29
Figure 14: Mode d'interaction du composé 1 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	32
Figure 15: Mode d'interaction du composé 16 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	33
Figure 16: Mode d'interaction du composé 21 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	34
Figure 17: Mode d'interaction du composé 56 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	35
Figure 18: Mode d'interaction du composé 65 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	36
Figure 19: Mode d'interaction du composé 66 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	37
Figure 20: Mode d'interaction du composé 71 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	38
Figure 21: Mode d'interaction du composé 78 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.....	39

Liste des abréviations

<i>A</i>	<i>L</i>
Å : Angström AcA : acide arachidonique ADN : acide désoxyribonucléique ADV : adénovirus AGPI : acide gras polyinsaturé ARN : acide ribonucléique ARNm : acide ribonucléique messenger ALOX15 : arachidonate 15-lipoxygénase ALOX12 : arachidonate 12-lipoxygénase ALOXE3 : arachidonate lipoxygénase 3 ALOX5 : arachidonate 5-lipoxygénase ATP : adénosine triphosphate ADMET : absorption, distribution, excrétion, métabolisme, toxicité	LB : lymphocyte B LT : lymphocyte T LTA4 : leucotriène A4 LTB4 : leucotriène B4 LTC4 : leucotriène C4 LTD4 : leucotriène D4 LTE4 : leucotriène E4 LOX : lipoxygénase LX : lipoxine LXA4 : lipoxine A4
<i>C</i>	<i>M</i>
COA : coenzyme A	MOE : Molecular Operating Environment Mol : molécule
<i>D</i>	<i>N</i>
DHA : acide docosahexaénoïque	NCBI : le National Center for Biotechnology Information
<i>E</i>	<i>P</i>
ERO : espèces réactives de l'oxygène	PDB : Protein Data Bank
<i>F</i>	<i>R</i>
FVs : flavonoïdes	RMSD : root-mean-square derivation
<i>H</i>	<i>S</i>
HIV : virus de l'immunodéficience humaine HV : virus de l'herpès HETE : hydroxyeicosatétraénoïque HODE : hydroxyoctadecadiénoïque	SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
<i>I</i>	<i>Chiffres</i>
IC50 : concentration inhibitrice 50	2D : deux dimension 3D : trois dimensions

Introduction

Générale

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 25-30% de tous les médicaments disponibles sont des dérivés de produits naturels.

Les flavonoïdes et leurs conjugués forment un groupe très vaste de ces produits naturels, ce sont des métabolites secondaires qui s'accumulent en quantités relativement élevées dans les plantes, où ils ont une multitude de fonctions : de structure, de défense, d'attractifs pour les pollinisateurs, d'agents allélopathiques, de protecteurs contre les UV, et de molécules de signalisation au sein de la plante, et dans ses interactions avec l'environnement (**Croteau et al., 2000**).

Le rôle des flavonoïdes, comme constituants alimentaires protecteurs, est devenu un domaine, de plus en plus, important de la recherche en nutrition humaine. Contrairement aux vitamines traditionnelles, ils ne sont pas essentiels à court terme à l'organisme, mais il ya un nombre de preuves, grandissant de jour en jour, que des apports faibles peuvent avoir, à long terme, des effets potentiels sur le métabolisme humain d'une manière favorable pour la prévention ou la réduction du risque de maladies dégénératives, comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'obésité et le cancer (**Anderson et al., 1999**).

L'acide arachidonique, acide gras majoritaire dans les cellules animales est le substrat de l'enzyme principale lipoxigénase qui catalyse la formation d'hydroperoxydes d'acides gras de leucotriènes et de lipoxines qui sont des molécules ayant un rôle prépondérant dans diverses atteintes physiopathologiques : inflammation, allergie, maladies métaboliques et le cancer,... le développement d'inhibiteurs de la lipoxigénase permettrait donc de créer une nouvelle classe de médicaments anti-inflammatoires, antalgiques,... différents des AINS, et ou pourrait ouvrir une nouvelle voie thérapeutique dans le traitement de certaines maladies comme l'asthme et l'athérosclérose (**Sadeghian et al., 2016**).

C'est pourquoi l'étude des lipoxigénases mobilise de nombreux chercheurs dans le but de mieux connaître les mécanismes biochimiques des étapes de l'activité lipoxigénasique, leur régulation par des phases d'activation et d'inhibition, de déterminer les propriétés complexes des métabolites des lipoxigénases et de découvrir des molécules inhibitrices pouvant donner lieu à des applications thérapeutiques (**Cransac, 1992**).

L'objectif majeur de notre travail d'inhibition *in-silico* de la lipoxygénase humaine par quelques molécules extraites de plantes médicinales y-compris les flavonoïdes est de confirmer l'étude *in-vitro* qui a déjà réalisé, afin de trouver un traitement contre l'inflammation sans ou moins d'effets secondaires.

Nous présenterons tout d'abord à partir de l'étude bibliographique les flavonoïdes et les lipoxygénases animales, leurs structures, classification, la biosynthèse, leurs distributions, localisations et les différents types d'activité biologiques.

Pour notre étude *in-silico* d'inhibition de la lipoxygénase humaine, nous avons testé la fiabilité du logiciel de docking moléculaire «*MOE* : Molecular Operating Environment» utilisé dans cette étude. Pour cela, un test a été réalisé : le test consiste à calculer la déviation en angströms ou RMSD puis nous discuterons le mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur (cible thérapeutique) selon des critères particuliers tels que la faible valeur d'IC50.

Vers la fin nous terminerons ce mémoire par une conclusion qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

Chapitre (1)

Synthèse bibliographique

1. Les flavonoïdes

1.1. Définition et structures des flavonoïdes :

Les flavonoïdes (FVs) appartiennent à la famille des polyphénols : ce sont des molécules aromatiques polysubstituées ayant un rôle de métabolites secondaires chez les plantes. La classe des FVs est l'une des plus abondantes et à ce jour, plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (**Harborne, 2013**). Ces composés sont réputés pour leur caractère anti-oxydant, neutralisant les radicaux libres et limitant ainsi certains dommages oxydatifs responsable de maladies. Ils sont donc à l'origine d'effets physiologiques bénéfiques pour l'organisme humain et méritent l'intérêt croissant que la recherche leur porte (**Raskin et al., 2002**).

La structure d'un FV s'organise toujours autour d'un squelette 1,3-diphénylpropane C6- C3-C6, décrit par une nomenclature spécifique. Les deux cycles benzéniques sont nommés cycle A et cycle B. Le chaînon propyle C3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C.

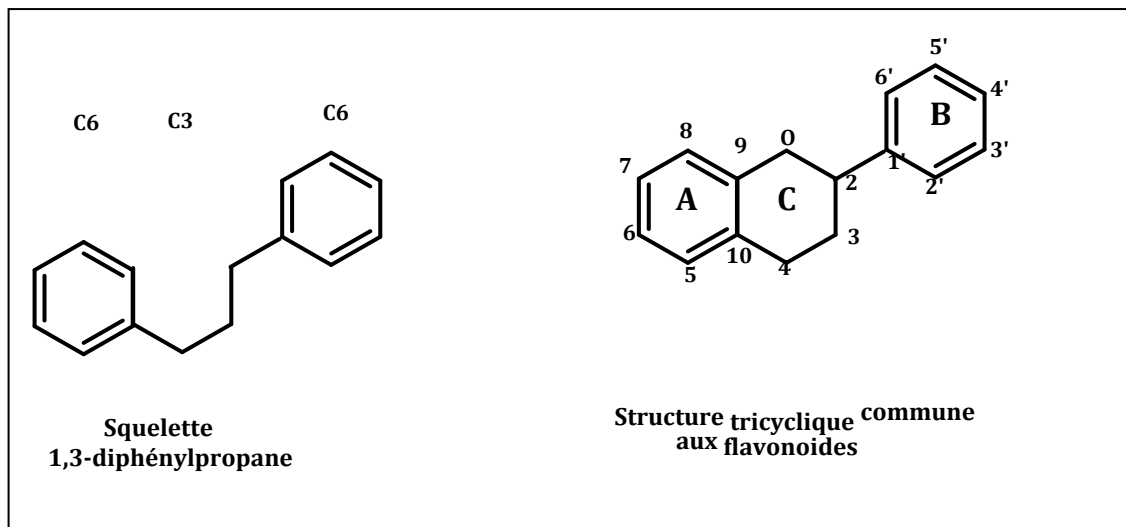


Figure 1: La structure des flavonoïdes : enchainement C6-C3-C6 par logiciel ChemDraw. (**Harborne et al., 2001**)

1.2. La classification des flavonoïdes :

Tous les FVs peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du noyau pyrane central (cycle C) (**Martens et al., 2006**), dont les plus importants sont:

- Phényl-2-chromones : flavones, flavonols et flavanones.
- Phényl-2-chromanes (flavane) : flavan-3-ols et flavan-3,4-diols.
- Flavyliums : anthocyanes.

- Chalcones : formes isomères ouvertes des flavanones.
- Aurones : homologues des flavones à hétérocycles pentagonales.
- Phényl-3 chromone : isoflavone.

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupement hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C-3 intermédiaire (**Martens *et al.*, 2006**), le noyau B relié à l'hétérocycle C dans les positions 2,3 (figure 2).

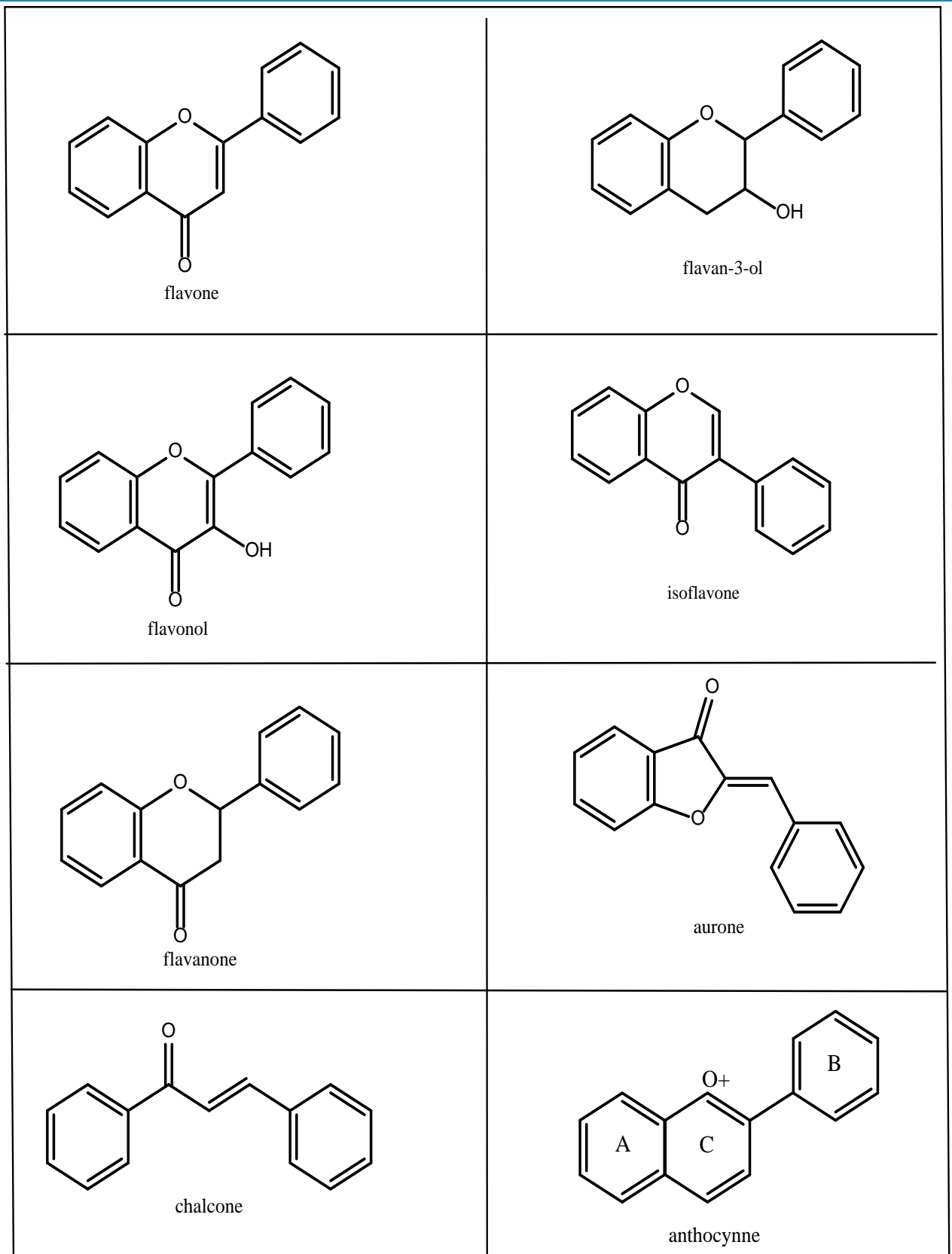


Figure 2: La structure des squelettes de base des flavonoïdes par logiciel ChemDraw.

Dans la position 2 : le FV est appelé Flavane.

- Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle la flavane est appelée Flavanone.
- Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé Flavone.
- Si le squelette est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle il est désigné par le nom de Flavonol.
- Dans la position 3 : le FV est désigné par le terme Isoflavane (**Bouakaz, 2006**).

1.3. La biosynthèse des flavonoïdes :

Les FVs possèdent tous le même élément structural de base, car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en p-coumarate puis en p-coumaroyl-CoA.

Le p-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4, 2', 4', 6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de FVs (**Lhuillier, 2007**).

Toutes les étapes de la biosynthèse des FVs ne sont pas encore clairement élucidées, mais elles constituent l'une des plus élaborées en rapport avec les métabolites secondaires (**Harborne et al., 2001**).

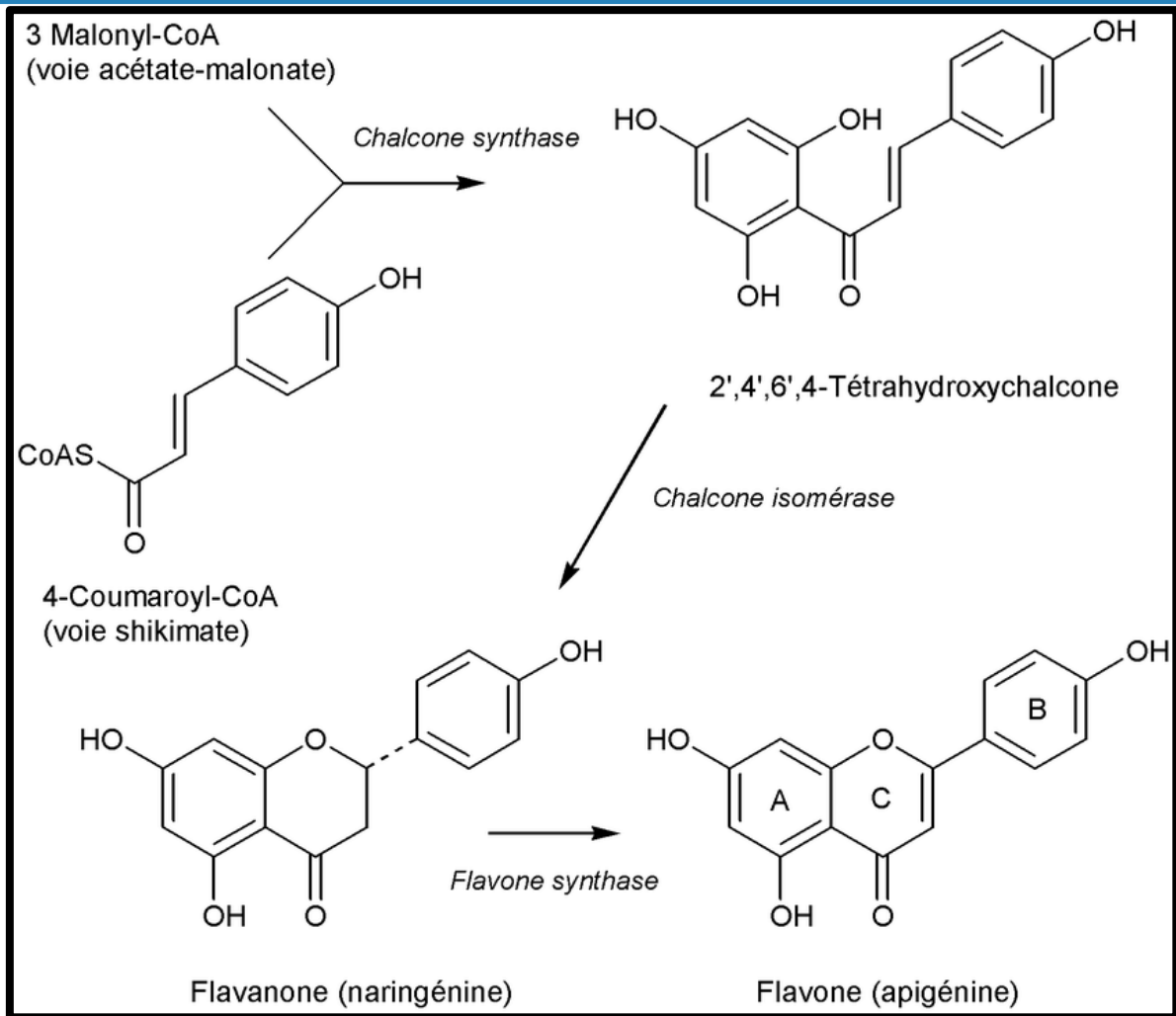


Figure 3: Voie de biosynthèse des flavonoïdes. (Milane, 2004)

1.4. Distribution et localisation :

Les FVs sont des métabolites secondaires des plantes. Ces molécules ont été identifiées dans presque toutes les parties de la plante : les feuilles, les racines, les tiges, les fleurs, les graines et l'écorce.

