Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Matière

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine des Sciences de la Matière
Filière de Chimie
Spécialité Chimie Pharmaceutique

Réf. : Entrez la référence du document

Présenté et soutenu par :
ROUABEH AMRA INES **YAGOUB OUM HANI**

Le : 24-Jun -2021

Modélisation moléculaire pour la découverte de nouveaux inhibiteurs de caspase-3.

Jury :

Dr	MEKLID Abdelhak	MCA	Université Mohamed Khider de Biskra	Président
Dr	OUASSAF Mebarka	MCA	Université Mohamed Khider de Biskra	Rapporteuse
Dr	KENOUCHE Samir	MCA	Université Mohamed Khider de Biskra	Examinatrice

Année universitaire : 2020/2021.

Remerciement

Tout d'aborde, nous tenons à remercier Dieu Tout-Puissant qui nous a donné la force de faire ce travail.

Nous remercions chaleureusement notre encadreur **Dr Mebarka Ouassaf,** pour nous avoir donné l'opportunité de terminer ce mémoire de master en guidant et l'encourageant tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous sincères remerciements aux membres du jury **Dr Meklid Abdelhak** et **Dr Kenouche Samir** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Enfin, nous remercions tous ceux qui nous ont aidé de prés ou de loin à faire de ce travail un succès.

Dédicace

Je dédie ce mémoire a :

A mes chers parents qui ont toujours été la pour moi et qui m'ont donné un merveilleux exemple de travail acharné et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma gratitude et tout mon amour.

A mes chers frères Badr Eddine, Mohamed, Zarzour, Imad, Seyf Eddine.

A l'âme pure de ma tante, que dieu lui fasse miséricorde.

A mon oncle, sa femme et ses enfants Mohamed AlTaher, Ghazali, Anis.

A ma famille élargie : mes oncles tantes et oncles.

A mes amis les plus chers Amina Ferdous, Asma, Mayada, Salima, Khadija, Nour Al Huda, Moufida.

Sans oublier ma chère compagne Rouabeh Amra Ines pour son soutien moral, sa patience et de compréhension tout au long de ce travail.

OUM HANI YAGOUB

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

- Ma mère, la perle rare, la flamme de ma vie pour sa tendresse infinie et ses sacrifices.

- Mon père, pour son amour, son soutien et ses en courage dans les moments les plus difficiles.

- A toute ma famille et toutes mes sœurs et mes Frères.

-A tous mes amis : Amina Ferdous , Zeneb, Mofida , Asma , Ikram, Sara,Naredjes .

- A mon cher binôme YAGOUB Oum Hani.

-A toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

ROUABEH Amra Ines.

Sommaire

Sommaire

Liste des Figures …….....i

Liste des Tableaux.....ii

Liste des abréviations …….....….iii

Introduction générale 1

Références bibliographiques

Chapitre1 : Généralités sur les Caspase

1.1. Introduction 4

1.2. Nomenclature 4

1.3. Classification 4

1.4. Structure de caspase.....6

1.5. Substrats des caspase.....7

1.6. Rôles des caspases.....9

1.6.1. Dans l'apoptose 9

1.6.2. Dans d'autres processus 12

1.7. Régulation des caspases.....15

1.7. 1. IAPs 15

1.7. 2. FLIP 15

1.7. 3. La phosphorylation.....16

1.7. 4. Les calpaïnes 16

1.7. 5. CrmA et P35 et p49 16

1.8. caspase indépendante.....17

Références bibliographiques 18

Chapiter2 : Docking Moléculaire

2.1. Introduction 24

2.2. Le Docking Moléculaire.....24

2.3. Les outils du Docking moléculaire.....25

2.3.1. Ligand.....25

2.3.2. Récepteur 26

2.4. Les interactions Protéine-Ligand.....27
2.4.1. Les interactions électrostatiques 27
2.4.2. La liaison hydrogène 28
2.4.3. Les interactions de Van Der Walls 28
2.4.4. Les interactions hydrophobes 28
2.5. Processus de scoring.....29
2.5.1. Principe.....29
2.5.2. Description des fonctions de scoring utilisées 29
2.6. Protocole Générale de Docking 31
Références bibliographiques.....33

Chapitere3 : Applications, Résultats et Discussions

3.1. Introduction.....36
3.2. Matériel et outils utilisés.....36
3.2.1. Micro-ordinateur.....36
3.2.2. Logiciel utilisé 36
3.3. Le Protocole d'étude 38
3.3.1. Préparation de récepteur 39
3.3.2. Préparation des ligands.....40
3.3.3. Détection des cavités.....43
3.3.4. Etude de Docking moléculaire.....45
3.4. Résultats 45
3.4. 1. Etude des interactions enzyme-ligand de référence.....47
3.4. 2. Etude des interactions enzyme-ligand.....48
3.5. Discussion.....55
Références bibliographiques.....58

Conclusion Générale

Résumé
Abstract

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES :

CHAPITRE 1 :

Figure1.1. Représentation des différents groupes des Caspases humaines.....5

Figure 1.2. Structure tridimensionnelle de la Caspase-3 humaine active.....6

Figure 1.3. Les IAP chez les mammifères.....15

CHAPITRE 2 :

Figure 2.1 : Stimulation du Docking et Scoring.....25

Figure 2.2 : Modèle clé-serrure pour modéliser la formation d'un complexe RL (d'un Ligand et d'un récepteur) 27

Figure 2.3 : Interactions électrostatiques.....27

Figure 2.4 : liaison hydrogène..... 28

Figure 2.5 : Interactions de Van Der Walls.....28

Figure 2.6 : Interaction Hydrophobe.....29

Figure 2.7 : Protocole général de Docking.....32

CHAPITRE 3 :

Figure 3.1 : Interface du site protein Data Bank (PDB).....37

Figure 3.2 : Interface du logiciel ChemDraw.....37

Figure 3.3 : Interface du logiciel MOE.....38

Figure 3.4 : Protocole d'étude.....39

Figure 3.5 : Structure de l'enzyme 3H0E (www.rcsb.org/pdb).....40

Figure3.6 : Les données cristallographiques de l'enzyme.....40

Figure 3.7 : Cavité de l'enzyme 3H0E.....44

Figure 3.8 : Structure chimique de ligand référence.....45

Figure 3.9 : Interactions entre Lréf 3H0E etlesrésidusdusiteactifde3H0E.....47

Figure 3.10 : Interactions entre le ligand 50etles résidus de site actif de 3H0E.....49

Figure3.11 : Interactions entre le ligand 49 et les résidus de site actif de 3H0E.....50

Figure 3.12 : Interactions entre le ligand 50 et les résidus de site actif de 3H0E.....51

Figure 3.13 : Interactions entre le ligand 47 et les résidus de site actif de 3H0E.....52

Figure3.14 : Interactions entre le ligand 42etlesrésidusdesiteactifde 3H0E.....53

Figure 3.15 : Interactions entre le ligand 25 et les résidus de site actif de 3H0E.....54

Figure 3.16 : Orientation des ligands dans le site active.....55

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX :

Chapitre 1 :

Tableau 1.1 : Caspases de mammifères.....4

Tableau 1.2 : Spécificités de substrat des caspases humaines.....8

Tableau 1.3 : Exemples de substrats clivés par les caspases au cours de l'apoptose. 8

Tableau 1.4 : Invalidation des gènes codant pour les caspases.....9

Tableau 1.5 : Les différentes fonctions des caspases indépendantes de l'apoptose.....13

Chapitre 3 :

Tableau 3.1 : Caractéristiques des ordinateurs utilisés.....36

Tableau3.2 : Structures chimiques des ligands.....41

Tableau 3.3 : Le volume des différentes cavités 43

Tableau 3.4 : présente les déférentes propriétés de la cavité N˚1.....45

Tableau3.5 : Résultats énergétiques de Docking moléculaire.....46

Tableau3.6 : Résultats des interactions entre les meilleurs ligands et les résidus de site actif de3H0E.....47

Tableau3.7 : Résultats de Docking moléculaire et analyse des interactions pour les composés identifiés 48

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADN : Acide Désoxy ribo Nucléique.

AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement

ARN: Acide Ribo Nucléique.

CAD/ICAD: Caspase Activated DNase / Inhibitor of Caspase Activated DNase

CARD: Caspase Activation Recruitment Domain

Caspase: Cystéinyl ASPartic specific proteASE

CED: Caenorhabditis Elegans Death

Crma: Cytokine response modifier A

DED: Death Effector Domain

FLIP: FLICE Inhibitory Protein

IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein

IL: InterLeukine

INF-γ: Interferon-γ

JNK: c-Jun N-terminal Kinase.

LPS: lipopolysaccharide.

MOE: Molecular Operating Environment.

NFκB : Nuclear Factor κB

PDB : Protein Data Bank (banque de donnée protéique).

PDBe : Protein Data Bank European (banque de donnée protéique European).

PDBj : Protein Data Bank Japan (banque de donnée protéique Japan).

RCSB PDB: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics.

RL : Récepteur-Ligand

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

TNF: tumor necrosis factor

3D: Trois dimensions.

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, joue un rôle essentiel dans tous les organismes multicellulaires. Cependant, la dérégulation du processus apoptotique peut contribuer à de nombreuses maladies humaines, notamment des maladies neurodégénératives, des lésions ischémiques, des troubles auto-immuns et plusieurs formes de cancer**(1).**

Les aspartyl protéases dépendantes de la cystéine (caspases) ont été impliquées dans la cascade de transduction du signal conduisantà l'apoptose**(2).**

La famille des caspases est une cible intensément étudiée dans la conception de médicaments depuis de nombreuses années **(3).**

À ce jour, 14 caspases de mammifères ont été identifiées, parmi lesquelles les caspases -2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10, qui ont été décrites comme des caspases apoptotiques. Fait intéressant, la caspase-3 s'est avérée généralement plus promiscuité que les caspase-7, 8 et 9 et a révélé la principale caspase du bourreau pendant la phase de démolition de l'apoptose De plus, la caspase-3 joue un rôle clé de bourreau et son inhibition peut empêcher considérablement l'apoptose in vitro et in vivo **(4, 5).**

De nombreux composés tels que les isatines **(6),** les peptidealdéhydes **(7)** et les homophthalimides**(8)**benzisothiazole**(9)**ont été décrits comme des inhibiteurs de caspases en raison de la présence de carbonyles déficients en électrons qui interagissent avec le site cible et présentent des réponses inhibitrices.

La Chemoinformatique est un nouveau domaine apparu il y a quelques années. Il concerne le développement, la création, l'organisation, le stockage, la diffusion, l'analyse, la visualisation et l'utilisation de l'information chimique, elle représente un domaine en évolution rapide. Actuellement, les méthodes spécifiques de la chemoinformatique indispensables pour le développement de nouveaux composés, matériaux et processus, C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "Amarrage" ou "Docking" moléculaire ont été développées. Tel que, le Docking moléculaire permet de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand.

Le programme de Docking est utilisé pour placer des représentations générées par ordinateur d'une petite molécule appelé "Ligand" dans une structure cible représentée le plus souvent par une protéine **(10).**

L'objectif de notre travail est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la caspase 3 en faisant appel aux approches de modélisation des interactions enzyme-

inhibiteur par Docking moléculaire, Ces méthodes permettent de rechercher in silicole mode d'interactionplus favorable d'un ligand au sein de son récepteur (cible thérapeutique) ce qui aide à la prédiction de molécules en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser celles-ci.

Notre travail est divisé en trois chapitres :

Le premier chapitre présente un aperçu général sur le Caspase.

Le deuxième chapitre expose quelques notions fondamentales sur le Docking moléculaire.

Le troisième chapitre est consacré à la méthodologie du travail réalisé dans cette mémoire, aux résultats obtenus et à leurs discussions.

Enfin, une conclusion générale résume l'ensemble du travail réalisé.

Références Bibliographique :

(1) Howley , B; Fearnhead, H. O. J. Cell. Mol. Med. 2008, 12, 1502.

(2) Denault, J. B.; Salvesen, G. S. Chem. Rev. 2002, 102, 4489.

(3) Wang, C.-C.; Li, H.; Zhang, M.; Li, X.-L.; Yue, L.-T.; Zhang, P.; Zhao, Y.; Wang, Duan, R.-N.; Li, Y.-B. Caspase-1 inhibitor ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by innate dendric cell IL-1-IL-17 pathway. J. Neuroinflammation 2015, 12, 118.