Les FVs sont trouvés dans les fruits, les légumes, les noix, les herbes, les épices, aussi bien que dans le thé. Ils sont consommés régulièrement avec l'alimentation humaine qui nous apporte environ 75mg de FVs par jour. En effet, le thé, les agrumes, les pommes, l'huile d'olive, les oignons, le cacao et plusieurs autres fruits et légumes sont très riche en flavonoïdes, les flavanols et les flavonols y seraient les plus abondants (Bruneton, 1999).

Dans la majorité des cas, les FVs sont présents sous forme glycosylée car la glycosylation a pour effet de les rendre moins réactifs et plus hydrosoluble permettant alors leur stockage dans les vacuoles des cellules épidermiques des fleurs, de l'épiderme et de mésophylle des feuilles, les parenchymes des tiges et racines (Lhuillier, 2007). On les trouve en abondance dans les familles suivantes : Polygonacées, Apiacées, Astéracées,

Légumineuse (Milane, 2004).

Le monde animal est lui aussi concerné par les FVs. On trouve par exemple de la chrisine, la quercétine et de la galangine dans la propolis des abeilles (**Marfak, 2003**).

1.5. Activités biologiques

De nos jours les propriétés thérapeutiques des FVs sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques.

1.5.1 Activité anti-oxydante :

Les FVs ont été découverts dans les années 30 par *Albert Szent-Gyorgyi*, en tant que des composés avec l'activité anti-oxydante prononcée (**Hodek et al., 2002**).

Les FVs expriment les propriétés anti-oxydantes par : le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), la suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur, la protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (**Boudiaf, 2006**).

1.5.2 Activités anti-inflammatoires et immunologiques :

De nombreux travaux semblent indiquer que les FVs possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Emim et al., 1994**). Les FVs sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des LB et LT (**Mookerjee et al., 1986**).

Leur effet sur les LB ou LT peut être variable ; en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des LT alors que la myricétine est active sur les LB.

L'effet antiprolifératif des FVs pourrait s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéines kinases C ou protéine tyrosine kinase). Par ailleurs, les FVs sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes.

La quercétine a un effet anti-inflammatoire en inhibant quelques enzymes de synthèse tel que la cyclooxygénase et la lipoxygénase (**Middleton Jr et al., 1984**) (**Gonzalez-Gallego et al., 2007**).

1.5.3. Activités antivirales :

Les FVs sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus

d'influenza, le virus de l'herpès (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A (Spedding *et al.*, 1989),(Choi *et al.*, 2009).

Certains chercheurs ont d'abord suggéré que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte ; bloquant ainsi tout le processus infectieux.

D'autres travaux plus récents ont ensuite démontré que les FVs inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARNm viral. Ceci, impliquait que les FVs n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication viral (Choi *et al.*, 2009).

1.5.4. Effets protecteurs cardio-vasculaires :

Les FVs inhibent l'oxydation des lipoprotéines qui est la cause des atteintes dues à l'accumulation de dépôts lipidiques (essentiellement le cholestérol) dans les vaisseaux sanguins (Fiorucci, 2006).

L'effet des FVs réside de leurs capacités à diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leurs résistances (Alouache *et al.*, 2010).

1.5.5. Activité antibactérienne :

De nombreux composés flavoniques (apigénine, kaempferol et d'autres) sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes gram négatif (*Escherichia coli...*) et gram positif (*Staphylococcus aureus...*) (Ulanowska *et al.*, 2007).

L'effet antimicrobien des produits polyphénoliques est dû partiellement à une perturbation des fractions lipidiques de la membrane plasmique des microorganismes, qui en résulte une altération de la perméabilité de la membrane et la perte de ces organites intracellulaires (Trombetta *et al.*, 2005).

2. Les lipoxygénases

2.1. Définition générale :

Selon la nomenclature officielle, les lipoxygénases ou LOX font partie de la famille des oxydoréductases qui incorporent des atomes d'oxygène (EC 1.13.11.12) sur un substrat (Alberti, 2013).

Les LOX sont des enzymes présentes chez tous les eucaryotes et les procaryotes (Palmieri-Thiers, 2008).

Ces enzymes contiennent du fer non-héminique catalysent la dioxygénation des

AGPI. LOX sont des enzymes ubiquitaires qui participent au métabolisme des acides gras polyinsaturés.

L'AcA, acide gras majoritaire dans les cellules animales et le substrat de l'enzyme LOX qui catalyse la formation d'hydro peroxydes d'acides gras, de leucotriènes et de lipoxine qui sont des molécules ayant un rôle prépondérant dans diverses atteintes physiopathologiques : l'inflammation, l'allergie, les maladies métaboliques et le cancer, ... (Beneytout *et al.*, 1989).

2.2. Propriétés biochimiques des lipoxygénases :

Diversités :

Six gènes LOX fonctionnels sont présents dans le génome humain : ALOX15, ALOX15B, ALOX12, ALOX12B, ALOXE3, ALOX5, qui codent pour six isoformes différentes (Mehrabian *et al.*, 2002). Trois LOX agissent principalement sur les AGPI : 15-LOX, 12-LOX et 5-LOX. (Yamamoto *et al.*, 1992)

Nomenclature :

La nomenclature conventionnelle classe les LOX animales en fonction du site de fixation de l'oxygène sur l'AcA.

Cette nomenclature peut cependant être discutable car elle est spécifique des positions d'oxygénation sur l'AcA et n'est pas adaptée aux autres AGPI. La famille des 15-LOX regroupe 2 isoformes : la 15-LOX1 et la 15-LOX2.

La 15-LOX1, qui est codée par le gène ALOX15, est principalement exprimée dans les éosinophiles, dans les réticulocytes et dans les cellules de l'épithélium broncho-alvéolaire.

La 15-LOX2, enzyme codée par le gène ALOX15B, est hautement exprimée dans les cellules épithéliales.

Ces 15-LOX sont impliquées dans plusieurs processus biologiques tels que la régulation de la pression sanguine et de l'hypertension et dans la régulation de la carcinogénèse (Sadeghian *et al.*, 2016).

Localisation :

Tableau 1: Les principales isoformes de lipoxygénases présentes chez l'Homme. (Kuhn *et al.*, 2015).

Gène	Protéine	Expression majeure	Références
ALOX15	15(S)-LOX1	Eosinophiles, réticulocytes, cellules épithéliales broncho-alvéolaire.	(Sigal <i>et al.</i> , 1988) (Cransac, 1992)
ALOX15B	15(S)-LOX2	Cellules épithéliales.	(Brash <i>et al.</i> , 1997)
ALOX12	12(S)-LOX Plaquettaire	Plaquettes, peau	(Funk <i>et al.</i> , 1990)
ALOX12B	12(R)-LOX	Epiderme	(Boeglin <i>et al.</i> , 1998)
ALOX5	5(S)-LOX	Leucocytes, macrophages, cellules dendritiques.	(Rådmark <i>et al.</i> , 2010)

2.3. Structure de lipoxygénase :

La structure primaire protéinique, c'est-à-dire la séquence des acides aminés constitutifs de la LOX, est déduite à partir de la succession des nucléotides du brin d'ADN codant obtenu par clonage.

En général, les méthodes de clonage s'appuient sur l'isolement de la protéine et l'utilisation des "sondes" constituées d'anticorps ou d'oligonucléotides pour mettre à jour le brin d'ADN codant.

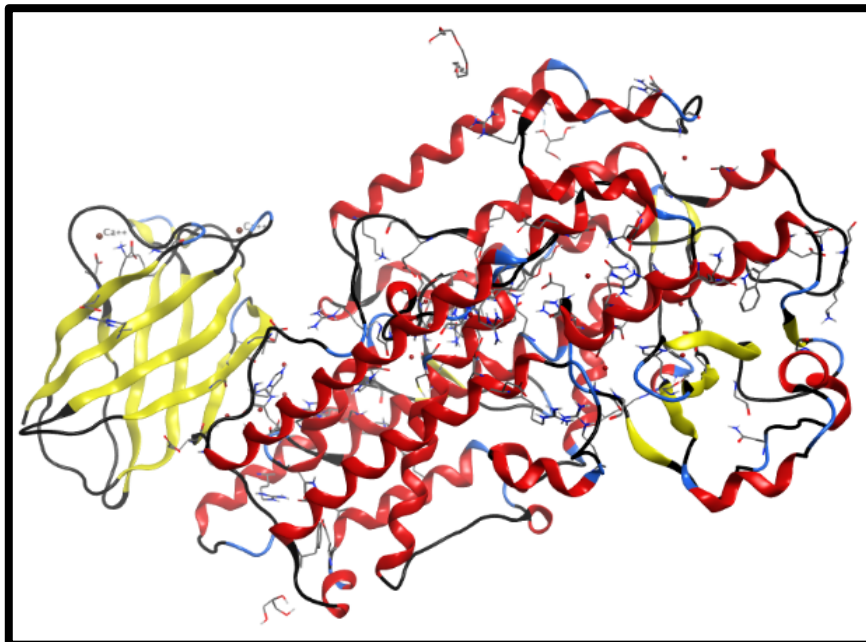


Figure 4: La structure 3D de la lipoxygénase (PDB 4nre) obtenu par logiciel MOE.

La 15-lipoxygénase

La structure primaire de la 15-LOX, déduite à partir du clonage réalisé sur des réticulocytes humains, montre un polypeptide de 661 acides aminés de masse moléculaire 74 600 Dal.

Cette chaîne polypeptidique est marquée dans son ensemble, par un caractère hydrophile en accord avec sa localisation cytosolique une zone hydrophobe existe au centre de la protéine (comme dans le cadre de la 5-LOX).

Aucun site pour l'ATP, la fixation de calcium, une glycosylation n'a été identifié. Chez le lapin, la 15-lipoxygénase est proche de celle de l'homme car elles ont en commun 81 % de l'ensemble de la séquence en acides aminés (**Gupta et al., 1997**).

Sa masse moléculaire est de 78 00 Dal, elle possède un point isoélectrique à 5,5 et comme l'humaine un atome de fer par molécule.

NB !

La biologie moléculaire fait apparaître que chez l'homme et les autres mammifères il existe un seul type de 15-LOX alors que plusieurs isoenzymes ont été rapportées chez les 15-LOX végétales comme pour les 12-LOX des mammifères (**Cransac, 1992**).

Le rôle de la 15-lipoxygénase :

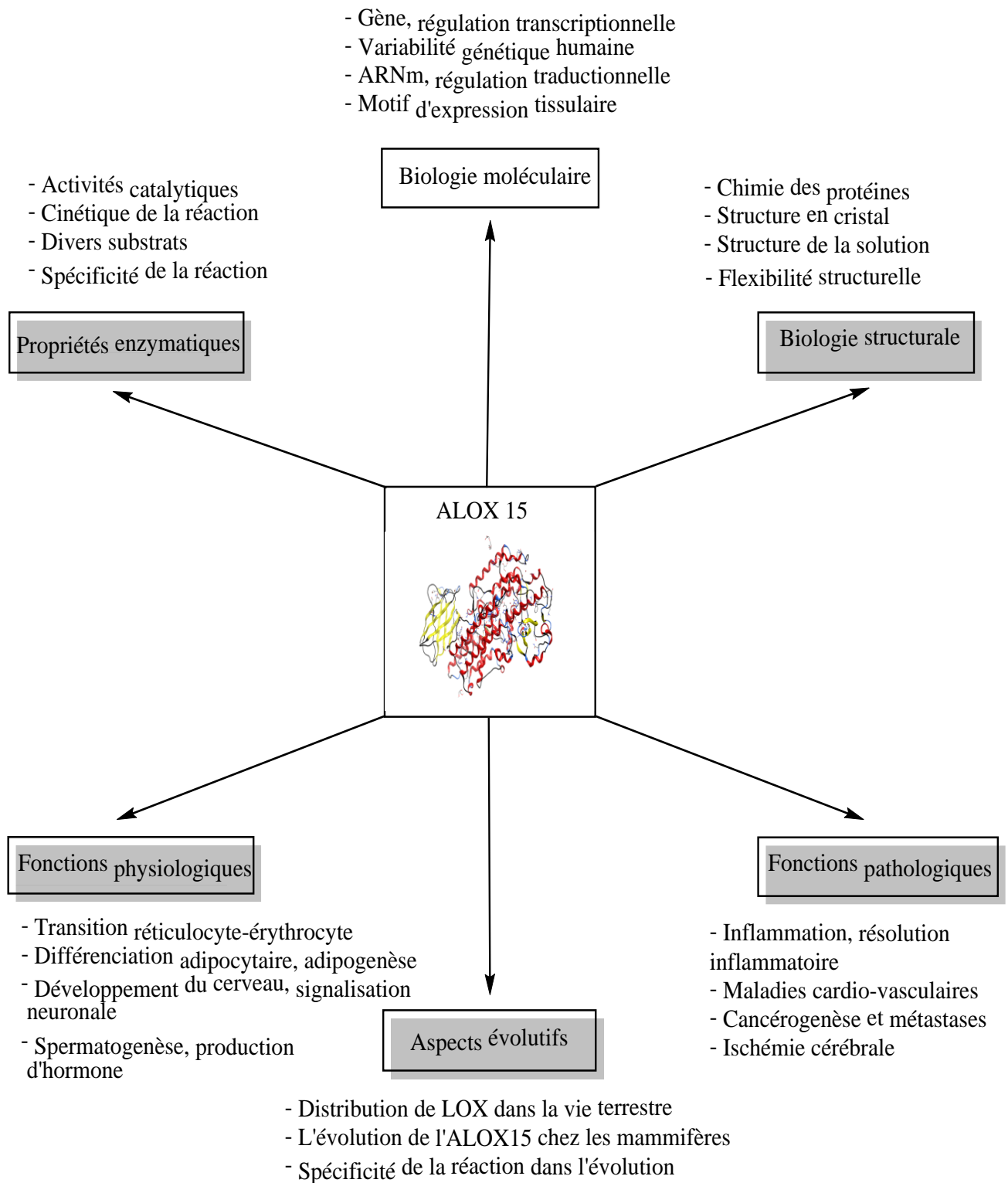


Figure 5: Le rôle de la lipoxygénase obtenu par le programme ChemDraw.

<https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0378111915009142-fx1.jpg>

2.4. La voie métabolique de lipoxygénases :

La voie des LOX comporte trois enzymes peroxydantes lipidiques qu'on retrouve dans le tissu humain, incluant les 5-LOXs, 12-LOXs et 12/15-LOXs. Leurs noms correspondent à la position du carbone de l'AcA qui subit l'oxygénation puisque ce sont des enzymes qui ont la capacité d'introduire un atome d'oxygène à une position précise au niveau des AGPI.

Ces enzymes sont impliqués dans la biosynthèse des leucotriènes et des lipoxines (figure7).

Ces produits sont importants dans les réponses biologiques de l'inflammation et dans les réactions d'hypersensibilité. La 5-LOX est une enzyme impliquée dans la régulation de l'inflammation et intervient dans la biosynthèse des leucotriènes (**Chawengsub et al., 2009**).

Une autre LOX humaine a été récemment clonée, la 15-LOX qui se retrouve sous deux isoformes 15-LOX1 et 15-LOX2, et qui diffèrent entre elles par leurs substrats ciblés et par le type cellulaire dans lequel elles sont exprimées.

Cette LOX produit le mêmes métabolites que la 12/15-LOX, mais elle joue un rôle physiologique différent (**Conrad et al., 1992**). La 15-LOX1 est présente dans les réticulocytes, les éosinophiles et les macrophages. Elle convertit l'acide linoléique en 13(S) acide hydroxyoctadécadiénoïque (13- HODE) alors que la 15-LOX2 est plutôt exprimée dans les cellules de la prostate, les poumons et la cornée, et convertit l'AcA au en 15(S) acide hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) (**Janakiram et al., 2011**).

Comme précisé précédemment, la 5-LOX est responsable de la biosynthèse des leucotriènes LTA₄, LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄, ces métabolites sont considérés comme des agents pro-inflammatoires potentiels, impliqués dans la physiopathologie de plusieurs maladies inflammatoires et dans les réactions d'hypersensibilité immédiate comme l'asthme, le psoriasis et l'arthrite rhumatoïde (**Homaidan et al., 2002**).

D'une part, il a été démontré que le LTB₄ a la capacité d'activer la phagocytose, la chimiotaxie, l'adhésion et l'agrégation cellulaire. De plus, son activité s'avère être élevée dans le liquide synovial des patients atteints d'arthrose.

D'autre part, les LTC₄, LTD₄ et LTE₄ sont de nature vasoactive et ont la capacité de stimuler la bronchoconstriction (**Horn et al., 2013**).

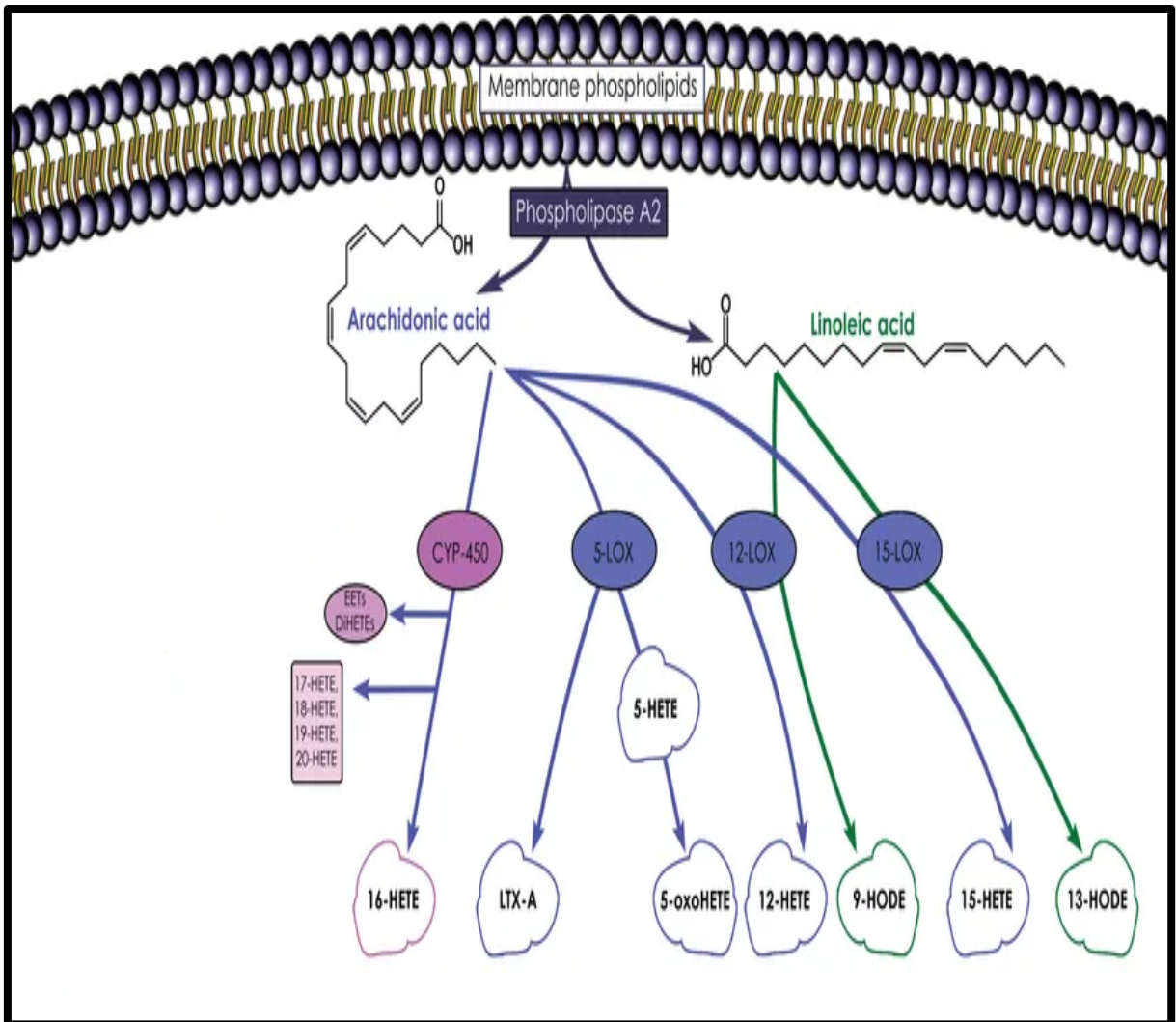


Figure 6: La voie métabolique de lipoxygénase.

(Sadeghian *et al.*, 2016)

Chapitre (2)

Matériels et méthodes

1. Le Docking moléculaire

Le docking peut être défini comme étant l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation de complexes moléculaires. Il a des applications pratiques dans l'ingénierie des protéines et la conception de nouveaux médicaments. Il y a différents types de docking dont ligand-protéine, protéine-protéine, glucide-protéine et ADN-protéine.

Le « docking » moléculaire consiste à prédire la ou les structures des complexes formés entre une molécule active et une protéine.

- Les algorithmes de calcul génèrent aléatoirement un grand nombre d'orientations possibles pour trouver « la meilleure façon d'insérer » la molécule dans une protéine (au niveau du récepteur ou du site actif).
- Le programme prend en compte tous les degrés de liberté de la molécule (translation et rotation).
- Pour chaque possibilité l'énergie est calculée en Mécanique Moléculaire, prenant ainsi en compte toutes les interactions ligand-récepteur (liaisons de Van der Waals, liaisons H, hydrophobie...).
- On obtient ainsi un « score » pour estimer la meilleure interaction ligand/ récepteur.
- Le score est l'enthalpie libre de liaison (il doit être minimisé) (**Trouillas, 2009**).

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires : le docking et le scoring.

- **Le Docking (la première)** : est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- **Le Scoring (la deuxième)** : est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le Ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées (**Boucherit, 2012**).

2. Matériels d'études :

L'objectif essentiel de notre travail de master est une initiation aux approches de modélisation par docking moléculaire afin de proposer de nouveaux inhibiteurs de la 15-LOX. Pour ce faire, nous avons utilisé le matériel suivant :

Micro-ordinateur :

Nous avons utilisé deux micro-ordinateurs ayant une RAM de 4,00 GO et un processeur 2.40 GHz Intel(R) Core(TM) i5 de la 5^{ème} génération, sous Windows 10 Education.

Programme :

Dans cette partie de notre étude, deux programmes ont été utilisés pour réaliser la partie pratique :

- Le premier logiciel « **MOE** » (Molecular Operating Environment) version 2015.10 sert à préparer et visualiser aussi bien l'enzyme que les ligands étudiés.

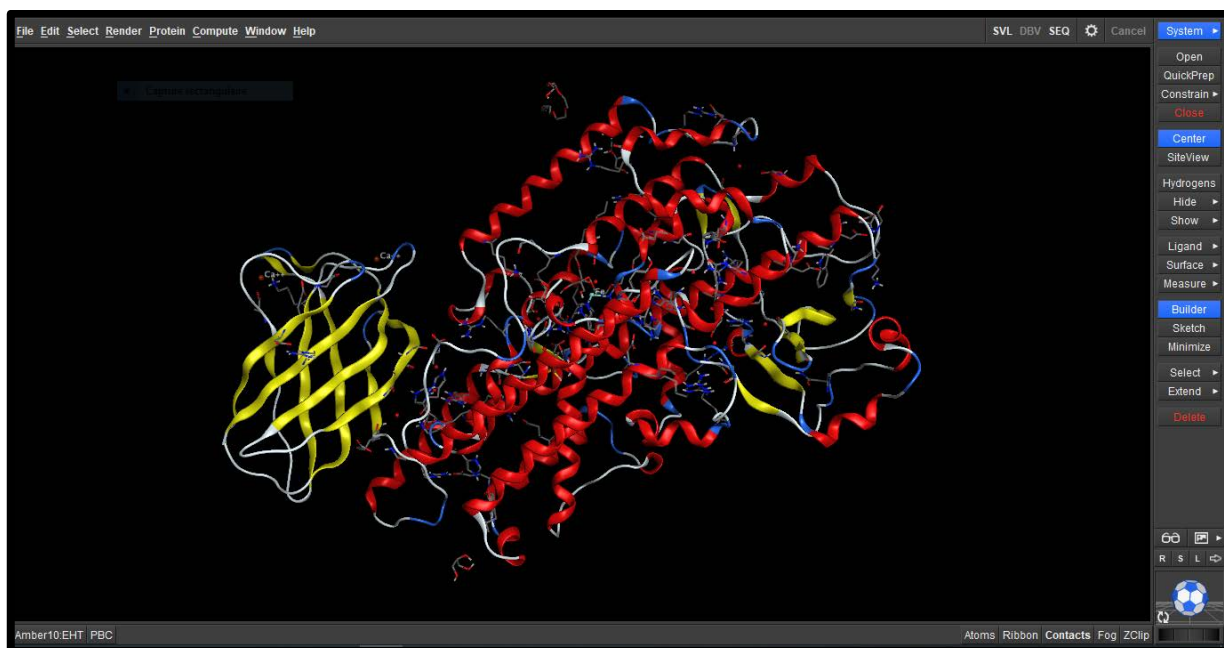


Figure 7: L'interface de la page d'accueil du logiciel MOE.

- **ChemDraw** fait partie des logiciels majeurs en matière d'édition moléculaire, il dispose de fonctionnalités intéressantes à l'image des nombreux outils d'édition et de calcul.

Utilisé dans les laboratoires et les classes de chimie, il nous permet de dessiner et mettre en page des dessins moléculaires.

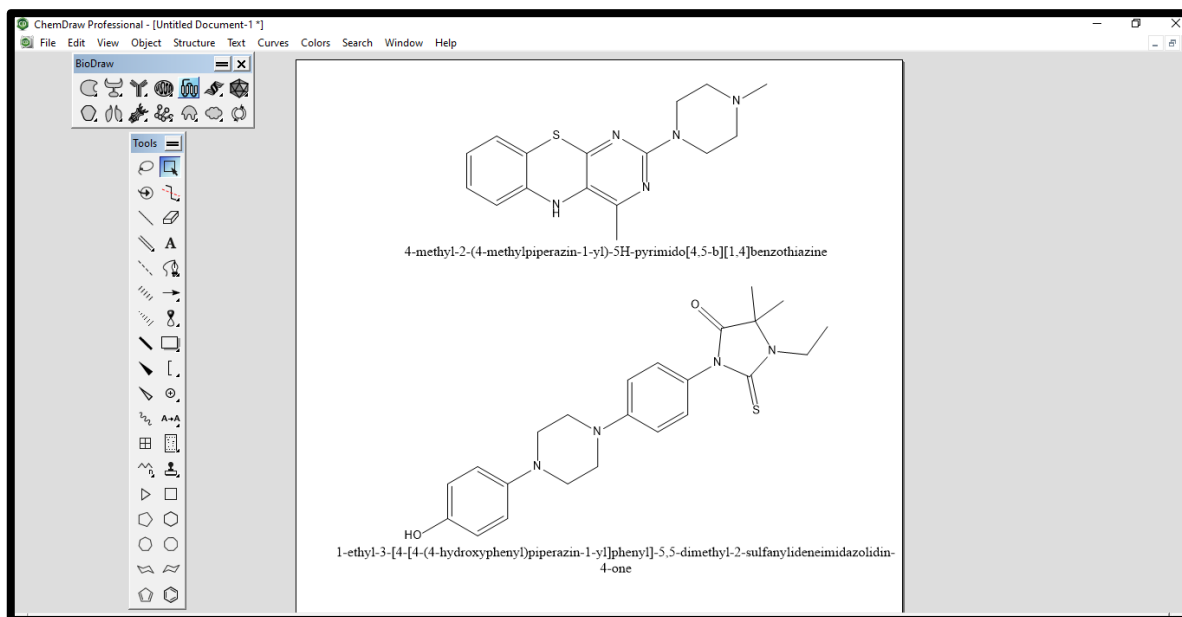


Figure 8: L'interface graphique de ChemDraw.

On-peut-consulter-ce-serveur-via-le-lien : <https://www.clubic.com/telecharger-fiche431267-chemdraw.html>

Banque des données :

➤ PDB (Protein Data Bank)

Est une collection mondiale de données sur la structure 3D de macromolécule biologique : protéine d'intérêt pharmaceutique.

La structure de l'enzyme 15-LOX faisant l'objet de ce travail provient de la PDB, leur consultation est gratuite et peut se faire directement depuis les sites internet de la banque : <https://www.rcsb.org/>.

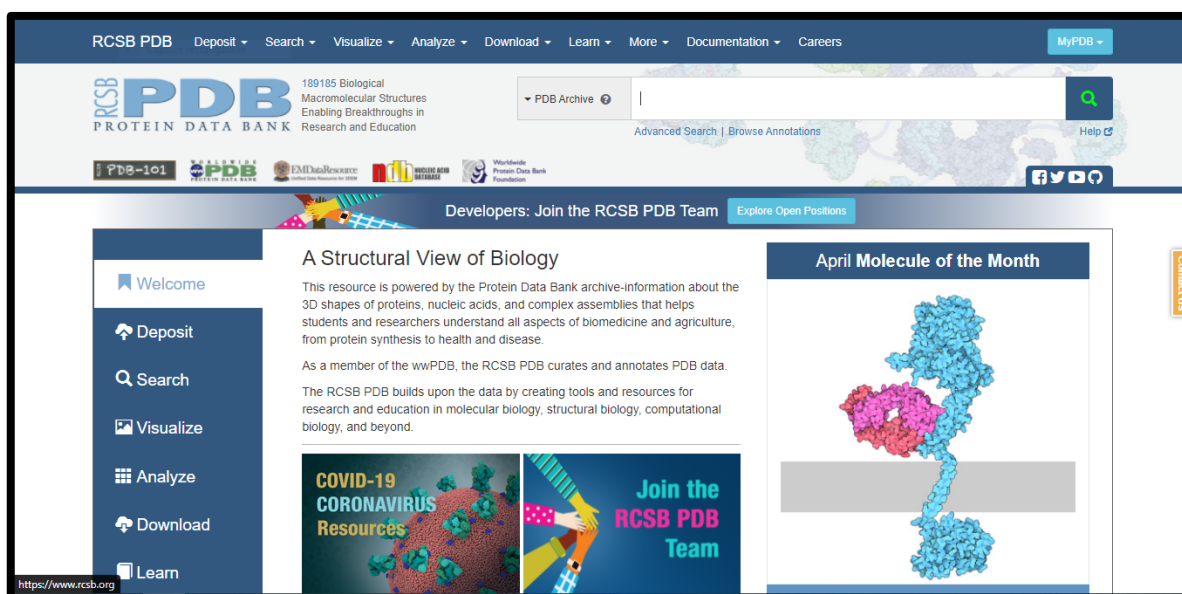


Figure 9: L'interface de la page d'accueil du RCSB PDB.

➤ **Pubchem :**

C'est une banque de donnée américaine des molécules chimiques gérée par NCBI (*le National Center for Biotechnology Information*). Elle contient actuellement plusieurs millions de composés dont la structure et les propriétés physico-chimiques sont gratuitement accessibles. Cette banque a été utilisée pour faire ressortir des similaires structuraux de notre ligand. On-peut-consulter-cette-banque-de-donnée-via-le-lien : <https://pubchem.ncbi/>

➤ **SwissADME :**

L'abréviation ADMET représente les concepts pharmacocinétiques suivants : l'absorption, la distribution, la métabolisation, l'excrétion et toxicité.

Ce sont des critères qui décrivent la disposition d'une molécule bioactive dans un organisme. Ils expriment les concentrations du produit dans les différents tissus et système circulatoire de l'organisme.