(4) Slee, E.A.; Adrain, C.; Martin, S.J. Executioner caspase-3,-6, and-7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. J. Biol. Chem. 2001, 276, 7320–7326.

(5) Walsh, J.G.; Cullen, S.P.; Sheridan, C.; Lüthi, A.U.; Gerner, C.; Martin, S.J. Executioner caspase-3 and caspase-7are functionally distinct proteases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008, 105, 12815–12819.

(6) S. E. Webber, J. Tikhe, S. T. Worland et al., "Design, synthesis, and evaluation of nonpeptidic inhibitors of human rhinovirus 3C protease," Journal ofMedicinal Chemistry, vol. 39, no. 26, pp.5072–5082, 1996.

(7) S. E. Webber, K. Okano, T. L. Little et al., "Tripeptide aldehyde inhibitors of human rhinovirus 3C protease: design, synthesis,biological evaluation, and cocrystal structure solution of P1 glutamine isosteric replacements," Journal of Medicinal Chemistry,vol. 41, no. 15, pp. 2786–2805, 1998.

(8) Q.M.Wang, R. B. Johnson, L. N. Jungheim, J. D. Cohen, andE. C. Villarreal, "Dual inhibition of human rhinovirus 2A and 3C proteases by homophthalimides," Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 42, no. 4, pp. 916–920, 1998.

(9) Liu, D.; Tian, Z.; Yan, Z.; Wu, L.; Ma, Y.; Wang, Q.; Liu, W.; Zhou, H.; Yang, C. Design, Synthesis and Evaluation of 1,2-Benzisothiazol-3-One Derivatives as Potent Caspase-3 Inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2013, 21 (11), 2960–2967.

(10) Romano T Kroemer. Structure-based drug design: docking and scoring. Currentprotein and peptide science, 8(4):312–328, 2007.

Chapitre1 : Généralités sur les Caspase

1.1. Introduction :

Les caspases sont des cystéines protéases qui clivent spécifiquement leurs substrats après un motif tétra peptidique se terminant par un aspartate (D) **(1).** Les caspases sont exprimées sous forme de pro-enzymes inactives qui contiennent trois domaines séparés par des résidus aspartates, sites de clivage potentiel par les caspases elles-mêmes. Les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7), sont appelées ainsi car elles participent activement à la destruction de la cellule apoptotique en clivant spécifiquement différents substrats cytosoliques et nucléaires. Plus de 100 protéines substrats des caspases effectrices ont été décrites lors de l'apoptose **(2).**

1.2. Nomenclature :

La mort par apoptose est essentiellement due à l'activation d'une famille de protéases spécifiques, les caspases (Cystéine aspartate protéase), qui possèdent une cystéine sur leur site catalytique (QACxG = Glutamine-Alanine-Cystéine-x-Glycine, avec x = Q, G ou R (Arginine) selon les caspases) **(3)** et clivent leurs substrats protéiques après un résidu acide aspartique. Elles sont présentes constitutivement dans la cellule ct sont hautement conservées à travers les espèces **(4)**. La première caspase a été mise en évidence chez les mammifères grâce à son homologie avec la protéine pro-apoptotique ced-3 du nématode Caenorhabditiselegans**(5)**.

Subfamily	Mammals
CARD containing caspase (initiator caspase)	Caspase-1, Caspase-2, Caspase-4, Caspase-5, Caspase-9, Caspase-11, Caspase-12
DED containing caspase (initiator caspase)	Caspase-8, Caspase-10
Short prodomain caspase (executioner caspase)	Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7
Others	Caspase-14

Tableau 1. 1.-Caspases de mammifères.

1.3. Classification :

A ce jour, la famille des caspases comporte 14 membres chez les mammifères. Parmi celles-ci, les caspases-1 à -10 ainsi que la caspase-14 ont été mises en évidence chez l'homme. Les caspases-11 et -12 sont des homologues des caspases-4 et -5 chez la souris et

la caspase-13 est un homologue bovin de la caspase-4 **(6, 7)**. Cependant, il existe chez l'homme une « pseudo-caspase-12 » non fonctionnelle exprimée par un gène portant plusieurs mutations ponctuelles **(8)**. Les caspases peuvent être subdivisées en trois grands groupes selon leur fonction biologique (**Figure 1.1**). Le premier groupe comprend les caspases-1, -4 et -5 qui contrôlent les réponses inflammatoires et ne jouent pas de rôle important dans l'apoptose. La caspase-14 intervient dans la différenciation terminale de l'épiderme **(9)**. Les deux autres groupes sont constitués des caspases impliquées dans l'apoptose, avec d'une part les caspases initiatrices (caspases-2, -9, -8 et -10), qui sont activées suite à des signaux extra- ou intracellulaires et d'autre part les caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7), qui sont activées par les caspases initiatrices. Ainsi, les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices.

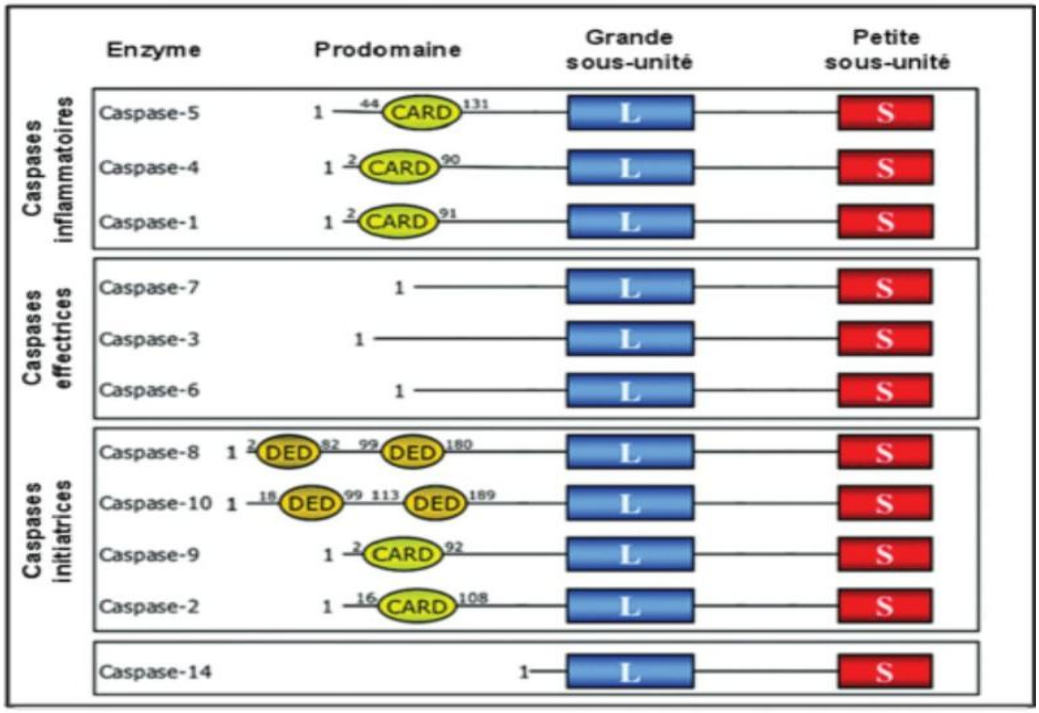


Figure1.1-Représentation des différents groupes des caspases humaines.

Les caspases de 1 à 10 ont été classées en trois groupes selon la distinction physiologique entre les caspases inflammatoires, initiatrices et effectrices. La caspase-14 est une caspase « non apoptotique ». Les domaines protéiques ont été représentés, à savoir la petite sous-unité (S) en rouge, la grande sous-unité (L) en bleu, le domaine CARD en jaune clair et le domaine DED en jaune foncé. **(10)**.

1.4. Structure des caspases :

Les caspases sont synthétisées sous la forme de pro-caspases (zymogènes). Toutes les pro-caspases contiennent un pro-domaine N-terminal de taille et de séquence variables qui semble avoir un rôle dans les interactions protéines/ protéines, une grande sous-unité (20 kDa) portant le site catalytique et une petite sous-unité (10 kDa) sur la partie C-terminale **(11)**. Ces deux sous-unités s'associent pour former un hétéro dimère et deux hétéro dimères s'associent pour former un tétramère, qui est la forme active des caspases**(12).**

Chaque grande sous-unité p20 contient un site catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine (C) inclus dans une séquence peptidique de type QACxG (où x est une arginine (R), une glutamine (Q) ou une glycine (G)). Ce site est spécifique des membres de la famille des caspases qui leur confère leur activité enzymatique **(13).**

Figure 1.2-Structure tridimensionnelle de la Caspase-3 humaine active.

La Caspase-3 active est un tétramère composé de deux hétéro dimères p20/p10 (un en Bleu et rouge, l'autre en vert et rose). Chaque hétéro dimère est constitué des deux sous-unités p20 (en bleu et en vert) et p10 (en rouge et rose).

Les Caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10) constituent le premier relai du signal apoptotique. Elles sont caractérisées par un pro-domaine long incluant des motifs spécifiques permettant leur recrutement et leur concentration au niveau de complexes multi-protéiques spécifiques, nécessaire à leur activation. Deux types de domaines existent : le domaine DED (DeathEffector Domain), exprimés en tandem par les Caspases-8 et -10 et le domaine CARD (CAspaseRecrutment Domain) présent au sein des Caspases-2 et -9.

Les Caspases effectrices (3, 6 et 7), contrairement aux Caspases initiatrices, possèdent un pro-domaine court et sont dépourvus des motifs DED et CARD**(14)**. Elles peuvent, une fois activées par les Caspases initiatrices, former une boucle d'amplification en activant d'autres Caspases initiatrices. Ainsi, la Caspase-3 est capable de cliver les Caspase-2, -6, -8 et -9 **(15).**

De nouvelles subdivisions des Caspases sont faites selon la taille de leur prodomaine et leurs fonctions. Selon ces caractéristiques, les Caspases des mammifères sont classées en 3 groupes:

a) Les Caspases avec un grand prodomaine (Caspases-1, -4, -5, -12, -13 et -14) qui jouent un rôle dans la maturation des cytokines et la réponse inflammatoire sont appelés Caspases inflammatoires ou Caspases du groupe-I **(16).**

b) Le deuxième groupe comprend les Caspases possédant un long prodomaine (supérieur à 90 acides aminés) avec soit un domaine DED (Caspases -8 et -10), soit un domaine CARD (Caspases -2 et -9) et sont appelées Caspases initiatrices ou Caspases du groupe-II.

c) Les Caspases qui ont un prodomaine court (20-30 acides aminés) sont appelées les Caspasesexécutrices (Caspases-3, -6 et -7) ou Caspases du groupe-III (**17, 18).**

1.5. Substrat des Caspases :

Une fois activées, les Caspases sont capables de cliver un grand nombre de substrats cellulaires. Alors que toutes les Caspases possèdent une spécificité stricte de clivage de leur substrat, après un résidu d'acide aspartique (P1), certaines vont avoir d'autres spécificités de clivage **(19).**

- Groupe I, qui inclut les Caspases-1, -4 et -5, reconnaissant une séquence consensus optimale WEHD, 1
- Groupe II, constitué des Caspases-2, -3 et -7, reconnaissant une séquence optimale DEXD (où X est un acide aminé quelconque),
- Groupe III, constitué des Caspases-6, -8, -9 et -10, possèdant une préférence pour le site (I/V/L) EXD (où X est un acide aminé quelconque).

Le clivage par les Caspases n'entraine donc pas la dégradation de l'ensemble des protéines cellulaires **(20).**

Tableau 1.2- Spécificités de substrat des Caspases humaines.

Groupe	Enzyme	P4-P3-P2-P1	Consensus optimal
Groupe I	Caspase-1	W E H D	
	Caspase-4	(W/L) E H D	WEHD
	Caspase-5	(W/L) E H D	
Groupe II	Caspase-2	D E H D	
	Caspase-3	D E V D	DEXD
	Caspase-7	D E V D	
Groupe III	Caspase-6	V E H D	
	Caspase-8	L E T D	(I/V/L)EXD
	Caspase-9	L E H D	
	Caspase-10	L E X D	

Les Caspases clivent un très grand nombre de protéines impliquées dans des fonctions variées. **Le Tableau 1.3** montre les principaux substrats clivés par les Caspases au cours de l'apoptose. Ces protéines cibles regroupent des protéines cytoplasmiques, nucléaires, des protéines impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN, ainsi que des kinases.