Les résultats obtenus par ces critères permettent d'analyser la performance et l'efficacité d'un produit afin de juger sa capacité à devenir un médicament et son intérêt à poursuivre son développement pour des études cliniques. On-peut-consulter-ce-serveur-via-le-lien : <http://www.swissadme.ch/>

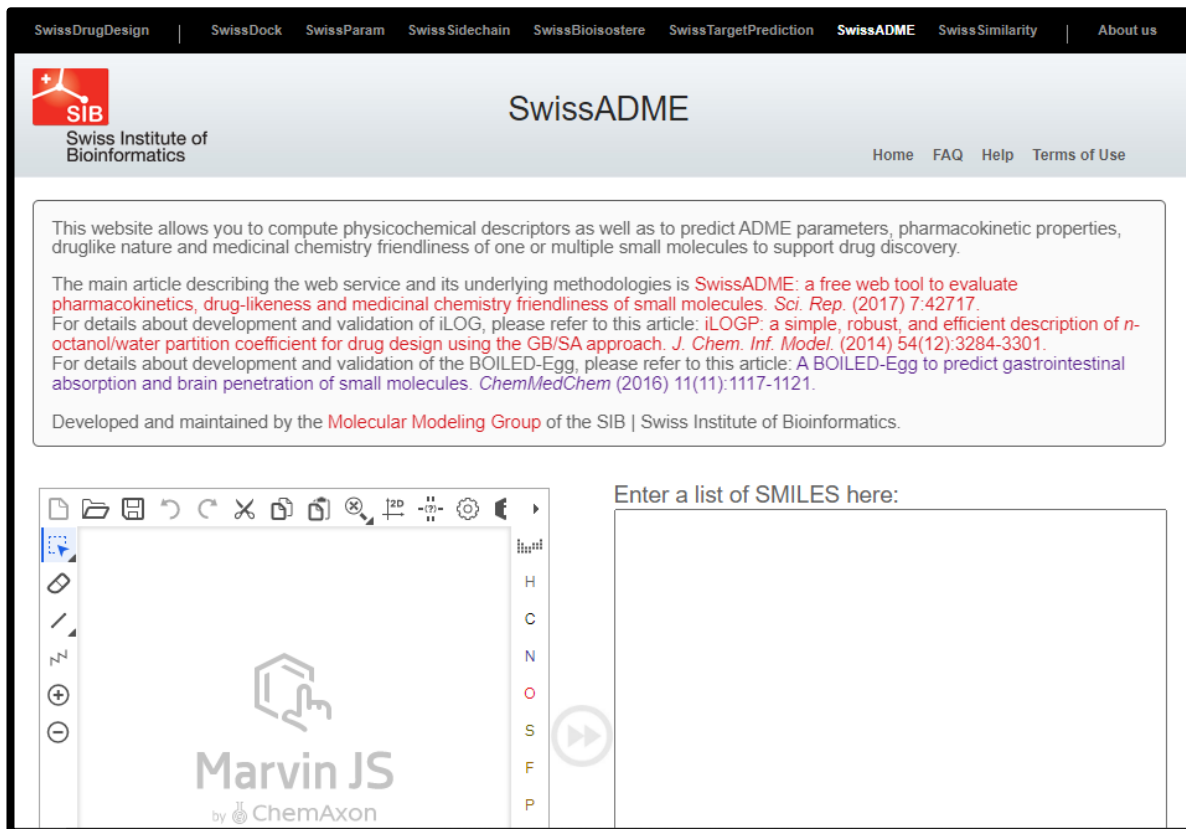


Figure 10: L'interface graphique de SwissADME

➤ **ADMETlab :**

ADMETlab 2.0 est une version améliorée de l'ADMETlab largement utilisé pour l'évaluation systématique des propriétés ADME, ainsi que certaines propriétés physicochimiques et la convivialité de la chimie médicinale. Avec des mises à jour importantes des modules fonctionnels, des modèles prédictifs, des explications et de l'interface utilisateur. ADMETlab 2.0 a une plus grande capacité à aider les chimistes médicaux à accélérer le processus de recherche et de développement de médicaments. On-peut-consulter-cette-palateforme-via-le-lien : <https://admetmesh.scbdd.com/>

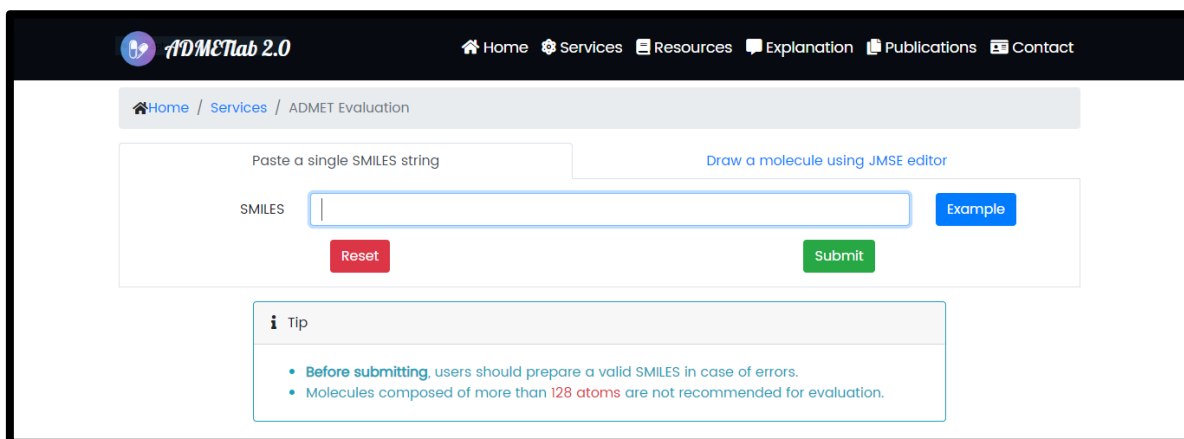


Figure 11: L'interface graphique de la plateforme ADMETlab.

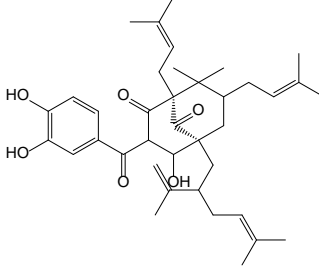
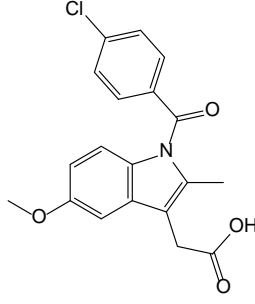
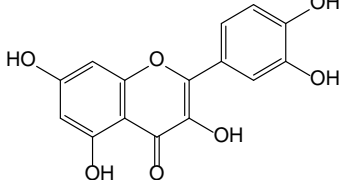
3. Méthodes :

Plusieurs méthodes sont utilisées afin de lancer le docking moléculaire. Les plus couramment utilisées sont celles répandues en raison de leur facilité et leur rapidité.

3.1. Préparation de la protéine :

La cible thérapeutique que nous avons étudiée dans notre travail est la 15-LOX dont la structure 3D a été obtenue dans la banque de donnée PDB.

Les codes PDB de ces complexes des « 15-LOX » ainsi que leurs inhibiteurs sont représentés dans le tableau.

Guttiferone E		
Indométhacin		3715
Quercétine		5280343

Parmi ces complexes ainsi préparées, nous avons choisi le code 4nre ce choix est dicté par leur faible valeur de résolution 2.63 Å. Le complexe a été téléchargé au format Pdb.

L'enzyme étant formée de deux chaînes, nous avons éliminé les molécules d'eau et le ligand pour permettre une utilisation plus aisée de l'enzyme avec un site actif libre lors du docking moléculaire. La protéine ainsi préparée est enregistrée dans un fichier de format .moe que reconnaît logiciel MOE version 2015.10.

3.2. Préparation de ligand :

Cette méthode est basée sur la modélisation de 18 structures de ligands, ont été téléchargées à l'aide de la chaîne de programmes PubChem sous forme 2D.

Nous avons également, préparé certaines structures par le programme ChemDraw qui sont ensuite produites pour l'amarrage avec logiciel MOE, les molécules ainsi obtenues sont enregistrées au format mdb.

3.3. Génération du protomol :

Logiciel MOE a été utilisé pour réaliser le docking des ligands dans le site actif d'une cible donnée. Dans un premier temps, il génère un protomol au forma .moe pour identifier le site actif de l'enzyme étudiée.

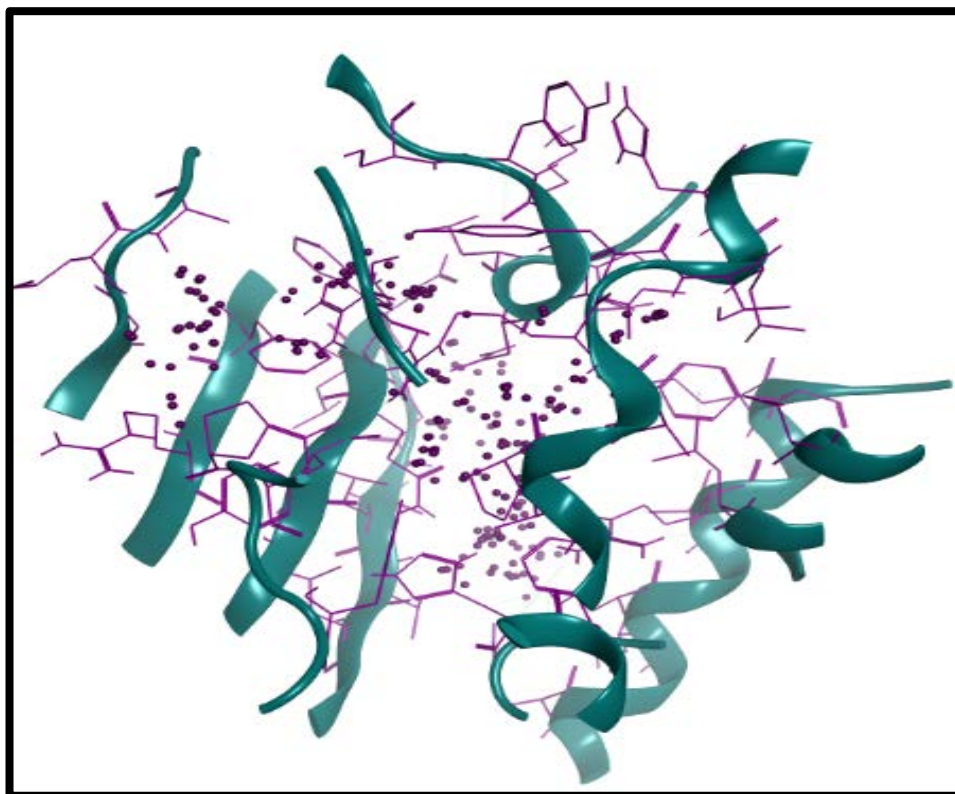


Figure 12: Protomol généré pour le complexe 4nre obtenu par le programme MOE.

3.4. Docking moléculaire :

Cette étape nécessite la disponibilité de la protéine format .moe, le protomol généré dans l'étape précédente et les ligands sous format .mdb. Le docking moléculaire par logiciel «MOE» permet d'avoir les meilleures positions (conformations) de chaque ligand au sein du site actif étudié, classées par leur score.

Chapitre (3)

Résultats et discussion

1. La fiabilité du programme MOE

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la 15-LOX par diverses molécules, nous avons tenté d'évaluer la fiabilité de logiciel MOE utilisé. Pour cela, nous avons fait appel au test de RMSD et l'analyse visuelle.

1.1. Test RMSD

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (*root-mean-square dérivation*) de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB. La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms (Chikhi *et al.*, 2008; Vieth *et al.*, 1998).

Le test de fiabilité RMSD a été évalué à l'aide de 90 complexes protéine-ligand. Dans la figure suivante (Figure12) les résultats sont donnés en pourcentage (%), à deux intervalles de RMSD.

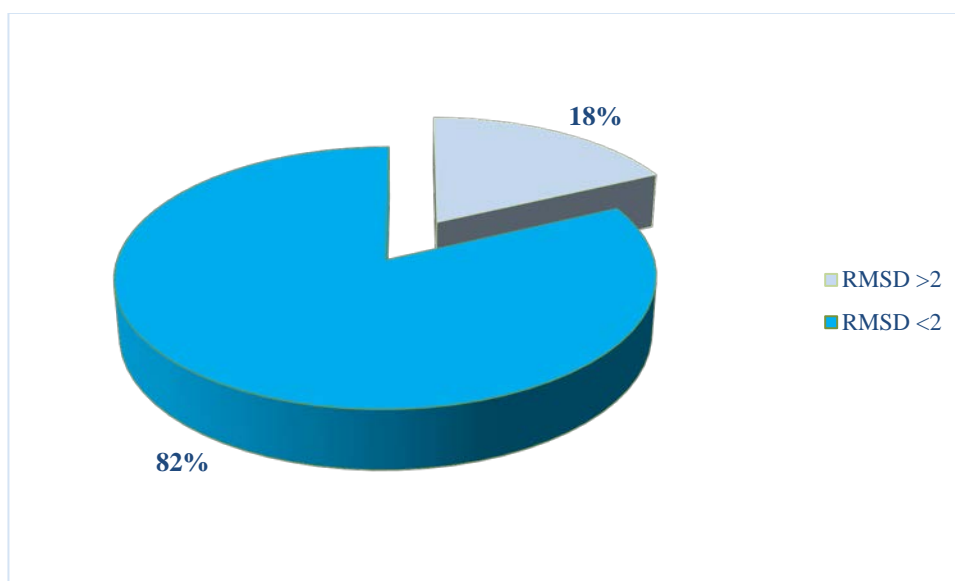


Figure 13: Résultats en % obtenus par MOE à deux intervalles de RMSD (Å).

D'après les résultats du graphique, nous remarquons que logiciel MOE reproduit bien les données expérimentales. En effet, 82 % des valeurs RMSD sont inférieures à 2Å et que seulement 18 % des résultats sont supérieurs à 2Å.

Tableau 4: Résultats de docking moléculaire des standards.

Molécules	RMSD	Energies (Kcal/mol)	Résidus très proches	Distances (Å).	Type d'interaction
Indométacine	0,9229	-7,3564	Thr406	2,89	Hydrogène
			Ile174		Hydrophobe
Quercetine	0,9203	-6,1234	Asp625	2,88	Hydrogène
			His394		Arène-H

Au regard du tableau précédent, nous remarquons que la quatrième molécule à présenter une meilleure valeur d'énergie de -10,1702 elle possède donc un meilleur effet inhibiteur.

Tableau 5: Résultats d'analyse in vitro de l'IC50 de la 15-LOX par les flavonoïdes (**Dzoyem et al., 2017**).

Composés	IC50 (µg/ml)
Mol 1	/
Mol 2	45,85 ± 0,48
Mol 3	25,2 ± 1,86
Mol 4	32,14 ± 1,19
Mol 5	38,97 ± 1,86
Mol 6	57,19 ± 2,80
Mol 7	53,47 ± 2,56
Mol 8	74,39 ± 5,09
Indométacine	29,49 ± 1,69
Quercetine	82,24 ± 0,43

2. L'analyse visuelle des interactions

L'analyse visuelle est une étape essentielle pour confirmer les résultats du test RMSD.

Pour cela, nous nous sommes limités dans ce travail à l'étude des meilleures poses d'amarrage pour chaque inhibiteur liés au score obtenu et à leurs interactions existantes.

Les figures qui suivent représentent le mode d'interaction avec le site actif de la 4nre qui a été étudié avec logiciel de visualisation MOE.

2.1. Le complexe (-) Pinostrobin_15LOX

Le docking de (-) Pinostrobin dans le site actif de la 15-LOX se caractérise par une énergie d'interaction égale -7,0480 Kcal/mol. L'analyse visuelle montre que le complexe formé entre la 15LOX et le ligand ((-) Pinostrobin) est stabilisé par une interaction hydrophobique avec les résidus Thr 409 et Tyr 408.

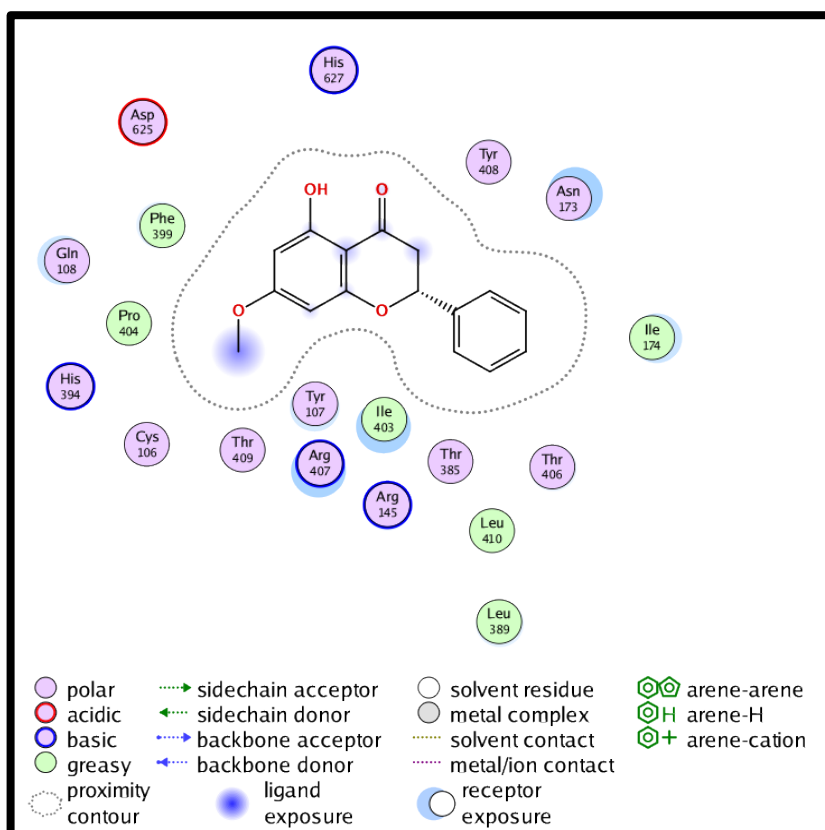


Figure 14: Mode d'interaction du composé 1 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.

2.3. Interactions isobavachalcone_15LOX

D'après l'amarrage moléculaire, on s'aperçoit que l'énergie est égale à -7,1994 Kcal/mol. Tandis que l'analyse visuelle montre que le complexe formé entre la 15-LOX et le ligand (isobavachalcone) est stabilisé par une interaction hydrogénique avec le résidu Arg145 dont la distance 3,43.

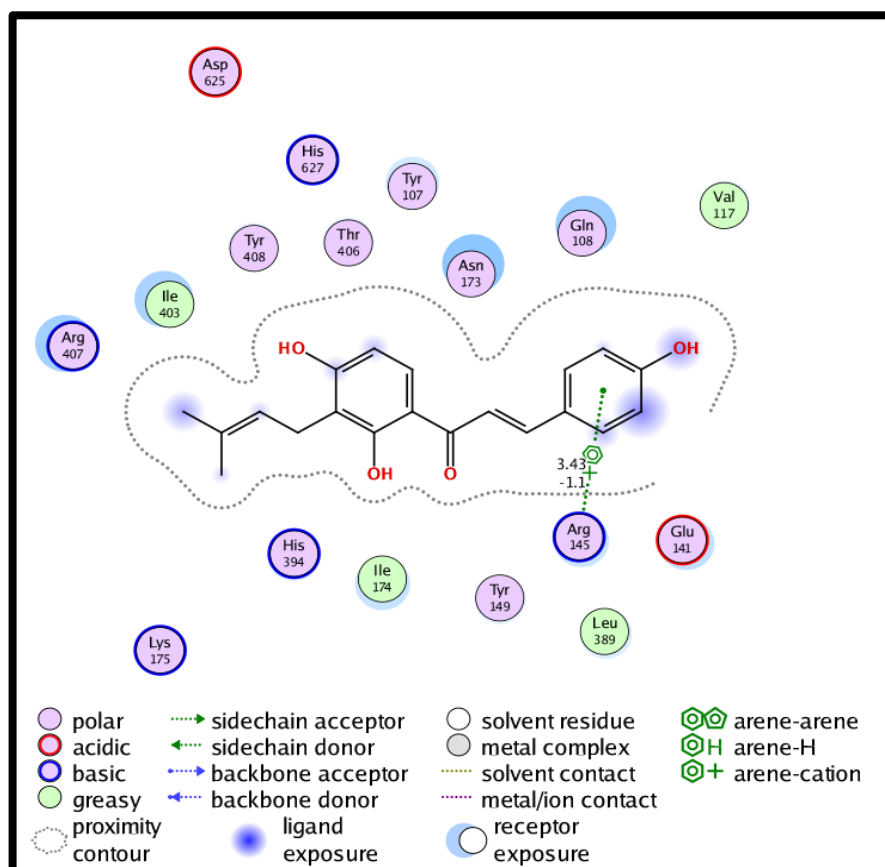


Figure 16: Mode d'interaction du composé 21 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.

2.8. Interactions guttiferone E_15LOX

Le docking de guttiferone E dans le site actif de la 15-LOX donne une énergie d'interaction égale -8,5117 Kcal/mol. De plus, on observe deux interactions hydrogéniques ont formées avec le résidu Glu111 dont les distances de 3,06 et 3,16. Cette dernière ainsi formée avec le résidu Thr115 dont la distance de 3,00.

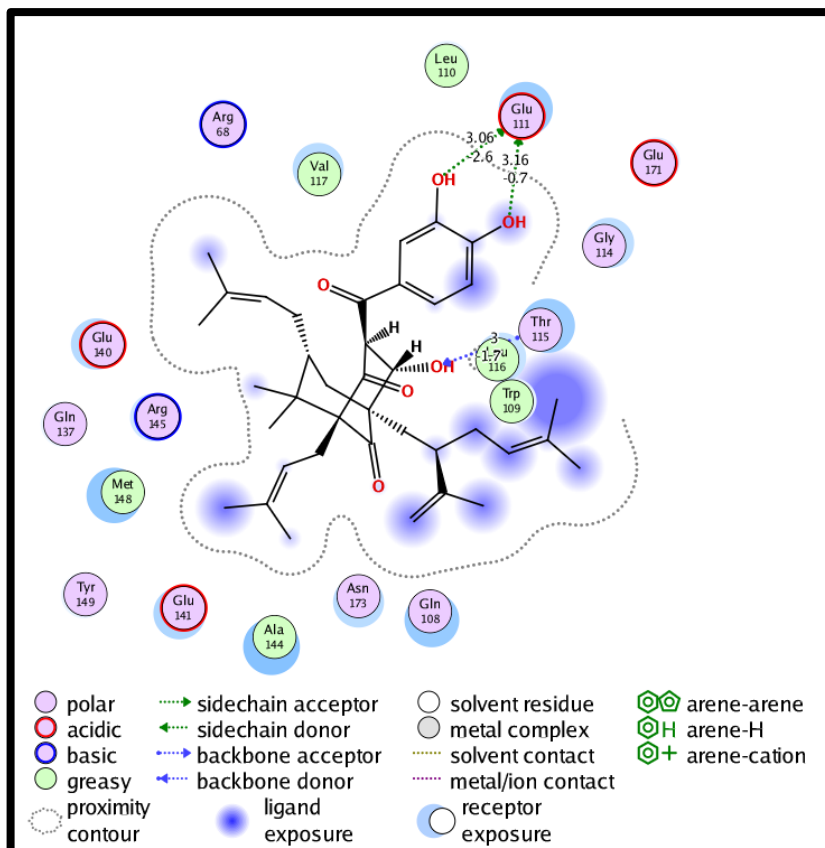


Figure 21: Mode d'interaction du composé 78 avec le site actif de 4nre obtenu par MOE.

3. Propriétés ADMET

3.1. Propriétés physico-chimiques

Tableau 6: Propriétés physicochimiques des standards

Quercétine		Indométacine	
Propriétés	Composé	Propriétés	Composé
Formule	C15H10O7	Formule	C19H16ClNO4
Poids moléculaire PM (g/mol)	302.04	Poids moléculaire PM (g/mol)	357.08
nombre d'accepteur d'hydrogène (nON)	7	nombre d'accepteur d'hydrogène (nON)	4
nombre de donneurs d'hydrogène (nOHNH)	5	nombre de donneurs d'hydrogène (nOHNH)	1
Solubilité	Soluble	Solubilité	Modérée
La surface polaire topologique (TPSA Å ²)	131.36	La surface polaire topologique (TPSA Å ²)	68.53
Règle de Lipinski	Oui	Règle de Lipinski	Oui
Règle de Veber	Oui	Règle de Veber	Oui
Coefficient de partage (Log P)	2.155	Coefficient de partage (Log P)	4.251
Accessibilité à la synthèse chimique	3,23	Accessibilité à la synthèse chimique	2,51

administrés par voie orale sans soucis de biodisponibilité. Cependant, ces composés ont présentés une faible solubilité dans l'eau ce qui peut influencer leurs solubilités et circulations dans le sang avec une concentration suffisante. Toutefois, il sera possible de contourner ce problème lors de l'optimisation de ces composés en tenant en compte la valeur moyenne de l'accessibilité à la synthèse chimique de 4,42 pour le premier composé, 7,04 pour le deuxième composé et 3,92 pour le troisième composé. Rappelons que ce critère a été simulé en chiffre allant de 1 (facile à synthétiser) jusqu'à 10 (très difficile à synthétiser).

3.2. Propriétés pharmacocinétiques

Tableau 8: Propriétés pharmacocinétiques des standards

Quercétine		Indométacine	
Propriétés	Composé	Propriétés	Composé
GI (Gastro intestinal) absorption	Elevée	GI (Gastro intestinal) absorption	Elevée
BBB (Blood Brain Barrier) perméabilité	Non	BBB (Blood Brain Barrier) perméabilité	Oui
CYP1A2 inhibition	Oui	CYP1A2 inhibition	Oui
CYP2C19 inhibition	Non	CYP2C19 inhibition	Oui
CYP2C9 inhibition	Non	CYP2C9 inhibition	Oui
CYP2D6 inhibition	Oui	CYP2D6 inhibition	Non
CYP3A4 inhibition	Oui	CYP3A4 inhibition	Non

3.3. Excrétion

Tableau 10: Propriétés d'excrétion des standards

Quercétine		Indométacine	
Propriétés	Composé	Propriétés	Composé
CL	Modéré	CL	Faible
T ½	< 3h	T ½	< 3h

Tableau 11: Propriétés d'excrétion des composés 1-hydroxy-3,6,7-tri-O,O,O-triprenylxanthone. (mol4), isoxanthochymol (mol7), 1,6-dihydroxy-3,7-bis((3-methylbut-2-en-1-yl)oxy)-9H-xanthen-9-one (mol5).

Mol 4		Mol 7		Mol 5	
Propriétés	Composé	Propriétés	Composé	Propriétés	Composé
CL	Modéré	CL	Modéré	CL	Modéré
T ½	< 3h	T ½	< 3h	T ½	< 3h

La clairance correspond à la capacité de l'organisme à épurer la molécule après avoir atteint la circulation générale, elle correspond au volume de plasma épuré par unité de temps, en général par heure. La demi-vie d'élimination correspond au temps nécessaire pour que la concentration plasmatique soit diminuée de moitié, la demi-vie dépend du volume de distribution et de la clairance. Rappelons que ce critère a été simulé en chiffre allant de (élevée : >15 mL/min/kg ; modérée : 5-15 mL/min/kg ; faible : <5 mL/min/kg) (courte demi-vie : <3h ; longue demi-vie : >3h).

Conclusion

Et perspectives

Conclusion et perspectives

Notre travail de recherche avait pour but essentiel de mettre en évidence de nouveaux inhibiteurs de la lipoxycgénase en faisant appel à l'approche in-silico par docking moléculaire, pour cela nous avons choisi logiciel de docking « MOE : Molecular Operating Environment », Au préalable, nous avons testé la performance de ce dernier utilisé dans cette étude, par le test RMSD (root-mean-square dérivation) sur 18 complexes, 82% ont .° présenté un RMSD inférieure à 2 Å

On peut résumer que tous les composés végétaux sélectionnés aient bien interagi avec la protéine 15-LOX, mais le Mol 4 et mol 5 étaient ceux qui ont amarré la protéine . dans une manière très appréciable avec de très bons scores d'amarrage

Il est intéressant de noter que les composés précédents ont également obtenu de très bons résultats de l'étude in-silico, soutenant et validant ainsi les résultats dans le test d'inhibition LOX in-vitro. De plus, il a également été observé que dans les études in-silico . et in-vitro, les phytocomposés ont inhibé l'enzyme lipoxycgénase

Les résultats de l'étude, en particulier le Mol 4, Mol5 et le Mol 6 pourraient être considérés comme de bons inhibiteurs de la protéine 15-LOX humaine et la prédiction des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques ainsi que la toxicité potentielle, nous . renseigne de manière négative (non toxique) sur ses propriétés ADMET

Pourraient donc s'avérer des candidats prometteurs pour la formulation de . médicaments destinés à lutter contre tous les troubles anti-inflammatoires

Comme perspectives d'avenir, des tests in-vivo de l'activité biologique de ces inhibiteurs sont recommandés pour compléter les résultats théoriques et vérifier l'efficacité . de l'approche in-silico

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- Alberti, J.-C. (2013). *Etude du mécanisme catalytique de la lipoxygénase 1 d'olive*. Université Pascal Paoli,
- Alouache, S., Laouar, S., Laribi, W., & Akroum, S. E. (2010). *Sensibilité des microorganismes aux polyphénols*. université de jijel,
- Anderson, J. J., Anthony, M. S., Cline, J. M., Washburn, S. A., & Garner, S. C. J. P. h. n. (1999). Health potential of soy isoflavones for menopausal women. 2(4), 489-504.
- Beneytout, J.-L., Andrianarison, R.-H., Rakotoarisoa, Z., & Tixier, M. J. P. p. (1989). Properties of a lipoxygénase in green algae (*Oscillatoria* sp.). 91(1), 367-372.
- Boeglin, W. E., Kim, R. B., & Brash, A. R. J. P. o. t. N. A. o. S. (1998). A 12R-lipoxygénase in human skin: mechanistic evidence, molecular cloning, and expression. 95(12), 6744-6749.
- Bouakaz, I. (2006). *Etude phytochimique de la plante Genista Microcephala*. Batna, Université El Hadj Lakhder. Faculté des sciences de l'ingénieur,
- Boucherit, H. (2012). *étude theorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la methionine aminopeptidase de mycobacterium tuberculosis par diverses molecules*.
- Boudiaf, K. J. M. d. m. e. b., Université de Ferhat Abbas Sétif. (2006). *Etude des effets anti-xanthine oxydoréductase et anti-radicalaires des extraits des graines de Nigella sativa*.
- Brash, A. R., Boeglin, W. E., & Chang, M. S. J. P. o. t. N. A. o. S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygénase in humans. 94(12), 6148-6152.
- Bruneton, J. J. L., Paris. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3ème éd. 1120.
- Chawengsub, Y., Gauthier, K. M., Campbell, W. B. J. A. J. o. P.-H., & Physiology, C. (2009). Role of arachidonic acid lipoxygénase metabolites in the regulation of vascular tone. 297(2), H495-H507.
- Chikhi, A., Bensegueni, A. J. J. o. P., & Bioinformatics. (2008). Comparative study of the efficiency of three protein-ligand docking programs. 1, 161-165.
- Choi, H. J., Song, J. H., Park, K. S., & Kwon, D. H. J. E. J. o. P. S. (2009). Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. 37(3-4), 329-333.
- Conrad, D. J., Kuhn, H., Mulkins, M., Highland, E., & Sigal, E. J. P. o. t. N. A. o. S. (1992). Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygénase. 89(1), 217-221.
- Cransac, J.-C. (1992). *Activité sur les lipoxygénases de certaines molécules à cycle imidazole ou thiazole utilisées en parasitologie*.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G. J. B., & plants, m. b. o. (2000). Natural products (secondary metabolites). 24, 1250-1319.
- Dzoyem, J. P., Lannang, A. M., Fouotsa, H., Mbazoa, C. D., Nkengfack, A. E., Sewald, N., & Eloff, J. N. J. P. L. (2015). Anti-inflammatory activity of benzophenone and xanthone derivatives isolated from *Garcinia* (Clusiaceae) species. 14, 153-158.