Des protéines impliquées dans la transduction du signal, l'expression de gènes, la régulation du cycle cellulaire, les maladies génétiques ou des protéines de régulation de l'apoptose sont aussi substrats des Caspases**(21).**

Tableau 1.3 - Exemples de substrats clivés par les Caspases au cours de l'apoptose.

Classe de substrat	Exemples
Régulateurs de l'apoptose	Bad, Bcl-2, Bcl-xL, Procaspases…
Adhésion cellulaire	β-caténine, E-cadhérine, Desmogléine-3…
Cytosquelette et protéines structurales	Lamine, α-Actine, Kératine, α-Tubuline…
Cycle cellulaire	Cycline A, Cdc-27,c-Abl…
Synthèse, clivage et réparation de l'ADN	ICAD, ATM, DNA-PKcs, PARP-1…
Facteurs de transcription	FLI-1, Sp1, Stat-1…
Métabolisme de l'ARN	Nucléoline, hnRNPs, RHA…
Cytokines	Pro-IL-1β, pro-IL-18, pro-IL-16…
Récepteurs membranaires	EGF-R, RET…
Transduction du signal	CaMK IIα, PKC, PP2A…
Neurodégénérescence	Ataxine-3, Huntington, APLP1…
Protéines virales	CrmA, p35…

1.6.Rôles des Caspases :

1.6.1-Dans l'apoptose :

Afin d'étudier le rôle individuel des Caspases, des animaux déficients pour l'expression spécifique d'une d'entre elles ont été générées. A ce jour, les gènes codant pour les caspases 1, 2, 3, 8, 9, 11 et 12 ont été invalidés **(Tableau 1.4).**

Tableau 1.4 - Invalidation des gènes codant pour les caspases,

	Développement et expression des cytokines	**Apoptose**
Caspase 1	Pas d'effet sur le développement, Résistance aux chocs septiques induits par LPS ; Absence d'IL-1β et IL-18 clivé ; Production altérée d'IL-1α, IL-6 et IFN-γ.	Sensible normale à la plupart des agents pro-apoptotique ; L'apoptose induite par CD95 est atténuée dans les thymocytes. Les neurones sont résistants à la déprivation en facteur de croissance.
Caspase 2	Viable pas de problème majeur ; Excès des cellules germinales femelles.	Ovocyte résistants à la mort induite par les drogues ; La mort induite par le granzyme est défectueuse dans les Cellules B ; Lymphocytes sensible aux drogues et à L'anti-CD95.
Caspase 3	Taille plus petite. Mort entre la $1^{ère}$ et la $3^{ème}$ semaine. Altération du développement du cerveau avec un excès de cellules postmitotiques.	Pas de bourgeonnement et de fragmentation du noyau dans les thymocytes et les hépatocytes ; Clivage des substrats des caspase absent au retardé. Réduction de l'apoptose dans l'AICD et dans des fibroblastes stimulés par des drogues.
Caspase 8	Létal in utero. Embryons plus petits ; Malformation cardiaque ; Accumulation massive d'érythrocytes et hémorragie massive. Diminution des cellules souches hématopoïétiques.	ibroblastes résistance à l'apoptose induite par TNF-RL CD95 et DR3mais sensible à la plupart desagents proapoptotiques ; activation normale de NF-κB et de JNK.

Caspase 9	Létalité périnatale ; Cerveau plus volumineux et mal formé dû à une réduction de l'apoptose au cours du développement du cerveau. Absence d'activation de la caspase3 dans les cerveaux embryonnaires.	Les cellules souches embryonnaires et les fibroblastes sont résistants à de nombreux stimuli proapoptotique ; les thymocytes sont résistants à l'apoptose induite par radiation -γ et dexaméthasone mais sensibles aux U.V. et à CD95. Les splénocytesne sont pas protégés contre l'apoptose induite par des drogues.
Caspase 11	Pas de défauts du développement (similaire à caspase 1). Absence de production d'IL-1α et β, dû au blocage de l'activation de la caspase 1.	Cellules résistantes à l'apoptose induite par la surexpression de la caspase 1.
Caspase 12	Pas de défaut du développement	Souris résistantes à l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique mais sensible aux autres stimuli proapoptotiques ; Les neurones corticaux présentent une insensibilité à l'apoptose induite par la protéine β-amyloide mais pas par lastaurosporine ou la déprivation en acteur de croissance.

Par conséquent, les souris n'ont aucun effet sur les gènes codant pour la Caspase 1 ou la Caspase 11. Le développement est normal **(22),** mais la production d'interleukine-1α et de β, d'IL-18 et d'interféron-γ est défectueuse. Par conséquent, la Caspase 1 semble jouer un rôle dans la régulation du système immunitaire, mais n'a quasiment aucun rôle dans la voie apoptotique **(23 ,24).**

Les souris inefficaces pour le gène Caspase 2 présentent un développement normal avant l'âge adulte et ne présentent aucun phénotype sévère **(25).** À la naissance, les souris dépourvues de Caspase-2 ont un nombre réduit de motoneurones faciaux, ce qui indique

que la Caspase 2 ne fonctionne pas correctement Il peut être utilisé comme un effet positif de l'apoptose, mais il peut également retarder la mort cellulaire en fonction du type de cellule.En effet, la Caspase 2 existe sous 2 formes Obtenu par épissage alternatif : la forme longue de Casp2L induit l'apoptose, tandis que la petite forme de Casp2S (Small) inhibe l'apoptose **(26).**

Les souris invalidées pour la Caspase 3 furent les premières à présenter de profonds bouleversements de l'apoptose **(27, 28).** Elles sont plus petites que les souris contrôlent et meurent entre la première et la troisième semaine après la naissance. Il s'est avéré que le phénotype de ces souris est extrêmement restreint. En effets, les anomalies les plus marqués semblent sélectivement localisés au niveau du système nerveux central.

Caspase 8 chez les souris n'est pas valide Le développement normal dans les 11 premiers jours après la fécondation, puis la mort peuvent être dus à Malformation cardiaque sévère. Les cœurs de ces animaux sont sous-alimentés, ce qui suggère que la Caspase 8 pourrait être impliquée dans la transmission de signaux de survie plutôt que de signaux de mort au moins au niveau de cet organe. De plus, ces embryons produisent très peu de précurseurs myéloïdes. Fibroblaste embryonnaire Ces souris ne sont pas sensibles aux effets cytotoxiques induits par Fas, TNF-R1 ou DR3, mais sont toujours sensibles à la privation de facteurs de croissance, à la lumière ultraviolette, à la céramide et à l'étoposide**(29).**

Les souris Caspase 9-inefficaces ont des phénotypes similaires à ceux des souris Caspase 3 - / - mais plus grave **(30).** Ils sont morts le 16ème jour de développement. Ils souffrent de malformations cérébrales et le niveau cellulaire est trop élevé Système nerveux central. Les marqueurs cellulaires apoptotiques sont réduits d'environ 10 fois, TUNEL positif (terminale désoxynucléotidyl transférase dUTPnick end Marqué), dans le cerveau des souris inefficaces contre la Caspase 9 par rapport aux souris témoins. Les souris Apaf-1 - / - partagent également ce phénotype. La Caspase 3 n'est pas activée dans le corps dans le cerveau, mais cette activation se produit généralement dans l'épiderme et les tissus méningés **(31).** Contrairement au cerveau, certains organes tels que le cœur, les poumons, le foie et la colonne vertébrale se développent normalement. Ces cellules ES de souris (cellules souches embryonnaires) ou fibroblastes embryonnaires libèrent le cytochrome c dans leurs mitochondries Exposition aux UV, mais la Caspase 3 n'est pas activée **(32).**

Les souris Caspase 12-inefficaces n'ont montré aucun défaut de développement évident. Des études de microscopie confocale montrent que la pro-caspase 12 est Principalement

situé dans le réticulum endoplasmique **(33).** En fin de compte, la caspase 12 semble être critique au niveau d'apoptose induite par le stress La mort neuronale induite par la protéine ER ou Ab en fait une cible pharmacologique potentielle.

1.6.2. Dans d'autres processus :

Les modifications cellulaires observées lors de la différenciation ont quelque chose de commun avec les modifications morphologiques décrites dans l'apoptose. Par exemple, les cellules épithéliales du cristallin, les kératinocytes et les globules rouges perdent leur noyau au cours de leur différenciation terminale, et l'activation de la Caspase a été initialement suspectée, explorée et démontrée dans ces cellules **(34, 35).** En l'absence d'énucléation, le rôle de la Caspase dans la différenciation a également été rapporté dans de nombreux systèmes, comme la différenciation des muscles squelettiques **(36),** le sperme de drosophile **(37),** les cellules mégacaryotes**(38),** les plaquettes, les monocytes **(39)** et les ostéoblastes **(40).** Les recherches suggèrent que les Caspases, enzymes clefs de l'apoptose, sont également indispensables à de nombreux processus de différenciation. Le clivage de certaines cibles, et pas d'autres, par les Caspases, déterminerait le choix du destin de la cellule. La description de l'activation des Caspases et l'identification de substrats des Caspases en l'absence de mort cellulaire ont suscité un grand intérêt pour les fonctions des Caspases dans les réponses cellulaires au-delà de l'apoptose.L'étude des souris « knock out » pour les Caspases, ou de leurscellules, confirme les rôles pléiotropiques de ces protéases dans la différenciation cellulaire, la prolifération ou l'activation de NF-KB **(Tableau 1.5).** Les fonctions non apoptotiques des Caspases suggèrent qu'elles peuvent être activées indépendamment ou sans l'induction de la cascade apoptotique, ce qui entraîne le clivage spécifique de certains substrats **(41).** Par exemple, il a été décrit dans les polynucléaires neutrophiles non apoptotiques que le clivage de la Caspase-3 par la sérine protéase PR3 (Proteinase 3) donne un fragment activé de 22 kDa qui n'induit pas la mort cellulaire mais dont le rôle reste à préciser **(42).**

Tableau 1.5- Les différentes fonctions des caspases indépendantes de l'apoptose

	ROLE DANS L'APOPTOSE	AUTRES FONCTIONS
Caspase-1	Activation des caspases Initiatrices.	- Production d'IL-1 - Différenciation des muscles squelettiques. - Migration cellulaire - Activation de NF-κB
Caspase-2	Caspase initiatrice/exécutrice Initiatrice de l'apoptose après la dégradation de l'ADN et pendant la catastrophe mitotique.	-Différenciation des érythroblastes, ostéoblastes, macrophages. -Réparation de l'ADN. -Activation de NF-κB.
Caspase-3	Caspase exécutrice.	-Différenciation des érythroblastes, monocytes, kératinocytes, macrophage, cristallin, spermatozoïdes, muscle squelettiques, ostéoblastes, trophoblastes du placenta.
		-Prolifération des cellules B. -Production d'IL-16. -Formation des plaquettes. -Différenciation des cellules souches neurales. - Inhibition de la maturation des cellules dendritique.
Caspase-5	Activation des CaspasesInitiatrices.	-Production d'IL-1.
Caspase-6	Caspase exécutrice.	-Différenciation du cristallin. -Régulation positive du cycle cellulaire des lymphocytes B.
Caspase-7	Caspase exécutrice.	-Différenciation des érythroblastes.

Caspase-8	Caspase initiatrice de la voie extrinsèque due au récepteur de mort.	-Prolifération et activation des lymphocytes T. -Régulation positives du cycle cellulaire lymphocyte B. -Activation de NF-κB. -Différenciationdes trophoblastes, ostéoblastes,érythroblastes, monocytes. -Mobilité cellulaire. -Développement des embryons
		de souris : Différenciation des progéniteurs hématopoïétiques.
Caspase-9	Caspase initiatrice de la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale.	- Idem processus de différenciation de la Caspase-3 -Différenciation des cellules épithéliales.
Caspase-10	Caspase initiatrice de la voie des récepteurs de mort.	- Impliquée dans l'activation des voies de survie mediées par NF-κB.
Caspase-11	Caspase initiatrice de la voie des récepteurs de mort.	-Production d'IL-1 -Migration des macrophages.
Caspase-12	Caspase initiatrice de la voie du réticulum endoplasme.	-Diminution de l'inflammation. -Réponse immunitaire innée.
Caspase-14	Caspase exécutrice.	-Différenciation des kératinocytes.

1.7. La régulation des Caspases :

1.7. 1. Inhibiteur apposés protéine (IAPs) :

La famille des IAPS a été découverte initialement chez le baculovirus**(43)**.Tous les membres de cette famille portent une ou plusieurs copies du motif BIR (« baculovirus IAP repeats ») nécessaires pour lier et inactiver les Caspases**(44).** Ils inhibent à la fois l'activité des Caspases initiatrices et celle des Caspases effectrices. De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine, ce qui induit leur dégradation ainsi que celle des Caspases auxquelles elles sont liées **(45).** Ces inhibiteurs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines Smac/Diablo et Omi HirA2 libérées par la mitochondrie pendant l'apoptose. Celles-ci se lient aux IAPS et les inhibent **(46)**

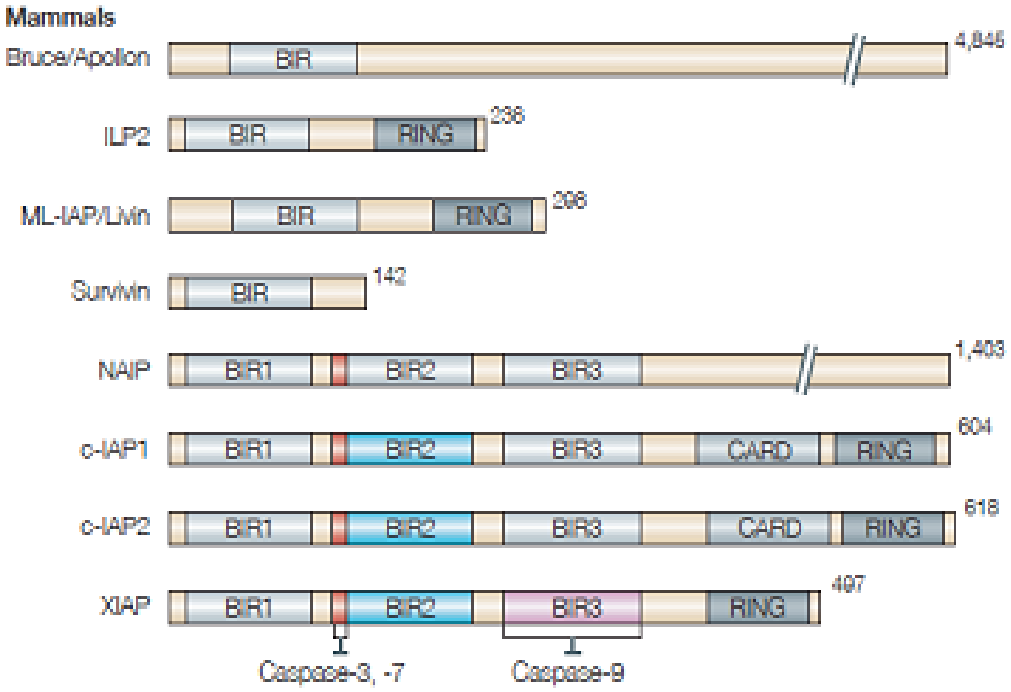


Figure 1.3- Les IAP chez les mammifères.

1.7.2. FLIP :

Concernant la protéine FLIP, celle-ci régule l'activation de la voie extrinsèque. En effet, FLIP est un homologue inactif de la procaspase-8 qui présente des domaines DED permettant son recrutement au niveau des protéines adaptatrices FADD. FLIP entre alors en compétition avec la procaspase-8 et bloque le recrutement de cette dernière au niveau du complexe du récepteur de mort **(47).**

1.7. 3. La phosphorylation :

Les Caspases sont considérées comme étant des phosphoprotéines, c'est à dire capables d'être régulées par phosphorylation **(48)** et déphosphorylation **(49)** sous l'action de kinases telles que Akt**(50),** la Protéine Kinase (PK) C ou bien encore la PKA **(51),** et de phosphatases telles que la protéinephosphatase 2 **(52, 53).** Par exemple, Akt phosphoryle spécifiquement la Caspase-9 inhibant ainsi son clivage et donc son activation. De même, la phosphorylation de la Caspase-3 par une MAP Kinase (MitogenApoptosisProtein) diminue son activité, et, à l'inverse, sa déphosphorylation par la protéine phosphatase 2, lui permet de se réactiver **(54)**.

1.7.4. Les calpaïnes :

Les calpaïnes représentent une famille de cystéine protéases Ca2+-dépendante de la famille des papaïnases. Les calpaïnes et la Caspase-3 partagent certains substrats, comme la fodrine et PARP **(55).** La calpaïne peut cliver la pro-Caspase-3 en un fragment de 29 kDa favorisant ainsi son activation **(56).**

1.7.5.CrmA et p35 et p49 :

Les Caspases sont régulées par des inhibiteurs spécifiques, qui ont été découverts chez les virus. En effet, l'apoptose représente un des moyens de défense des cellules contre les virus par élimination des cellules infectées. Certains virus ont donné développé des systèmes de résistance qui agissent sur les Caspases et inhibent l'apoptose comme CmA (« cytokine réponse modifier A ») et p35. Ainsi, les protéinesCrmA du virus de la vaccine (cowpox virus) et p35 exprimée par le baculavirus, empêchent l'activation des procaspases en masquant leur site de clivage. Comme chaque caspase peut en activer une autre et que l'apoptose est le résultat de cette cascade, CmA et p35 inhibent tout le processus d'apoptose en bloquant la première étape **(57 ,58)**

La protéine p35 produite par le Baculovirus et son homologue p49 inhibent l'activité d'un spectre large de Caspases incluant la Caspase-1, -3, -6, -7, -8, -9 et -10 **(59).** Le clivage de p35 par les Caspases entraîne la formation d'un complexe Caspase/p35 qui bloque le site catalytique des Caspases**(60).**

1.8-Apoptose Caspase indépendante :

Des mécanismes apoptotiques Caspases indépendantes ont été mis en évidence. La mitochondrie semble jouer un rôle important dans la signalisation Caspase indépendante. En effet, la surexpression de Bcl-2 protège les cellules de la mort de type nécrose-like induite par le TNF-α **(61).** De plus, des fibroblastes déficients pour la protéine Apaf-1, qui participe à la formation de l'apoptosome, meurent en réponse à la surexpression de tBid, tandis que des fibroblastes doubles déficients pour les protéines Bax et Bak sont résistants.

Ces résultats suggèrent que les événements mitochondriaux induits par tBid impliquent les membres pro-apoptotiquesBax et Bak et participent à une mort caspase indépendante **(62 ,63).** En outre, certaines protéines mitochondriales peuvent être relarguées en l'absence d'activation de Caspases. Par exemple, la sérine protéase HtrA2/Omi pourrait agir en tant que protéine effectrice dans une mort de type nécrose-like grâce à son activité sérine protéase (64). EndoG est capable d'induire une fragmentation de l'ADN de manière Caspase-indépendante sur des noyaux isolés **(65).** En revanche, la mort Caspase indépendante semble être importante en cancérologie. Le succès des traitements anticancéreux repose notamment sur leur capacité à induire la mort des cellules cancéreuses et en particulier par l'induction de l'apoptose dépendante de l'activation des Caspases. Cependant, l'activation de voie de signalisation Caspase indépendante semble prometteuse en thérapie anticancéreuse. La mort de cellules cancéreuses pulmonaires induite par le taxol, un inhibiteur du fuseau mitotique, n'est pas inhibée en présence de z-VAD **(67).** En réponse à ce même agent, des cellules cancéreuses ovariennes meurent en l'absence d'activation de Caspases vraisemblablement par un mécanisme dépendant d'AIF **(68).** En effet, AIF est impliqué dans la mort Caspase-indépendante induite par la staurosporine dans des cellules cancéreuses pulmonaires chimiorésistantes**(69).**

Référence Bibliographique :

(1) Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemieswithin. Science, 281, 1312- 1316.

(2) Fischer, U., Janicke, R.U. and Schulze-Osthoff, K. (2003) Manycuts to ruin:acomprehensive update of caspasesubstrates. CellDeathDiffer, 10, 76-100

(3) Orrenius S. : Mitochondrial regulation of apoptoticcelldeath, Toxicol. Lett 2004, 149 : 19-23.

(4) Boyce, M., Degterev, A. and Yuan, J. (2004) Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. CellDeathDiffer 11, 29-37

(5) Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwieg EA, Yuan J (1993). Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalianhomolog of the C. eleganscelldeathgene ced-3. Cell 75: 653-660.

(6) Koenig, U., Eckhart, L. and Tschachler, E. (2001) Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. BiochemBiophysRes Commun 285, 1150-1154

(7) Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X. and Vandenabeele, P. (2002) Alice in caspase land. phylogeneticanalysis of caspasesfromworm to man. CellDeathDiffer 9, 358-361

(8) Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L. and Tschachler, E. (2002) Humancaspase 12 has acquireddeleterious mutations. BiochemBiophysRes Commun 293, 722-7264

(9) Mikolajczyk, J., Scott, F. L., Krajewski, S., Sutherlin, D. P. and Salvesen, G. S. (2004) Adtivation and substratespecificity of caspase-14. Biochemistry 43, 10560-10569

(10) Fuentes-Prior, P. and Salvesen, G. S. (2004) The protein structures thatshapecaspaseactivity, specificity, activation and inhibition. Biochem J 384, 201-232

(11) Thornberry NA (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. ChemBiol5: R97-103

(12) Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferenz CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD et al. (1994). Crystal structure of the cysteineprotease interleukin-1 β-convertingenzyme : a (p20/p10)2 homodimer. Cell 78: 343-352.

(13) Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P, Thornberry. N. A. and

Becker, J. W. (1996) The three- dimensional structure of apopain CPP32, a key mediator of apoptosis. Nat StructBiol 3, 619-625

(14) Kumar,S.(1999).mechanismsmediating caspase activation in celldeath. Celldeathdiffer, 6(11), 1060-1066. doi:10.1038/sj.cdd.4400600

(15) Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C.A.,newmeyer, D.D. Martin, S.J.(1999).Ordering the cytochrome c-initiatedcaspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3,-6,-7, -8,and -10 in a caspase-9- dependent manner. J Cell biol,144(2), 281 292.Retrieved fromhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922454

(16) Deveraux, Q.L., N. Roy, et al. (1998). "IAPs block apoptoticeventsinduced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases". Embo J 17: 2215-2223.

(17) Roy, N., Q.L. Deveraux, et al. (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specificcaspases". Embo J 16:6914-6925.

(18) Xu, G., M. Cirilli, et al. (2001). "Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex". Nature 410(6827): 494-7.

(19) Thornberry, N.A., T.A. Rano, et al. (1997). "A combinatorialapproachdefinesspecificities ofmembers of the caspasefamily and granzyme B. Functionalrelationshipsestablished for key mediators of apoptosis". J BiolChem 272:17907-17911.

(20) Thombenry , V. A ,Rano , T. A. , Peterson , E. P. , Rasper . D. M. Timkey . T. Garcia - Calvo , M , Houtzager , V. M ,Vordstrom . P. A. , Roy . S. Vaillancourt , J P. Chapman , K T and Nicholson , D. W. (1997) A combinatorialapproachdefinesspecificities of members of the caspasefamily and granzyme B. Functionalrelationshipsestablished for key mediator of apoptosis I BiolChem 272. 1790-19911

(21) Fischer , U. , Janicke , R. L. and Schulze - Osthoff , K. (2003) Manycute to run a comprehensive update of caspasesubstratesCailDeathDiffer 10.76.100 .

(22) Wang, S., M. Miura, et al. (1998). "Murine caspase-11, an ICE-interactingprotease, is essential for the activation of ICE". Cell 92:501-9.

(23) Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in micedeficient in interleukin-1 beta converting enzyme". Science 267: 2000-3.

(24) Li, P., H. Allen, et al. (1995). "Micedeficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxicshock". Cell 80:401-11.

(25) Bergeron, L., G. I. Perez, et al. (1998). "Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice". GenesDev 12: 1304-14.

(26) Wang, H. G., T. Miyashita, et al. (1994). "Apoptosisregulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase". Oncogene 9:2751-6.