- Dzoyem, J. P., Nkuete, A. H., Ngameni, B., & Eloff, J. N. (2017). Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from *Polygonum* and *Dorstenia* species. *J Archives of pharmacal research*, 40(10), 1129-1134.
- Emim, J. A. D. S., Oliveira, A. B., Lapa, A. J. J. o. p., & Pharmacology. (1994). Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. 46(2), 118-122.
- Fiorucci, S. (2006). *Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire*. Université de Nice Sophia-Antipolis (UNS),
- Funk, C. D., Furci, L., & FitzGerald, G. A. J. P. o. t. N. A. o. S. (1990). Molecular cloning, primary structure, and expression of the human platelet/erythrocyte cell 12-lipoxygenase. 87(15), 5638-5642.
- Gonzalez-Gallego, J., Sánchez-Campos, S., & Tunon, M. J. N. h. (2007). Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. 22(3), 287-293.
- Gupta, N., Nicholson, D. W., Ford-Hutchinson, A. W. J. C. j. o. p., & pharmacology. (1997). Pharmacological cross-reactivity between 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and leukotriene C4 synthase. 75(10-11), 1212-1219.
- Harborne, J. B. (2013). The flavonoids: advances in research since 1980.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. J. N. p. r. (2001). Anthocyanins and other flavonoids. 18(3), 310-333.
- Hodek, P., Trefil, P., & Stiborová, M. J. C.-b. i. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. 139(1), 1-21.
- Homaidan, F. R., Chakroun, I., Haidar, H., El-Sabban, M. E. J. C. P., & Science, P. (2002). Protein regulators of eicosanoid synthesis: role in inflammation. 3(4), 467-484.
- Horn, T., Kakularam, K. R., Anton, M., Richter, C., Reddanna, P., & Kuhn, H. J. R. b. (2013). Functional characterization of genetic enzyme variations in human lipoxygenases. 1(1), 566-577.
- Janakiram, N. B., Mohammed, A., Rao, C. V. J. C., & Reviews, M. (2011). Role of lipoxins, resolvins, and other bioactive lipids in colon and pancreatic cancer. 30(3), 507-523.
- Kuhn, H., Banthiya, S., Van Leyen, K. J. B. e. B. A.-M., & Lipids, C. B. o. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. 1851(4), 308-330.
- Lhuillier, A. (2007). *Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: Agauria salicifolia Hook. f ex Oliver, Agauria polyphylla Baker (Ericaceae), Tambourissa trichophylla Baker (Monimiaceae) et Embelia concinna Baker (Myrsinaceae)*.
- Marfak, A. J. U. d. L. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes: étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides.
- Martens, S., & Mithöfer, A. J. P. (2006). Corrigendum to "Flavones and flavone synthases"[*Phytochemistry* 66 (2005) 2399–2407]. 5(67), 521.
- Mehrabian, M., Allayee, H., Wong, J., Shih, W., Wang, X.-P., Shaposhnik, Z., . . . Lusis, A. J. J. C. r. (2002). Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. 91(2), 120-126.
- Middleton Jr, E., & Drzewiecki, G. J. B. p. (1984). Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. 33(21), 3333-3338.
- Milane, H. (2004). *La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques*. Université Louis Pasteur (Strasbourg)(1971-2008),

- Mookerjee, B., Lee, T., Logue, G., Lippes, H., Middleton, E. J. P. i. C., & Research, B. (1986). The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *213*, 511-520.
- Palmieri-Thiers, C. (2008). *Expression et caractérisation de la lipoxygénase recombinante d'olive: une enzyme présentant une double spécificité d'hydroperoxydation et exprimée dans les derniers stades de développement des fruits*. Université Pascal Paoli,
- Rådmark, O., Samuelsson, B. J. B., & communications, b. r. (2010). Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *396*(1), 105-110.
- Rai, S. P., Rai, K. K., Tripathi, D., & Singh, V. K. (2021). In-silico and in-vitro studies of Human 15-lipoxygenase B protein with bioactive phytochemicals having strong anti-inflammatory potential. *J Journal of Scientific Research*, *65*(1).
- Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N., . . . Yakoby, N. J. T. i. B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *20*(12), 522-531.
- Sadeghian, H., & Jabbari, A. J. E. o. o. t. p. (2016). 15-Lipoxygenase inhibitors: a patent review. *26*(1), 65-88.
- Sigal, E., Craik, C. S., Highland, E., Grunberger, D., Costello, L. L., Dixon, R. A., . . . communications, b. r. (1988). Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase. *157*(2), 457-464.
- Spedding, G., Ratty, A., & Middleton Jr, E. J. A. r. (1989). Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *12*(2), 99-110.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., . . . chemotherapy. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *49*(6), 2474-2478.
- Trouillas, P. (2009). *Chapitre 4-Modélisation Moléculaire et Biologie*. Thèse de doctorat en biophysique. Université de Lille. France. 2009. 17p,
- Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., & Węgrzyn, G. J. B. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *62*(2), 132-135.
- Vieth, M., Hirst, J. D., Kolinski, A., & Brooks III, C. L. J. J. o. C. C. (1998). Assessing energy functions for flexible docking. *19*(14), 1612-1622.
- Yamamoto, S. J. B. e. B. A.-L., & Metabolism, L. (1992). Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *1128*(2-3), 117-131.

Annexe

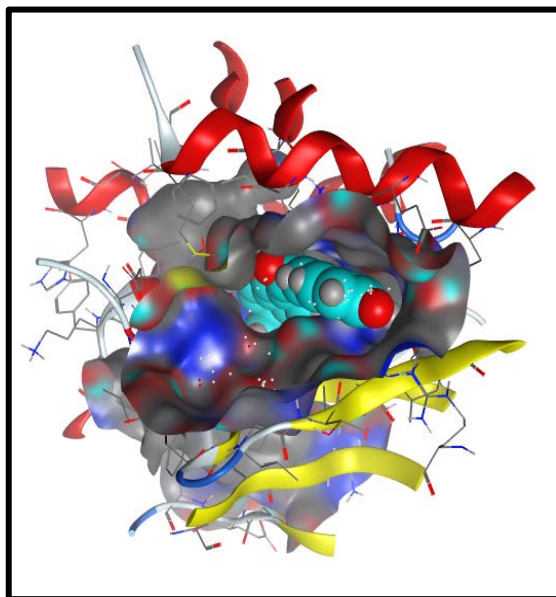
Annexe N°1

Tableau : Liste de 90 complexes utilisés pour tester le programme de docking avec le test RMSD.

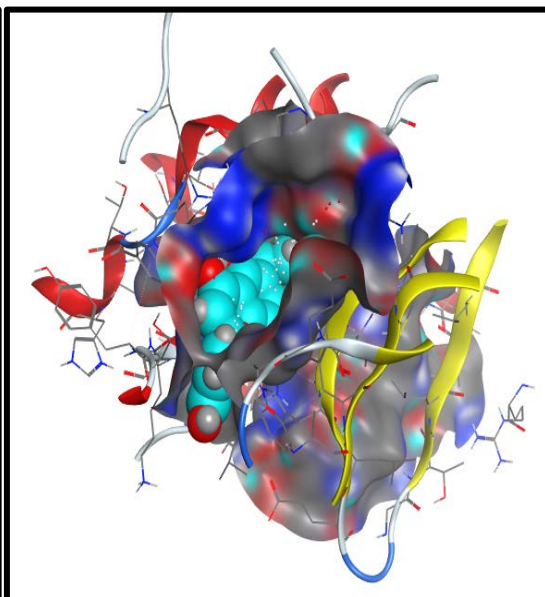
Molécules	RMSD	Energies (Kcal/mol)	Molécules	RMSD	Energies (Kcal/mol)
1	0,6185	-7,0480	10	1,4004	-6,1162
	1,7753	-6,9501		0,6996	-5,9804
	1,0046	-6,7826		1,3236	-5,8747
	1,2775	-6,5205		0,8814	-5,8450
	2,1889	-6,5033		0,8076	-5,6155
2	3,2293	-7,0697	11	0,8642	-6,0619
	1,2301	-6,7483		0,6094	-5,7845
	0,7190	-6,7145		1,1980	-5,6526
	1,5876	-6,6707		1,8522	-5,6516
	2,9126	-6,6520		1,0447	-5,6350
3	2,6132	-7,0768	12	1,9508	-10,1702
	3,0416	-6,9766		1,2904	-9,4980
	0,8824	-6,8998		1,5206	-9,4900
	2,9468	-6,8647		3,0699	-9,4156
	0,8678	-6,8583		1,2729	-8,8828
4	0,9752	-7,2474	13	1,6414	-8,5392
	1,4820	-7,2313		1,0015	-8,4341
	2,8191	-7,0661		2,2900	-8,4020
	1,1364	-6,9707		1,5177	-8,2505
	1,4518	-6,8778		0,9625	-8,1031
5	2,0465	-7,1994	14	1,3357	-8,3182
	2,1855	-6,9763		1,9920	-7,9737
	1,1236	-6,9462		3,4246	-7,8921
	1,3755	-6,9438		1,0897	-7,7054
	2,7001	-6,8784		2,0689	-7,5489
6	2,0471	-5,8844	15	1,4627	-9,5061
	3,4053	-5,8788		2,2521	-8,5458
	0,7157	-5,8300		2,7135	-8,1199
	2,9170	-5,8044		1,1945	-7,9452
	1,4828	-5,7829		1,3075	-7,7590
7	0,9478	-5,8828	16	1,8447	-8,8142
	1,2434	-5,7728		2,8811	-8,7946
	1,5277	-5,7564		1,6625	-8,5117
	1,4178	-5,7194		2,7005	-8,3839
	1,7361	-5,6939		2,0417	-7,8385
8	0,8739	-6,4474	Indométacine	1,6196	-7,9793
	1,1185	-6,3873		1,2963	-7,8571
	2,0770	-6,3711		2,2892	-7,5913
	1,0204	-6,2868		1,6357	-7,3955
	1,7550	-6,2268		0,9229	-7,3564
9	2,1422	-6,5707	Quercetine	1,3816	-6,4399
	1,1660	-6,3962		1,0309	-6,1725
	1,0831	-6,3947		1,0620	-6,1668
	1,9053	-6,3637		2,0268	-6,1261
	0,8652	-6,3557		0,9203	-6,1234

Annexe N°2

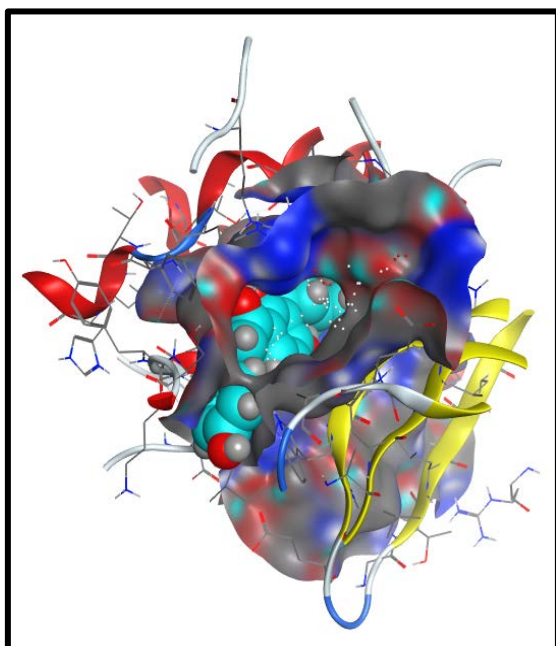
Figures : Les meilleures positions obtenues par le programme MOE en 3D.