(27) Kuida, K., T. S. Zheng, et al. (1996). "Decreasedapoptosis in the brain and prematurelethality in CPP32-deficient mice". Nature 384:368-72.

(28) Woo, M., R. Hakem, et al. (1998). "Essential contribution of caspase 3/CPP32 toapoptosis and itsassociatednuclear changes". GenesDev 12:806-19.

(29) Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, et al. (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates celldeath induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and islethalprenatally". Immunity 9:267-76.

(30) Hakem, R., A. Hakem, et al. (1998). "Differentialrequirement for caspase 9 in apoptoticpathways in vivo". Cell 94:339-52.

(31) Kuida, K., T. F. Haydar, et al. (1998). "Reducedapoptosis and cytochrome c-mediatedcaspase activation in micelackingcaspase 9". Cell 94:325-37.

(32) Hakem, R., A. Hakem, et al. (1998). "Differentialrequirement for caspase 9 in apoptoticpathways in vivo". Cell 94:339-52.

(33) Welihinda, A. A., W. Tirasophon, et al. (1999). "The cellular response to proteinmisfolding in the endoplasmicreticulum". Gene Expr 7: 293-300.

(34) Weil, M., M.C. Raff, et al. (1999). "Caspase activation in the terminal differentiation of humanepidermalkeratinocytes". CurrBiol 9:361-364.

(35) Zermati, Y., C. Garrido, et al. (2001). "Caspase activation isrequired for terminal erythroidDifferentiation". J Exp Med 193:247-254.

(36) Fernando, P., J.F. Kelly, et al. (2002). "Caspase 3 activityisrequired for skeletal muscle differentiation". Proc NatlAcadSci USA 99:11025-11030.

(37) Arama, E., J. Agapite, J., et al. (2003). "Caspaseactivity and a specific cytochrome C are required for spermdifferentiation in Drosophila". DevCell 4: 687-697.

(38) De Botton, S., S. Sabri, et al. (2002). "Platelet formation is the consequence of caspase activation withinmegakaryocytes". Blood 100:1310-1317.

(39) Sordet, O., C. Rebe, et al. (2002). "Specificinvolvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages". Blood 100:4446-4453.

(40) Mogi, M., and A. Togari (2003)."Activation of caspasesisrequired for osteoblasticDifferentiation". J BiolChem 278:47477-47482.

(41) Lamkanfi, M., N. Festjens, et al. (2007). "Caspases in cellsurvival, proliferation and differentiation". CellDeathDiffer 14:44-55.

(42) Pederzoli, M., C. Kantari, et al. (2005). "Proteinase-3 induces procaspase-3 activation in the absence of apoptosis:potentialrole of thiscompartmentalized activation of membrane-associated procaspase-3 in neutrophils". J Immunol 174: 6381-6390.

(43) Crook , N. E. , Clem , R. J. and Miller , L. K. (1993) An apoptosis - inhibitingbaculovirusgenewith a zinc finger - like motif . J Virol 67,2168-2174

(44) Roy , N. , Deveraux , Q. L. , Takahashi , R. , Salvesen , G. S. and Reed , J. C. (1997) The C - IAP - 1 and c proteins are direct inhibitors of specificcaspases . Embo I 16,6914-6925.

(45) Yang , Y. , Fang , S. , Jensen , J.P. , Weissman , A. M. and Ashwell , J. D. (2000) Ubiquitinprotein ligase activity of IAPs and theirdegradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli . Science 288 , 874-877.

(46) Du , C. , Fang , M. , Li , Y. , Li , L. and Wang , X. (2000) Smac , a mitochondrial proteinthatpromotescytochronne c - dependentcaspase activation by eliminating IAP inhibition . Cell102 , 33.42.

(47) Krueger , A. , Schmitz L , Baumann , S. , Krammer , P. H. and Kirchhoff , S. (2001) Cellular FLICE inhibitoryproteinsplicevariantsinhibitdifferentsteps of caspase - 8 activation at the CD95 deathinducingsignalingcomplex . J BiolChem276, 20633-20640.

(48) Martins, L. M., T. J. Kottke, et al. (1998). "Phosphorylatedforms of activatedcaspasesare present in cytosol from HL-60 cellsduringetoposide-inducedapoptosis". Blood 92 :3042-9.

(49) Anderson, P. (1997). "Kinase cascades regulating entry intoapoptosis". Microbiol Mol BiolRev 61: 33-46.

(50) Cai, J., J. Yang, et al. (1998). "Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c". BiochimBiophys Acta 1366: 139-149.

(51) Allan, L. A., N. Morrice, et al. (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation atThr 125 by ERK MAPK." Nat CellBiol 5(7): 647-54.

(52) Alvarado-Kristensson, M., F. Melander, et al. (2004). "p38-MAPK signalssurvival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in humanneutrophils." J Exp Med 199(4): 449-58

(53) Brady, S.C., L.A. Allan, et al. (2005). "Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta inresponse to hyperosmotic stress". Mol CellBiol 25: 10543– 10555.

(54) Alvarado-Kristensson, M. and T. Andersson (2005). "Protein phosphatase 2A regulatesapoptosis in neutrophils by dephosphorylatingboth p38 MAPK and itssubstratecaspase 3." J BiolChem 280(7): 6238-44.

(55) Wang, K.K. (2000). "Calpain and caspase:canyou tell the difference?" Trends Neurosci 23: 20-26.

(56) Blomgren, K., C. Zhu, et al. (2001). "Synergistic activation of caspase-3 by m-calpainafterneonatalhypoxia–ischemia". J. Biol. Chem. 276:10191–10198.

(57) Zhou Q. Snipas S. ,Orth K. Muzio M .. Dixit , V. M. and Salvesen , GS (1997) Target proteasespecificity of the viral serpinCrmAAnalysis of five caspases . jBiolChem 272,7797-7800

(58) Riedl . S ... Renatus , M. , Snipas . S. J. and Salvesen . G. S. (2001) Mechanism - based inactivation of caspases by the apoptoticsuppressor p35 . Biochemistry 40.13274-13280.

(59) Callus, B.A. and D.L. Vaux (2007). "Caspaseinhibitors: viral, cellular and chemical". CellDeathDiffer 14: 73-78.

(60) Zhou, Q., J.F. Krebs, et al. (1998). "Interaction of the baculovirus anti-apoptoticprotein p35 withcaspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex". Biochemistry 37:10757-10765.

(61) Thon, L., H. Mohlig, et al. (2005). "Ceramidemediatescaspase-independentprogrammedcelldeath". Faseb J 19:1945-1956.

(62) Cheng, E.H., M.C. Wei, M.C., et al. (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain- onlymoleculespreventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis". Mol Cell 8: 705-711.

(63) Wei, M.C., W.X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisitegateway to mitochondrial dysfunction and death". Science 292:727-730.

(64) Hegde, R., S.M. Srinivasula, et al. (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine proteasethatdisruptsinhibitor of apoptosisprotein-caspase interaction". J BiolChem 277:432-438.

(65) Li, L.Y., X. Luo, et al. (2001). " Endonuclease G is an apoptoticDNasewhenreleasedfrommitochondria". Nature 412: 95-99.

(66) Huisman, C., C.G. Ferreira, et al. (2002). "Paclitaxel triggers celldeathprimarily via caspaseindependent routes in the non-smallcelllung cancer cell line NCI-H460". Clin CancerRes 8:596-606

(67) Ahn, H.J., Y.S. Kim, et al. (2004). "Mechanism of taxol-inducedapoptosis in human SKOV3 ovariancarcinomacells". J CellBiochem 91: 1043-1052.

(68) Gallego, M.A., B. Joseph, et al. (2004). "Apoptosis-inducing factor determines thechemoresistance of non-small-celllungcarcinomas". Oncogene 23:6282-6291

Chapiter2 : Docking Moléculaire

CHAPITRE 2 : DOCKING MOLECULAIRE

2.1 Introduction :

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient, dans lequel les essais cliniques succèdent au développement préclinique **(1)**. L'identification et la mise au point de nouveaux médicaments se fait par l'amarrage moléculaire ou moléculaire sert souvent à déterminer l'orientation de petites molécules liées à leurs protéines ciblées afin de calculer leurs affinité et niveau d'activité. Ainsi, l'amarrage joue un rôle important dans la conception pensée de nouveaux médicaments. En raison de sa valeur biologique et pharmaceutique, on s'est efforcé d'améliorer les méthodes qui calculent l'amarrage moléculaire.

Plusieurs méthodes permettent d'étudier l'interaction ligand-récepteur ou encore l'interaction d'une molécule avec un site actif.

2.2 Le Docking Moléculaire :

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 Walls, 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) **(2).**
- Une simulation de Docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires: le Docking et le Scoring (figure 2.1).

➢ **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 proposé **(3,4).**

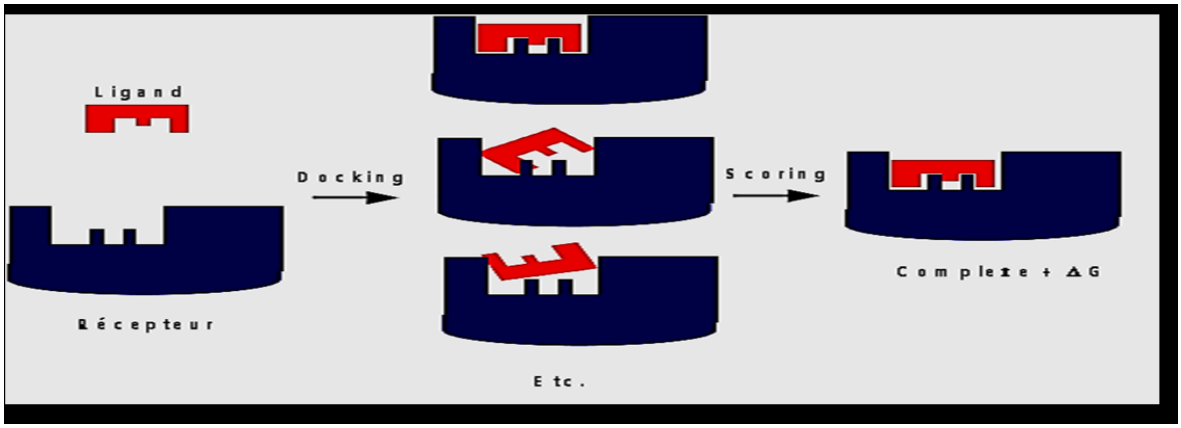


Figure 2.1-Stimulation du Docking et Scoring.

2.3 Les outils du Docking moléculaire :

Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme Docking seul est couramment employer pour désigner un« Docking protéine-ligand » **(5).**

2.3.1 Ligand :

En Docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très important .Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules **(6).**

A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné : la première souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de données de structures chimiques appelés chimiothéques ou espaces chimique **(7).**

Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2….etc.) grâce a des logiciels de construction moléculaire tels que ChemDraw, Arguslab, Titan ou Sybil pour ne citer que ces exemples.

Un Ligand peut être :

— Substrat : Molécule qui se fixe au site actif de la protéine ou de l'enzyme pour subir une action : (décarboxylation, hydrolyse, déshydrogénation. . .).

— **Coenzyme** : Molécule qui complète l'action de certaines enzymes.

— **Activateur** : Composé chimique qui entraîne un changement de conformation du site actif de l'enzyme pour augmenter son affinité pour le substrat.

— **Inhibiteur** : Contrairement à l'activateur, ce type de ligand modifie la structure électronique du site actif en diminuant l'affinité de l'enzyme pour son substrat**.**

2.3.2 Récepteur :

Est macromoléculaire étant le plus souvent une protéine **(8)** ; pour l'obtention des récepteurs, on utilise les structures 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de donnée PDB (http://www.rcsb.org/pdb/). Il s'agit d'une grande archive de données structurales de macromolécules biologiques : protéines et acides nucléiques (ADN, ARN). Les données structurales sont obtenues par cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMNet sont accessibles gratuitement sur internet via des sites Web définis de ses organisations membres dont : RCSB PDB, PDBj, PDBe,…etc.

En mois de mai 2018, la PDB compte plus de 141616 structures de bio-macromolécules. Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargeables sous extension *pdb* lisibles par les logiciels de Docking et contenant diverses informations sur la protéine en question. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolue la structure, la méthode expérimentale, …etc. On y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéroatomes, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée **(9).**

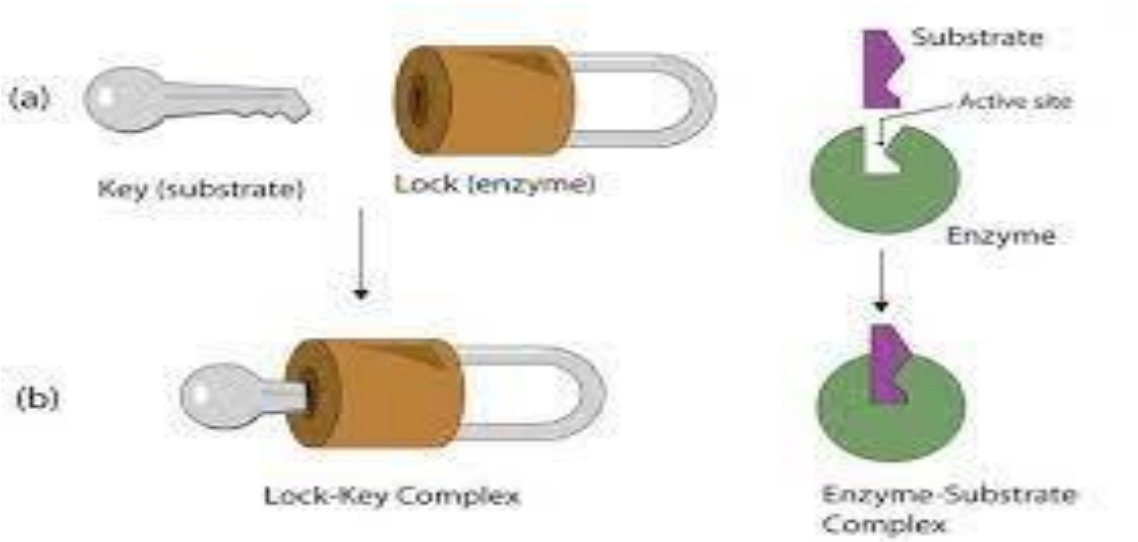


Figure 2.2-le site actif modèle de Fisher **(10).**

2.4 Les interactions Protéine-Ligand :

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles.

2.4.1 Les interactions électrostatiques :

Les interactions électrostatiques agissent à plus grande distance entre dipôles chargés (figure 2.3).La distance pour une liaison saline, par exemple, est de 3, 7à4, 5Å, et sa force est de l'ordrede8kcal/mol. En présence de solvant, ces interactions sont favorisées du fait de la polarité et de la petite taille de la molécule d'eau **(11).**

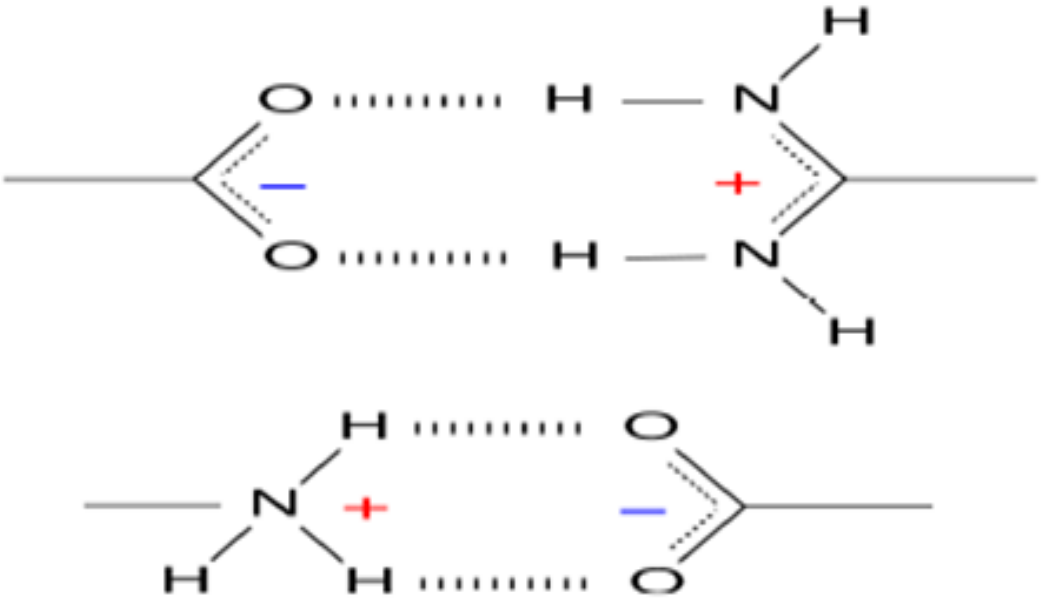


Figure 2.3-Interactions électrostatiques.

2.4.2 La liaison hydrogène :

Lesponts hydrogène avec une force de l'ordre de 2 à 4 kcal/mol agissent, dans les systèmes biologiques, à très courte distance (0,9 à 2,8 Å) entre un H lié à un O ou un N avec un O ou un N (figure 2.4).Ils sont peu nombreux et s'adaptent très bien à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°) **(12).**

L'orientation et la géométrie des liaisons hydrogènes contribuent à la force des liaisons hydrogènes.

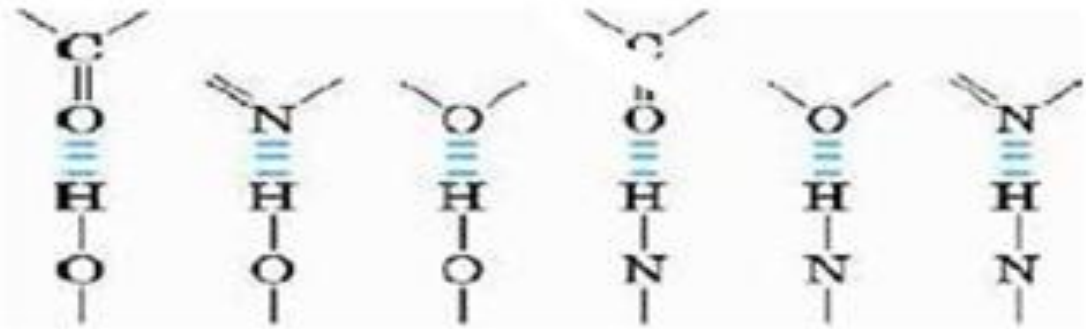


Figure 2.4-liaison hydrogène.

2.4.3 Les interactions de Van Der Walls

Les interactions de Van Der Walls sont des dipôles non permanents de faible rayon d'action (figure 2.5).Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice **(12).**

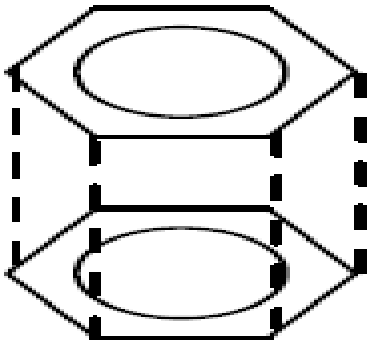


Figure 2.5-Interactions de Van Der Walls.

2.4.4Les interactions hydrophobes :

Sont des chaînes organiques saturées ou aromatiques non polaires ayant très peu d'affinité pour l'eau (figure 2.6).Ils ont tendance à se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'environnement aqueux **(14).**

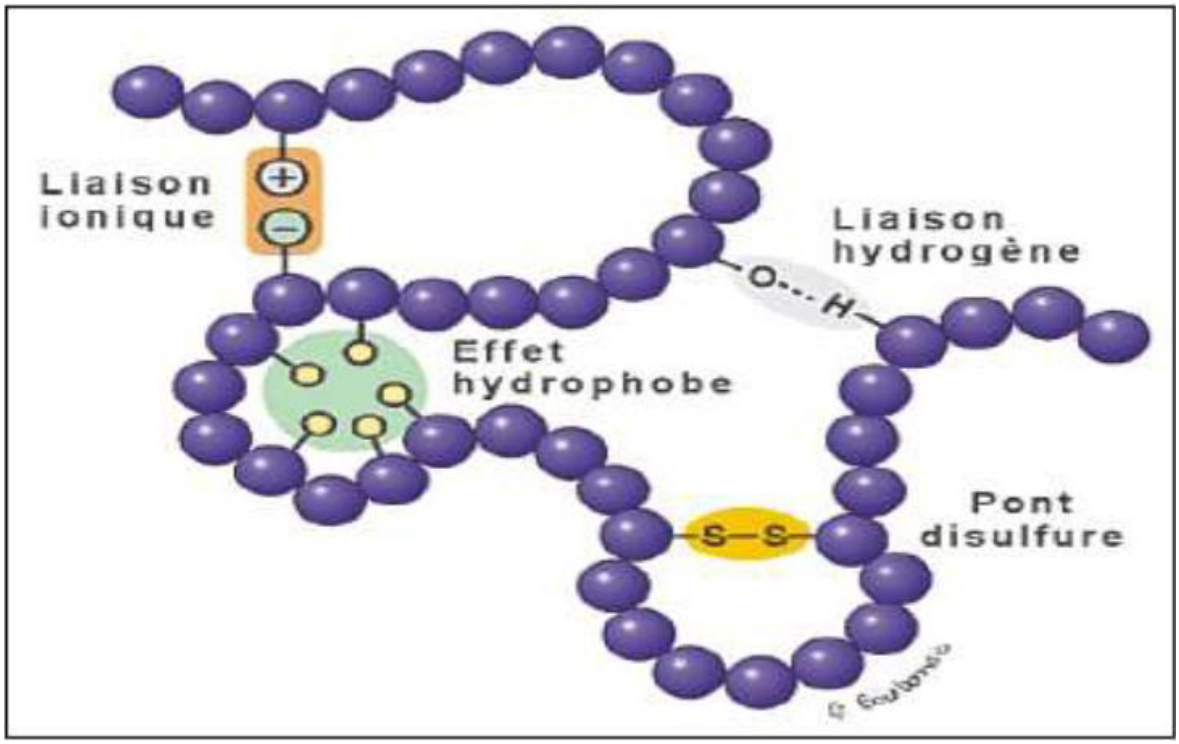


Figure 2.6-Interaction Hydrophobe.

2.5 Le processus de Scoring :

2.5.1 Principe :

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se Complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe. Le principe thermodynamique est le suivant **(15)** :

$$\Delta G = \Delta G_{complexe} - \Delta G_{ligand} - \Delta G_{protéine}$$

Concrètement, le score est une estimation de l'affinité entre la macromolécule et la petite molécule organique. Un score ne prédit donc en rien une activité mais bien une affinité.

2.5.2 Description des fonctions de Scoring :

a- La fonction de scoring DOCK :

Dock-Score, élaborée par Kunst, **(16)** dérive directement du champ de force AMBER **(17).** Cette fonction est composée de deux termes électrostatique et stérique.

$$\text{Dock-Score} = E_{(électrostatique)}(d) + E_{(stérique)}(d)$$

Où E est l'énergie dépendante de la distance (d) entre deux points susceptibles d'interagir.

b- La fonction de scoring GOLD :

Gold-Score est issue des travaux de Willet. **(18)** Cette fonction est la somme des énergies de stabilisation provenant des liaisons hydrogène, de l'énergie interne de Van der Walls

pour la conformation du ligand en question ainsi que la force des interactions stériques entre le ligand et le récepteur.

$$\textbf{Gold-Score} = E_{\text{liaison H}}(d, \alpha) + E_{\text{stérique}}(d) + E_{\text{Van der Walls}}$$

Les deux premiers termes (énergie de liaison hydrogène et stérique) sont pondérés par

La distance entre les deux entités appartenant au ligand et au récepteur. L'énergie de liaison hydrogène est également pondérée par l'angle entre les deux entités. Des pénalités sont apportées lorsque la liaison ou le contact stérique sont en dehors d'un certain angle ou d'une distance fixée.

c- La fonction de scoringFlexX

Cette fonction dérive de l'équation de Böhm qui est bien plus complexe que les deux fonctions de scoring**(19).**

$$\textbf{F-Score} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{rot}} N_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{liaison H}}(\Delta R, \Delta\alpha) + \Delta G_{\text{liaisonionique}}(\Delta R, \Delta\alpha) + \Delta G_{\text{aromatique}}(\Delta R, \Delta\alpha) + \Delta G_{\text{lipophilie}}(\Delta d).$$

Cette équation considère la baisse d'entropie lors de la fixation du ligand dans le site actif. Les interactions sont prises en compte dans cette formule (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, contacts aromatiques). Un terme prend également en compte la lipophilie. Les écarts d'angle et de distance sont impliqués dans une fonction pénalisant les termes décrits ci-dessus.