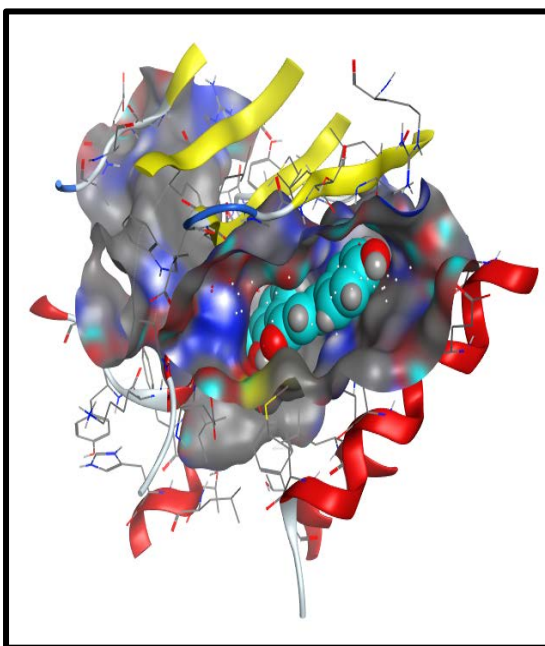
Mol 11



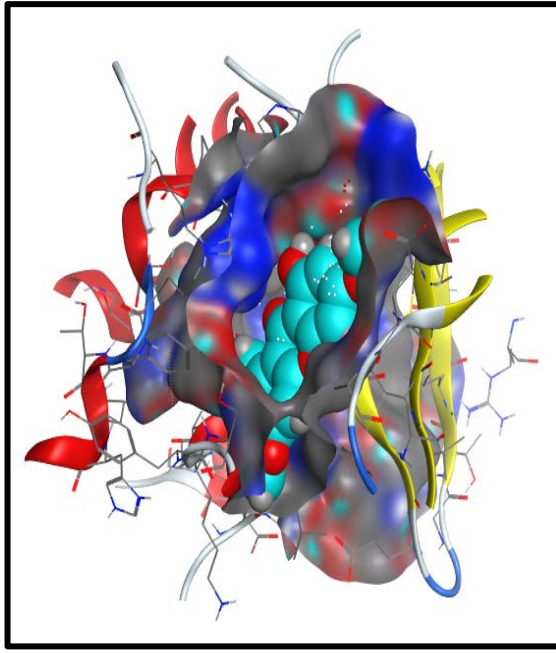
Mol 19



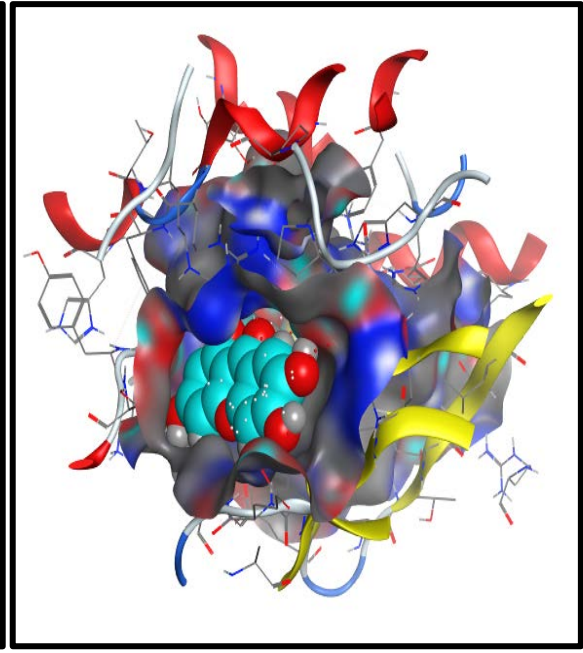
Mol 23



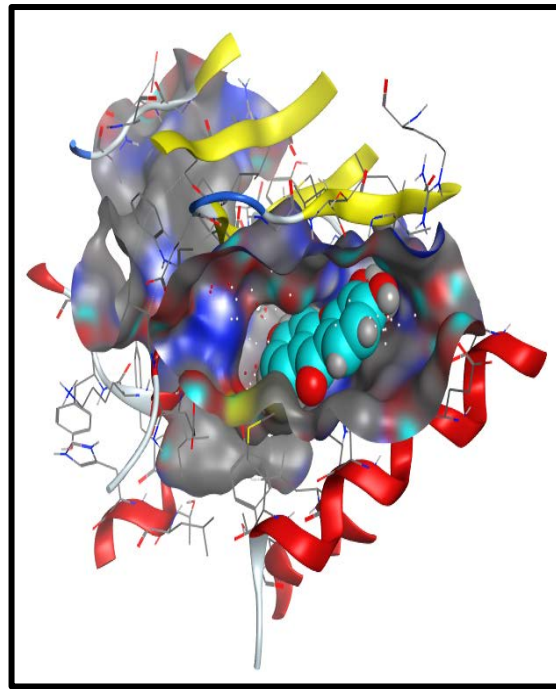
Mol 24



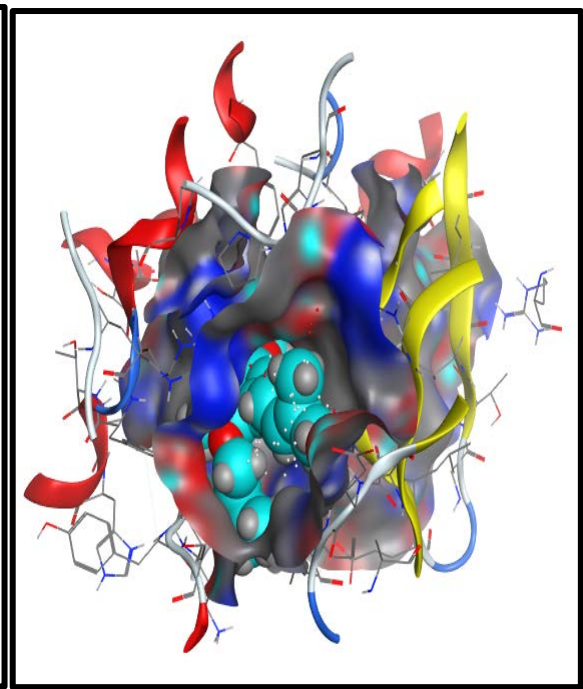
Mol 45



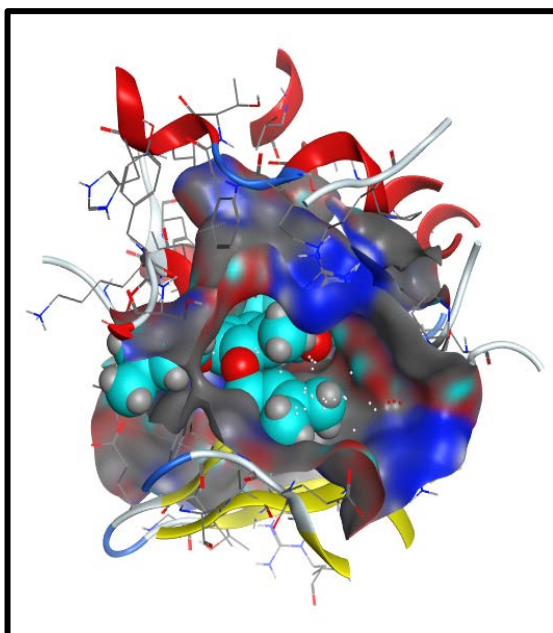
Mol 49



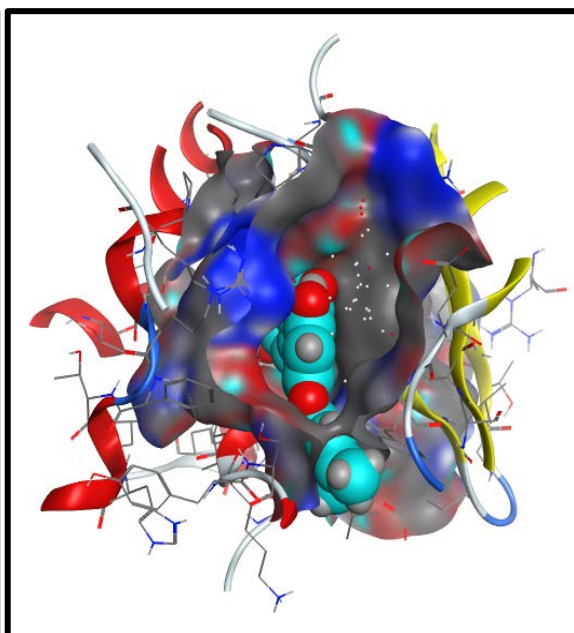
Mol 55



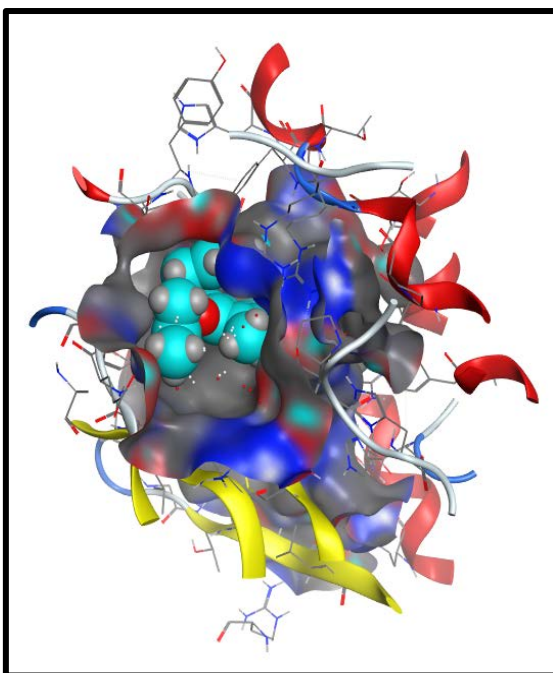
Mol 56



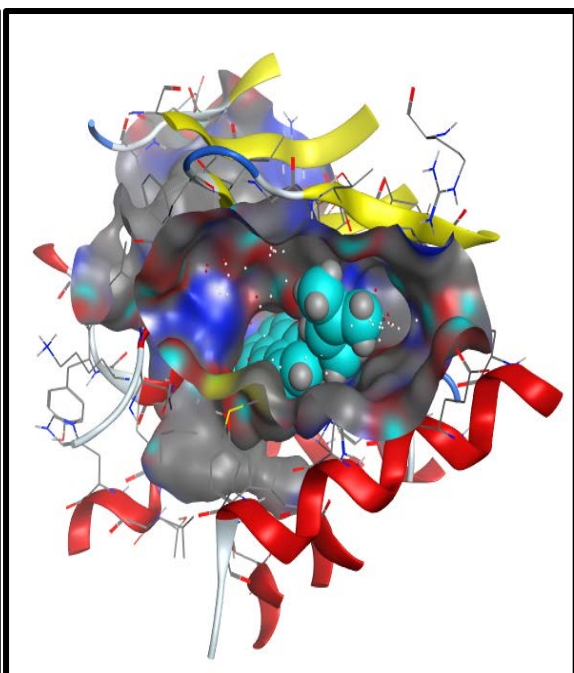
Mol 57



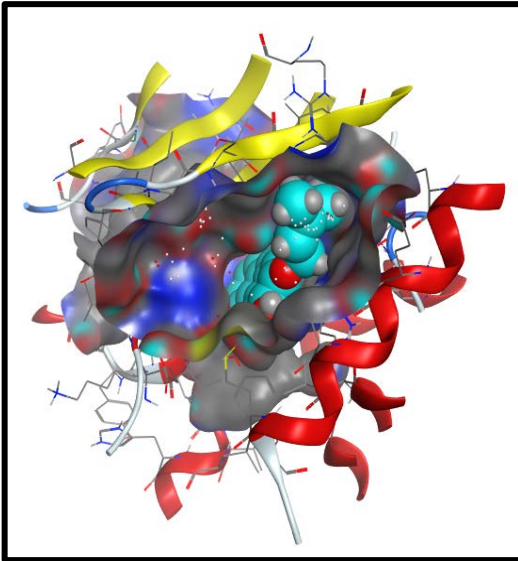
Mol 59



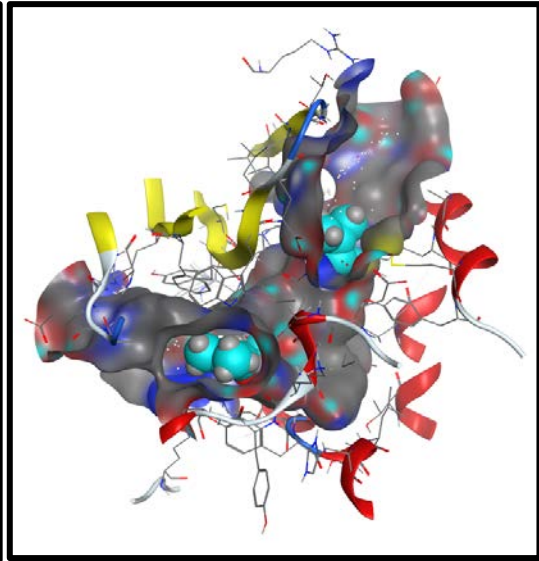
Mol 60



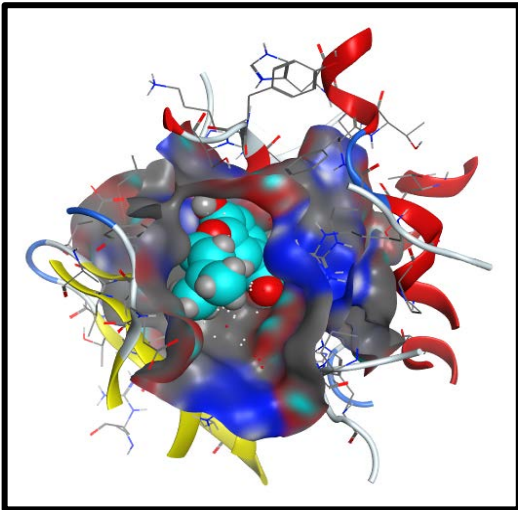
Mol 61



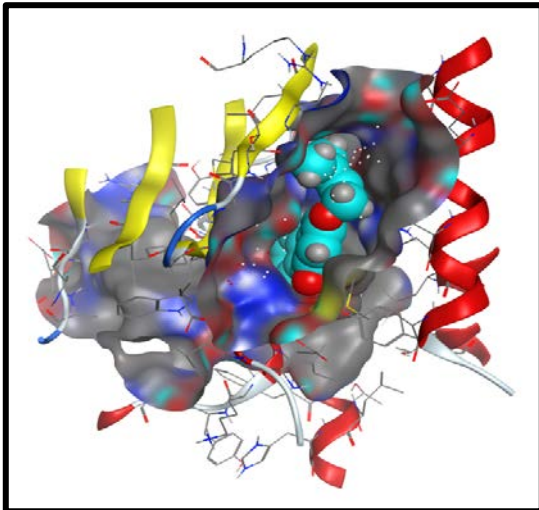
Mol 62



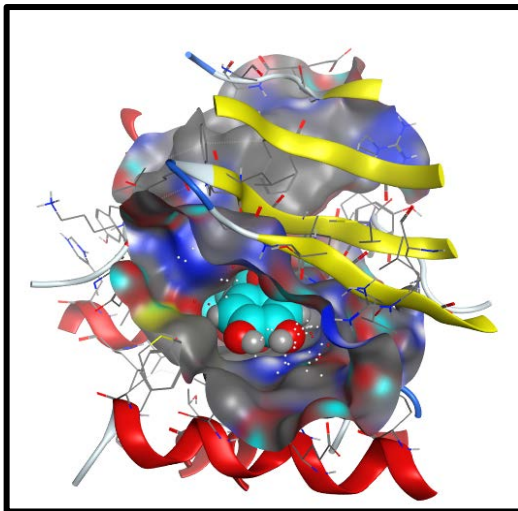
Mol 63



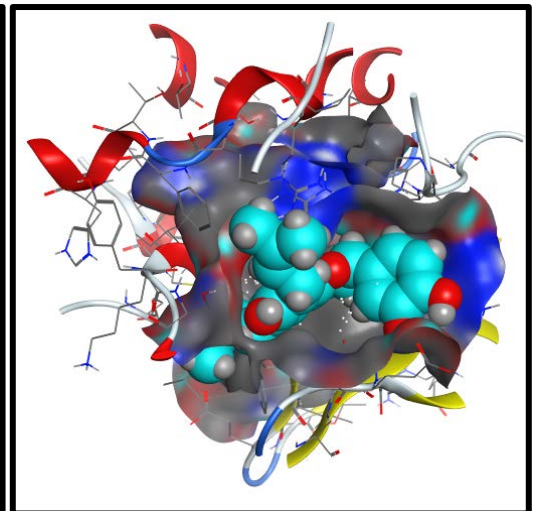
Mol 64



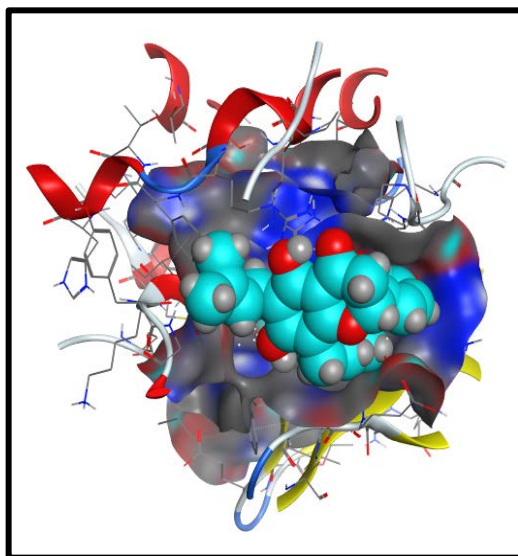
Mol 65



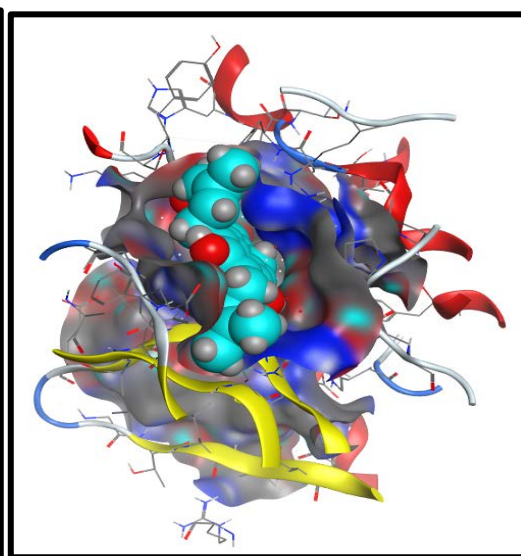
Mol 67



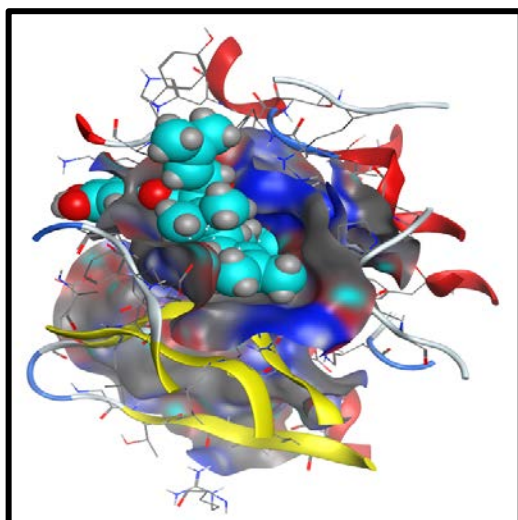
Mol 68



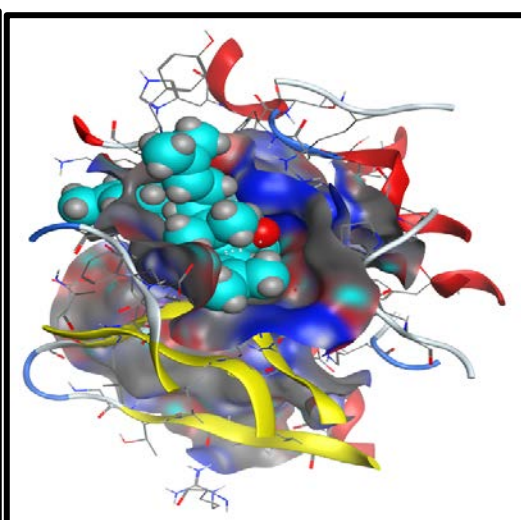
Mol 69



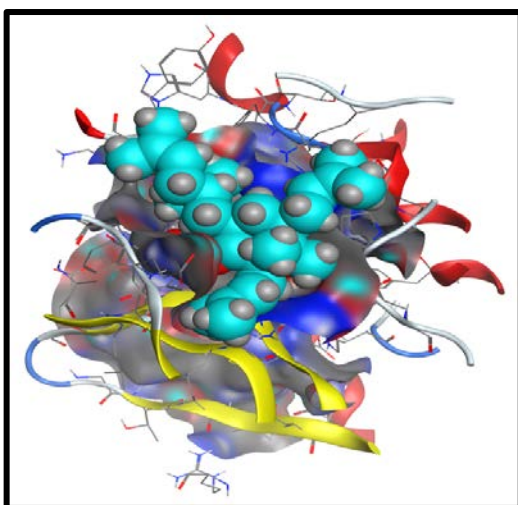
Mol 70



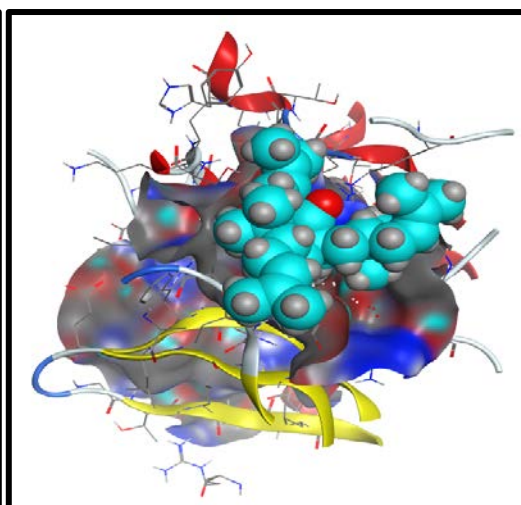
Mol 71



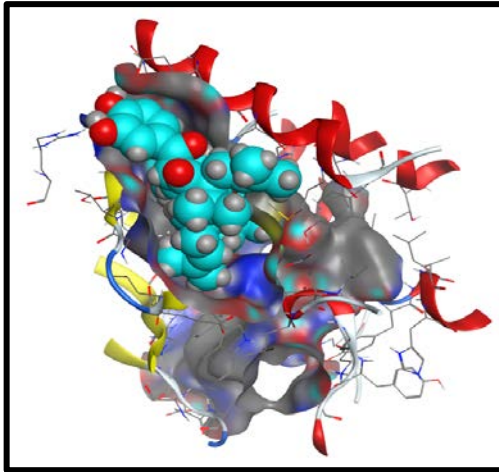
Mol 72



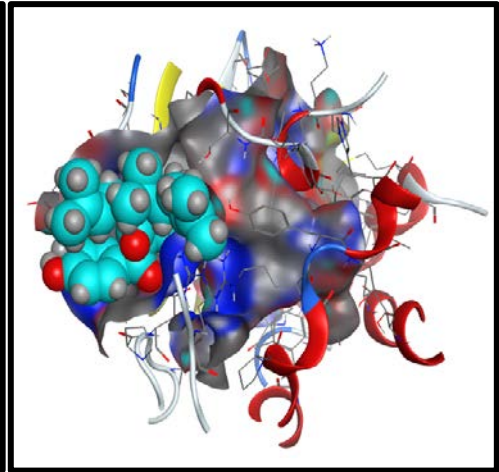
Mol 73



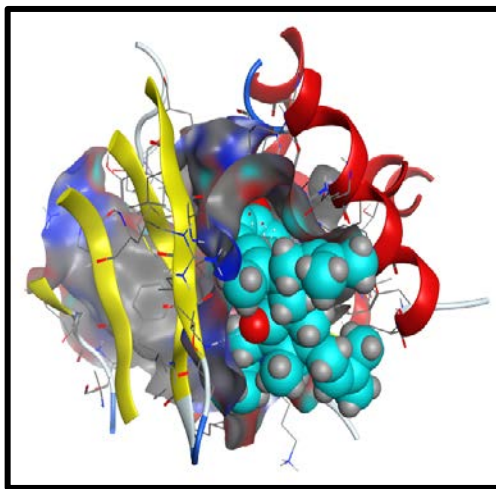
Mol 74



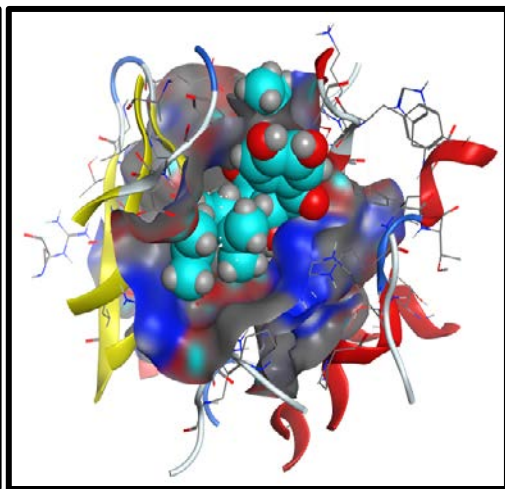
Mol 75



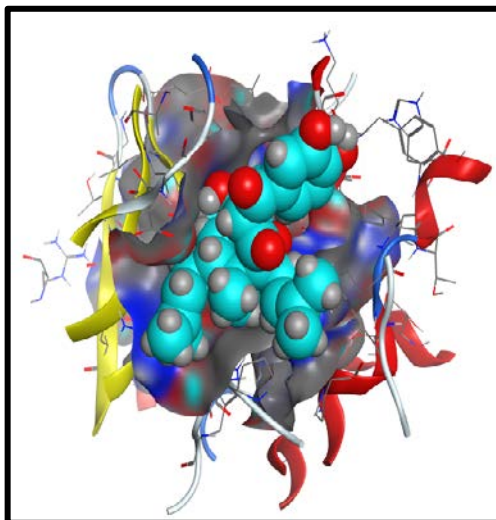
Mol 76



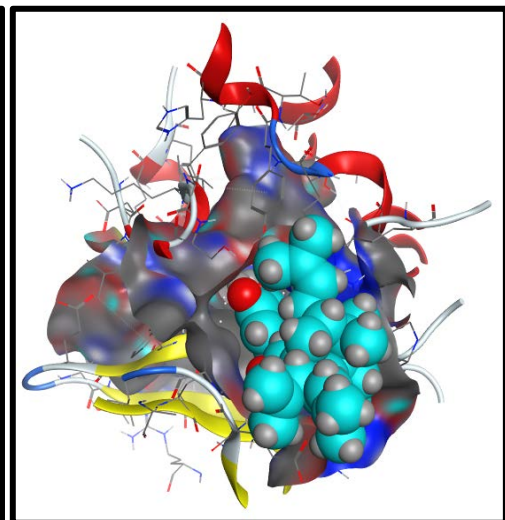
Mol 77



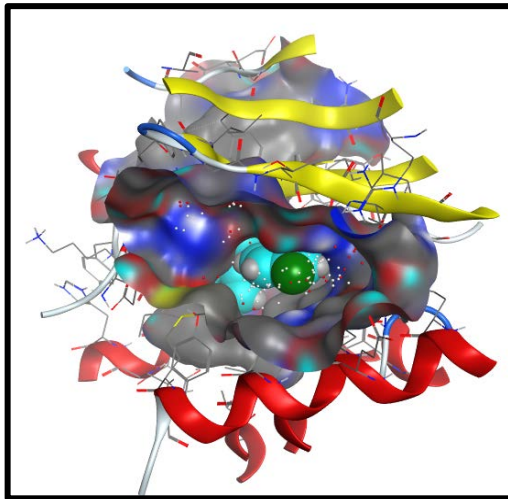
Mol 78



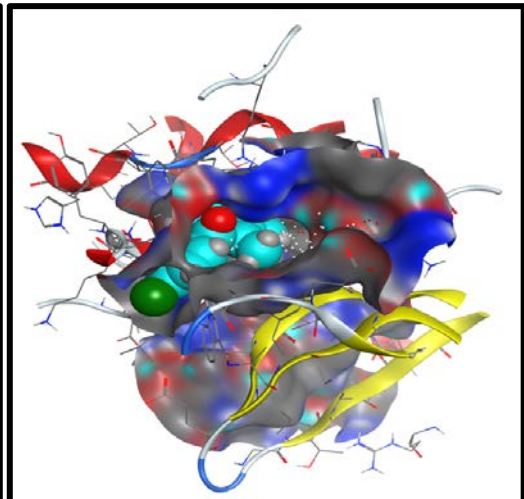
Mol 79



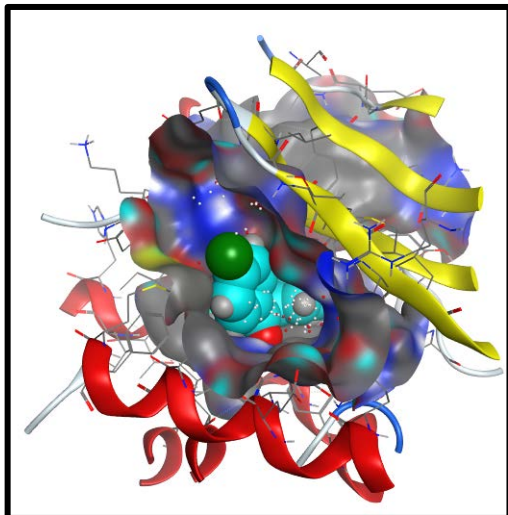
Mol 80



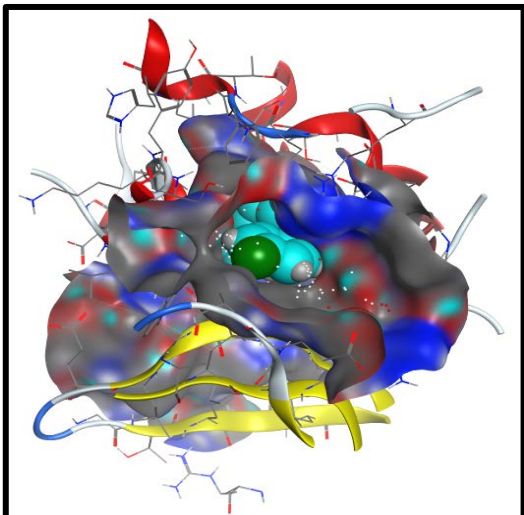
Mol 81



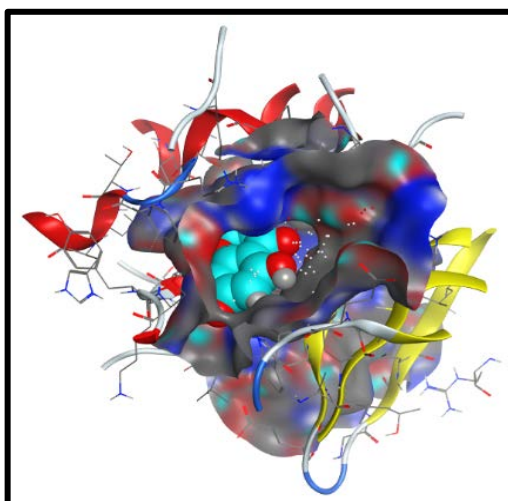
Mol 83



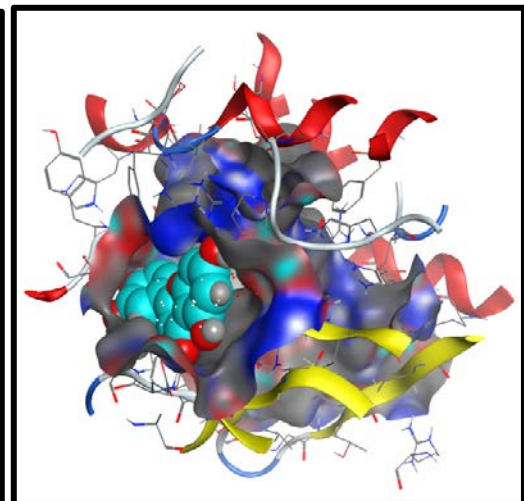
Mol 84



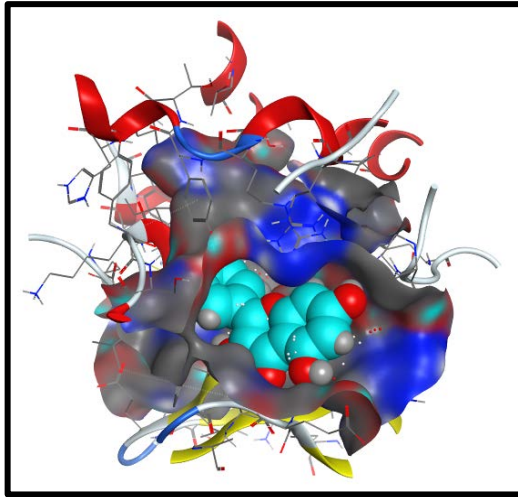
Mol 85



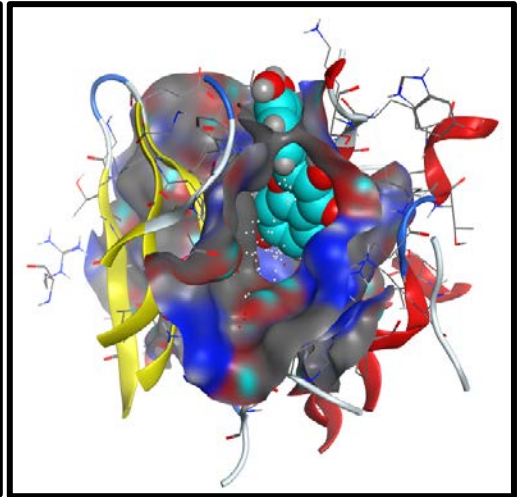
Mol 87



Mol 88



Mol 89



Mol 90

Résumé

عنوان المذكرة : دراسة مناهج الالتحام الجزيئي للنشاط التثبيطي لانزيم أيبوأكسيجيناز على بعض مركبات الفلافونويد.

المؤطر : د. سيفي إبراهيم

الاسم : خولة

اللقب : بن هني

الاسم : أميرة

اللقب : بن سالم

ملخص

تُظهر المواد البيولوجية الطبيعية مثل مركبات الفلافونويد الموجودة في النباتات الطبية مجموعة واسعة من الخصائص الدوائية التي تمتلك أيضاً نشاطاً مثبطاً لأنزيم الأيبوأكسيجيناز. الهدف من هذا العمل هو دراسة مناهج الالتحام الجزيئي للنشاط التثبيطي لأنزيم الأيبوأكسيجيناز وتأكيدها في المختبر التي أجريت بالفعل على بعض مركبات الفلافونويد. يعتبر أنزيم 15 أيبوأكسيجيناز إنزيمًا متورطاً في التسبب في العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان، بما في ذلك الصدفية، تصلب الشرايين، الزهايمر والسرطان. في هذه الدراسة، حاولنا تقييم النشاط المثبط لـ 18 جزيء (الفلافونويد) مقابل أنزيم 15 أيبوأكسيجيناز لبنية الإنسان، خضعت هذه الجزيئات لدراسات الالتحام الجزيئي لتحليل قدرتها التثبيطية ضد البروتين، والتي تمت مقارنتها بالكيرسيتين، وهو مثبط معروف لأنزيم الأيبوأكسيجيناز يستخدم كمعيار. تم إجراء دراسات الإرساء باستخدام خادم بيئة التشغيل الجزيئية. تبين أن جميع المركبات تتفاعل مع البروتين.

أفضل تفاعل بناءً على درجات الالتحام وقيم طاقة التلامس الذري. تم العثور على نتائج اختبار تثبيط أنزيم 15 لبيوكسيجيناز في الالتحام الجزيئي، الذي تم إجراؤه على المصادر النباتية لهذه الفلافونيدات، لتكون مماثلة لتلك الموجودة في دراسات المختبر، مما يشير إلى أن هذه المركبات قد تثبت فعاليتها في تثبيط هذا الانزيم وبالتالي يمكن استخدامها كمثبطات قوية في صياغة الأدوية للاضطرابات الالتهابية .

الكلمات المفتاحية : الفلافونويد, مالونيل-كوا, أنزيم الأيبوأكسيجيناز, حمض الأراكيدونيك , الالتحام الجزيئي , اختبار . RMSD

Titre du mémoire : Etude in silico de l'activité inhibitrice de la lipoxygénase par certains flavonoïdes.