Plus l'écart entre la géométrie de la liaison observée et la géométrie idéale est important, plus le terme est pénalisé et moins son énergie ΔG sera importante. Le terme lipophilique évalue les contacts atomiques entre la protéine et le ligand (interactions favorables hydrophobes et contacts déstabilisants).

d- La fonction de scoringChemscore :

Chemscore a été élaborée par le groupe d'Elbridgeet al **(20)**.Elle prend également en considération des termes similaires aux autres fonctions jusque-là décrites. Elle prend en compte l'énergie de liaison hydrogène, les interactions métal-ligand, les contacts lipophiles et enfin un terme prenant en considération l'entropie en fonction de la flexibilité de la molécule :

$$\textbf{Chemscore} = \Delta G_0 + \Delta G_{\text{liaison H}}(d, \alpha) + \Delta G_{\text{métal}}(d) + \Delta G_{\text{lipophilie}} + \Delta G_{\text{rot}} H_{\text{rot}}$$

L'énergie de liaison hydrogène est pondérée par la distance et l'angle entre les entités «donneur» et «accepteur». Le terme correspondant à la liaison du ligand avec un métal est pondéré par la distance entre l'atome du ligand et le métal.

e – La fonction de scoring PMF :

PMF (PotentialMean Force) est une fonction basée sur la connaissance (knowledgebased) Mise au point par Muegge. **(21, 22)**. Cette approche exploite l'information structurale extraite de la Protein Data Bank et la convertit en énergie libre d'interaction entre paires d'atomes protéine-ligand. Les effets entropiques, enthalpiques et de solvatation sont traités de manière implicite. Une étude comparative sur les algorithmes de Docking et les fonctions de scoring met en évidence que PMF est une fonction qui fonctionne bien dans le cas de cavité très polaires. Nous verrons plus tard que ceci peut être une explication de la défaillance de PMF dans nos deux projets, dont le site actif est majoritairement à tendance lipophile**(23)**.

2.6 Protocole Générale de Docking :

Les approches utilisées actuellement sont exclusivement calculatoires et évaluées par des outils de visualisation. Ces approches peuvent être décomposées en quatre à cinq phases successives.

- Choix du mode de représentation des protéines (tout atome, pseudo-atome, grille, etc.), Exploration conformation elle (corps-rigide position/orientation du ligand et/ou flexible position/orientation/forme du ligand).
- Minimisation de la fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction (ou fonction de score) des conformations issues de l'exploration.
- Regroupement par ressemblances et classification par évaluation plus fine du score, accompagnée d'une étape non automatique d'évaluation visuelle des résultats lorsque le score ne permet pas de discriminer la conformation native des différentes conformations générées.
- Une étape optionnelle d'affinement des complexes sélectionnés par minimisation ou dynamique moléculaire.
- Un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de modes de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison**.**

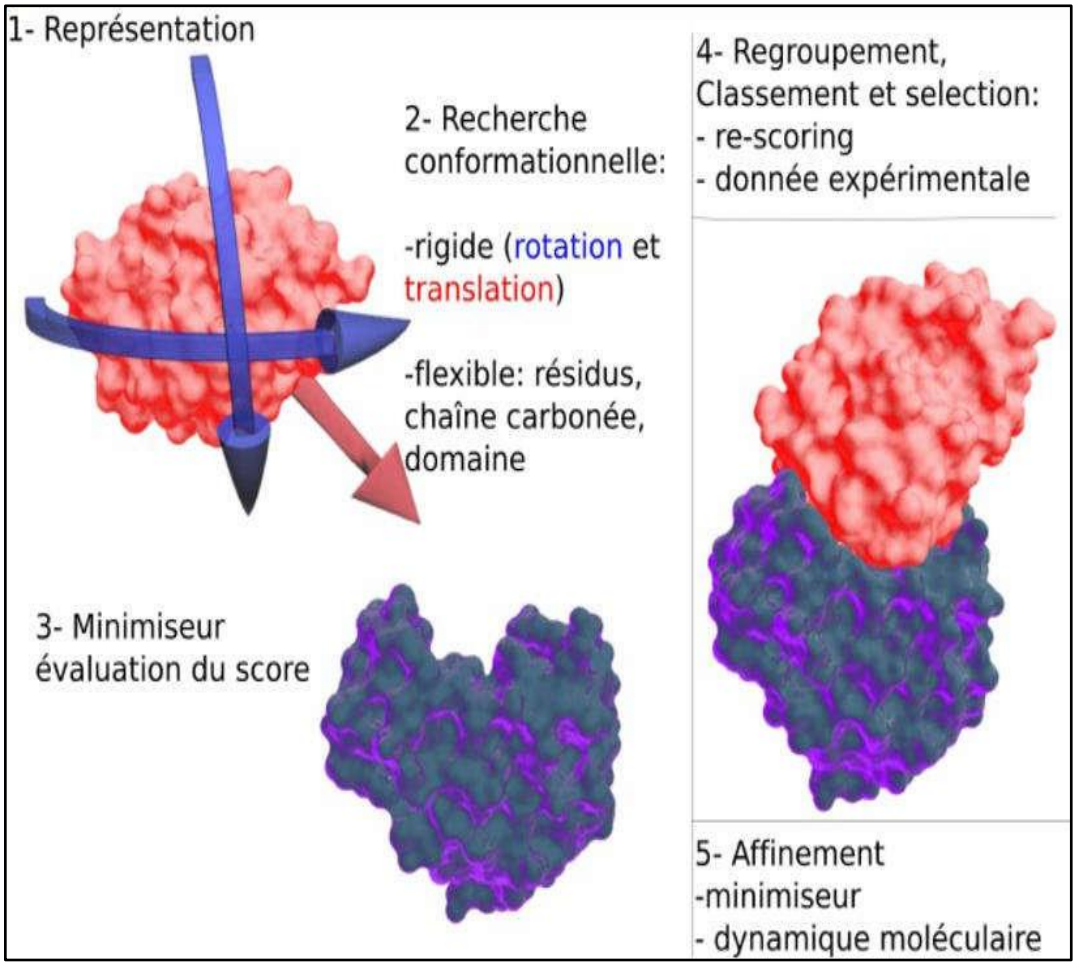


Figure 2.7-Protocole général de Docking**(24).**

Références Bibliographiques :

(1) Grosdidier A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. 2007. 90 p.

(2) Trouillas P. Chapitre 4 - Modélisation Moléculaire et Biologie. Thèse de doctorat en biophysique. Université de Lille. France. 2009. 17p.

(3) Warren G. L., Andrews C.W., Capelli A. M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S. F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J. M., Peishoff C. E., Head M. S.2006. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. Journal ofMedicinal Chemistry. **49**: 5912-5931.

(4) Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. 2002. Principles of Docking: An Over view of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. Proteins: Structure, Function, and Genetics.**47**: 409-443.

(5) E. B. D'Oliveira Simulation moléculaire appliquée à l'acétylation de flavonoïdes

(6) Catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la

(7) Régiosélectivité de la bioconversion. Thèse de doctorat d'université : Procédés

(8) Biotechnologiques et alimentaires. Nancy : Institut National Polytechnique de

(9) Lorraine.France. p 187 **2009**.

(10) Mong A. Création et utilisation de chimiothéques optimisées pour la recherche << in silico>> de nouveaux composés bioactif .Thèse de doctorat d'université : Chimie Informatiques et Théoriques. Orléans : Université d'Orléans.Fance.2006.**154 p**.

(11) RenvezG.Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking .Thèse de doctorat d'université : Nanophysique.Toulouse : l'université Toulouse III- Paul sabatier. France.2010.**163 p.**

(12) El Hadji Said K. Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des Tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. These de Master d'université de TLEMCEN Faculté des Sciences Département de Chimie. Tlemcen. Algérie. 2016. 50P.

(13) Mokrani E. H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique.

Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.

(14) Dr.KASSOUL.A. ENZYMLOGIE/ faculté de médecine périmer année médecine

(15) Dentaire 2015 /2016.p6.

(16) S Teniou. Conception in silicode nouveaux inhibiteurs de la topoi - somérase I de cellules cancéreuses. 2012.

(17) W Soufi-Lalout. "Contribution à la modélisation des interactions dans les biomolécules : Cas de la Maladie de Parkinson». Thèse de doct. Université Abou bekrbelkaïd de Tlemcen, 2016.

(18) **(13)** B Al-Lazikani, Xiang Jung JAND Z etHonig B. "Protein structure prediction". In: Curr. Opin.Chem.Biol (2001), p. 51–56.

(19) A.V VESELOVSKY et al. "Protein-Protein interactions: mecha- nisms and modification by Drug». In: Pub .Med (2002), p. 405–22.

(20) Arrault A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. Orleans : Université d'Orleans. France. 2007. 176 p.

(21) I.D. Kuntz, J.M.Blaney, S.J. Oatley, R. Langridge, T.E. Ferrin: A geometric approach to macromolecule ligand interactions J. Mol. Bio., 161, 269-288, 1982.

(22) D.A. Case, D.A. Pearlman, J.W. Caldwell, T.E. Cheatham; J. Wang, W.S. Ross, C.L. Simmering; Darder.

(23) Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.-C.; Leach, A.-R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking *J. Mol. Biol.* ***1997****, 267, 727-748.*

(24) H-J. Böhm: The Development of à Simple Empirical Scoring Function to Estimate the Binding Constant for a Protein-Ligand Complex of Known Three-Dimensional Structure J. Comput. Aided Mol. Des., 8, 243-256, 1994.

(25) M.D. Eldridge, C.W. Murray, T.R. Auton, G.V. Paolini, R.P. Mee: Empirical scoring functions: The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes J. Comput. Aided Mol. Des., 11, 425-445, 1997.

(26) **(21)]**Muegge, I.; Martin, Y.C. A General and Fast Scoring Function for Protein-Ligand Interactions: A Simplified Potential Approach J. Med. Chem.**1999**, *42*, 791-804.

(27) **(22)**Muegge, I. PMF Scoring Revisited J. Med. Chem. **2005**, 49, 5895-5902.

(28) **(23)**Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D. Protein-based virtual screening of chemical databases. Evaluation of different docking/scoring combinations *J. Med. Chem. **2000**, 43, 4759-4767.*

(29) **(24)**Férey N, Bouyer G, Martin C, Drif A, Bourdot P, Ammi M, Nelson J, Burkhart J-M, Autin L. Docking De Protéines En RéalitéVirtuelle : UneApprocheHybride Et Multimodale. 2e Soumission A Rsti, **2008**, P 10.

Chaitere3 : Applications, Résultats et Discussions

CHAPITRE 3 : APPLICATIONS, RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Introduction :

Les interactions protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation de systèmes biologiques**(1)**. Cela a ouvert la voie à la prédiction de l'industrie pharmaceutique, qui s'intéresse à la création de nouveaux médicaments. Le rôle des molécules dans les protéines est régi par les principes suivants : La reconnaissance mutuelle entre une molécule et sa cible. C'est dans ce contexte Amarrage moléculaire**(2)**.Dans ce chapitre, nous proposons d'analyser les interactions entre les inhibiteurs et l'enzyme 3H0E par la méthode d'amarrage moléculaire (Molecular Docking) en utilisant le logiciel MOE. Sachant que cette étude est basée sur deux facteurs : les scores et les distances d'interactions qui existent entre des groupes spécifiques de la chaîne latérale de l'enzyme (résidus du site actif) et les inhibiteurs impliqués.

3.2. Matériel :

3.2.1. Micro- ordinateur :

Dans le présent travail nous avons utilisé deux micro-ordinateurs : Dont les caractéristiques sont présentées dans la table ci-dessous.

Tableau 3.1 - Caractéristiques des ordinateurs utilisés.