Etudiantes : **BENHENNI Khaoula & BENSALEM Amira**

Encadrant : Dr. *SIFI Ibrahim*

Résumé :

Les produits biologiques naturels tels que les flavonoïdes trouvés dans les plantes médicinales présentent un large éventail de propriétés pharmacologiques qui possèdent également une activité inhibitrice de la LOX. Le but de ce travail est l'étude *in-silico* de l'activité inhibitrice de la LOX et de confirmer l'étude *in-vitro* déjà réalisée par certains flavonoïdes. L'enzyme 15-LOX impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines, notamment le psoriasis, l'athérosclérose, la démence d'Alzheimer et le cancer. Dans la présente étude, nous avons tenté d'évaluer l'activité inhibitrice de 18 molécules (flavonoïdes) contre la structure d'Homo sapiens de la 15-LOX. Ces derniers ont été soumis à des études d'amarrage moléculaire pour analysant leur potentiel inhibiteur vis-à-vis de la protéine, qui a été comparée à la quercétine, un inhibiteur connu de LOX, utilisé comme standard. Des études d'amarrage ont été réalisées à l'aide du serveur MOE. Il a été démontré que tous les composés interagissent avec la protéine, cependant mol4 amontré la meilleure interaction basée sur les scores d'amarrage et les valeurs d'énergie de contact atomique. Les résultats du test d'inhibition in vitro de LOX, effectué sur des sources végétales de ces flavonoïdes, se sont révélés similaires à ceux des études d'amarrage *in-silico*, suggérant que ces composés pourraient s'avérer efficaces pour inhiber LOX et peuvent donc être utilisés comme inhibiteurs puissants dans la formulation de médicaments contre les troubles inflammatoires.

Mots clés : flavonoïdes, malonyl CoA, lipoxygénase, acide arachidonique, l'amarrage moléculaire, test RMSD.

Memory title : In silico study of the lipoxygenase inhibitory activity by certain flavonoids

Name : **BENHENNI**
Name : **BENSALEM**

First name : **Khaoula** Directed by : Dr. *SIFI Ibrahim*
First name : **Amira**

Abstract

Natural biologics such as flavonoids found in medicinal plants exhibit a wide range of pharmacological properties that also possess LOX inhibitory activity. The aim of this work is the *in-silico* study of the inhibitory activity of LOX and to confirm the *in-vitro* study which has already been carried out by certain flavonoids. 15-LOX enzyme implicated in the pathogenesis of many human diseases, including psoriasis, atherosclerosis, Alzheimer's dementia and cancer. In the present study, we attempted to evaluate the inhibitory activity of 18 molecules (flavonoids) against the structure of Homo sapiens 15-LOX. The latter were subjected to molecular docking studies to analyze their inhibitory potential against the protein, which was compared to quercetin, a known LOX inhibitor, used as a standard. Docking studies were performed using the MOE server. All compounds were shown to interact with protein, however, mol4 showed the best interaction based on docking scores and values of atomic contact energy. The results of the *in vitro* LOX inhibition test, performed on plant sources of these flavonoids, were found to be similar to those of *in-silico* docking studies, suggesting that these compounds may prove effective in inhibiting LOX and therefore may be used as potent inhibitors in the formulation of drugs for inflammatory disorders.

Key words : flavonoids, malonyl CoA, lipoxygenase, arachidonic acid, docking, RMSD test.