Caractéristiques	**Ordinateur 1**	**Ordinateur 2**
Mémoire (RAM)	4096MB	4.00GO
Système d'exploitation	Windows 7	Windows 7
Type de système	64 Bits	64 Bits

3.2.2. Logiciels utilisés :

- **Protein Data Bankou PDB :**

Est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) de macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN**(3)**. **(Figure 3.1)**

Figure 3.1 – Interface du site Protein Data Bank (PDB).

➢ **ChemDraw Ultra 12.0 :**

Le dessin de formules chimiques et de schémas réactionnels est une tâche répétitive pour les chimistes à tous les niveaux de leur formation. Bien que le croquis la main soit utilisé le plus efficacement pendant les discussions et l'apprentissage, des dessins soignés sont nécessaires pour les rapports officiels, les publications et les thèses .de tels dessins peuvent être créées avec plusieurs programmes et un exemple est ChemDraw.

ChemDraw est un programme simple à utiliser qui permet de dessiner intuitivement de efficacement des représentations bidimensionnelles simples de molécules organiques. Il est disponible pour le PC Ainsi que pour la plate formeMac**(4).**Figure 3.2 – Interface du logiciel ChemDraw.

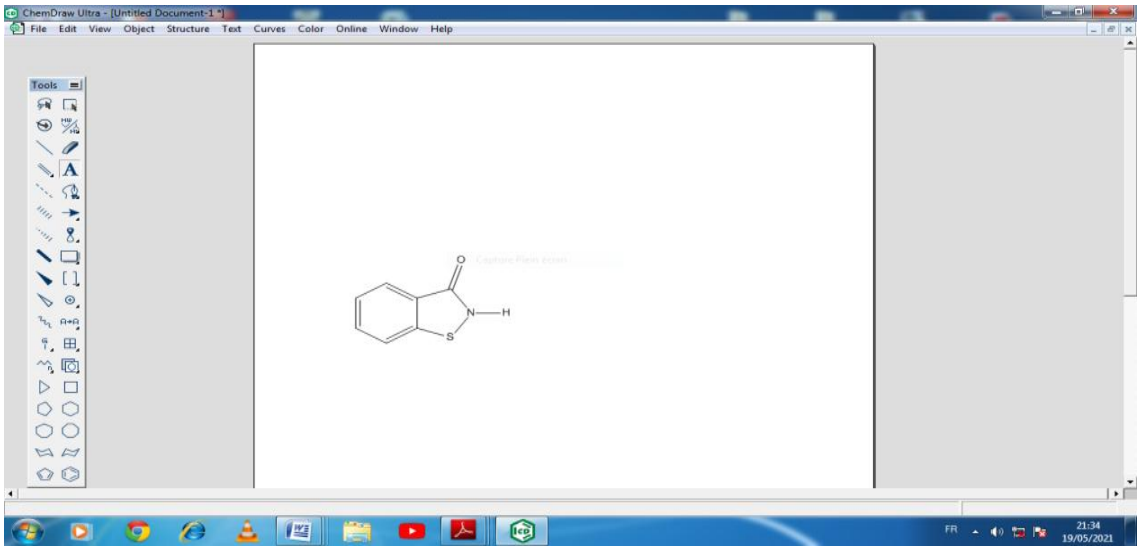


Figure 3.2 – Interface du logiciel ChemDraw.

➢ **MOE (Molecular Operating Environment)** :

MOE est un package, c'est-à-dire un ensemble de plusieurs logiciels destinés à la découverte et la conception assistée par ordinateur des molécules biologiquement actives. Celui-ci permet d'effectuer plusieurs tâches pendant un temps très réduit. Permet de dessiner les particules pour les réduire afin d'obtenir la meilleure correspondance pour ces particules. Il permet également de docker plusieurs ligands rassemblés dans une base de données dans le site actif d'une protéine de manière successive. MOE présente une forme de Docking flexible dans lequel le récepteur et le ligand change de conformation et s'adaptent à l'environnement **(5)**. La Figure 3.3montre l'interface graphique du logiciel MOE.

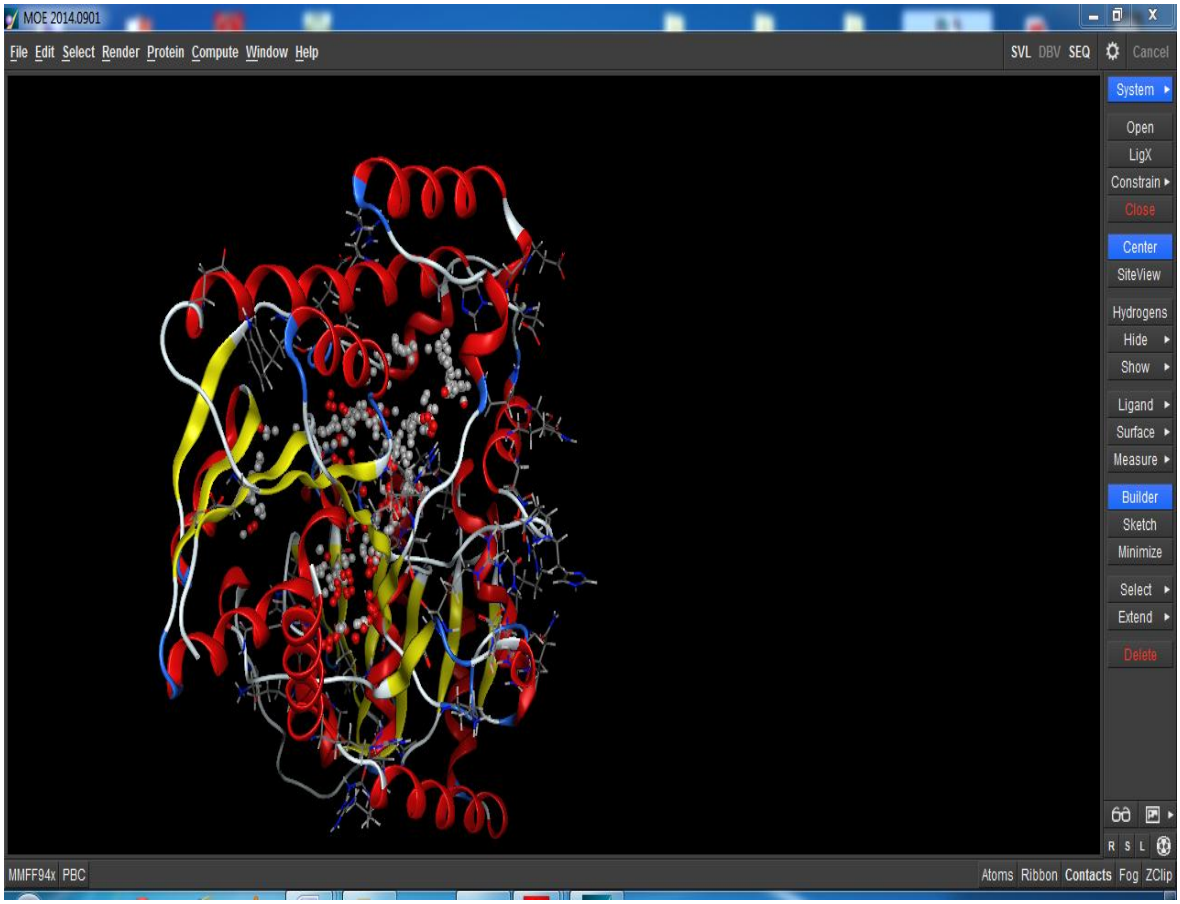


Figure 3.3-Interface du logiciel MOE.

Discovery studiole visualiser Discovery Studio est un visualiseur gratuit qui peut être utilisé pour ouvrir des données générées par d'autres logiciels de la gamme de produits Discovery Studio. Il est conçu pour offrir un environnement interactif permettant de visualiser et d'éditer des structures moléculaires, des séquences, des données de réflexion des rayons X, des scripts et d'autres données.

3.3. Le Protocole D'étude :

Un schéma montrant les étapes que nous avons suivies dans notre étude (**Figure 3.4**)

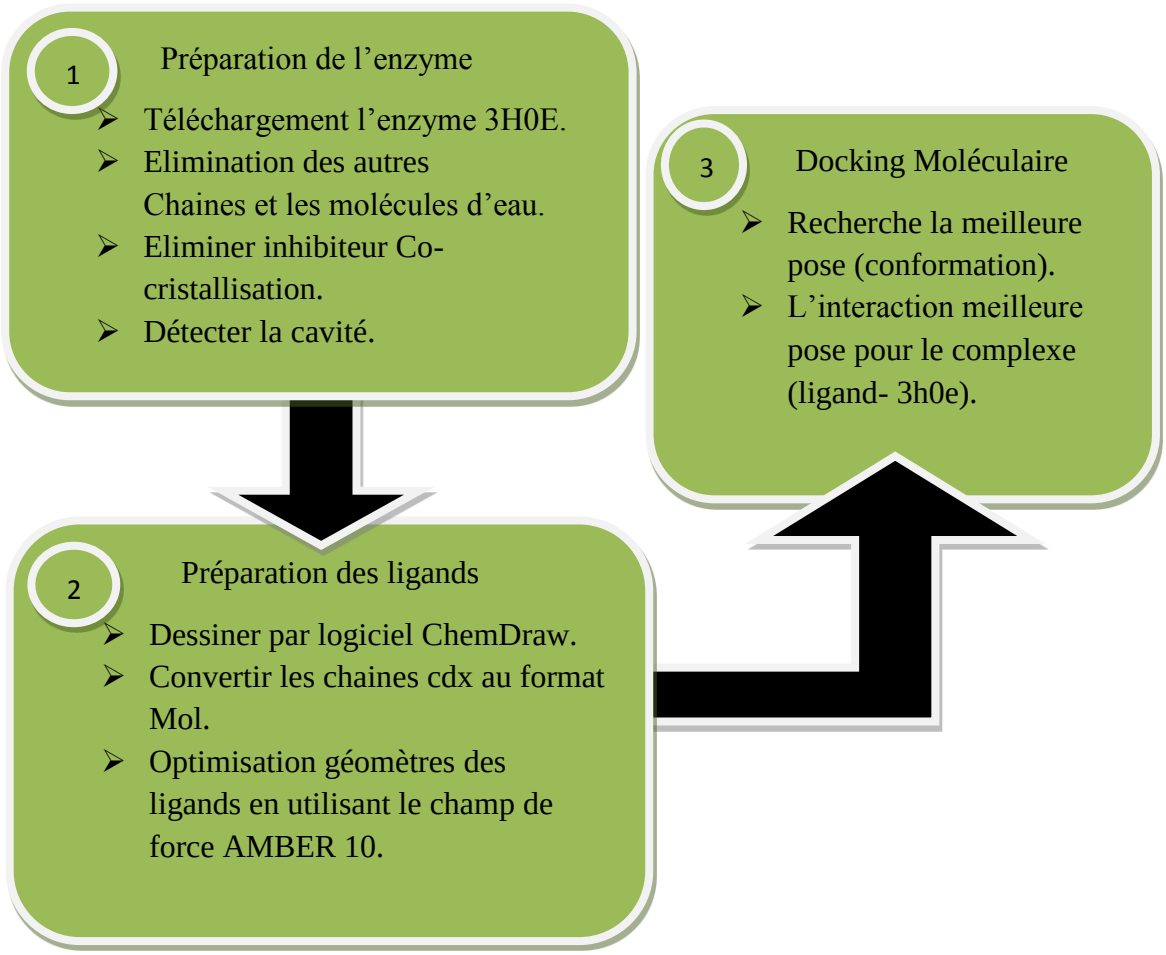


Figure 3.4 –Protocole d'étude.

3.3.1 Préparation de récepteur :

L'enzyme utilisée dans cette partie est3H0E cette dernière a été téléchargé sous forme PDB via banque de la protéine (http://www.pdb.org).

Co-cristallisée avecl'inhibiteur10S)-3,3-dimethyl-8-{[(2S)-2-(phenoxymethyl) pyrrolidin-1-yl**]** sulfonyl}-2, 3, 4,10-tetrahydropyrimido [1,2-a]indol-10-olH0Ede la formule C_{24} H_{29} N_3 O_4 S avec une résolution égale à 2 Å.

Après le téléchargement nous avons éliminé les molécules d'eau, Cofacteur et ligands. Cette étape, Nous permet d'obtenir un modèle simplifié de l'enzyme. La structure de l'enzyme ainsi que ses propriétés sont données dans **la figure** ci-dessous.

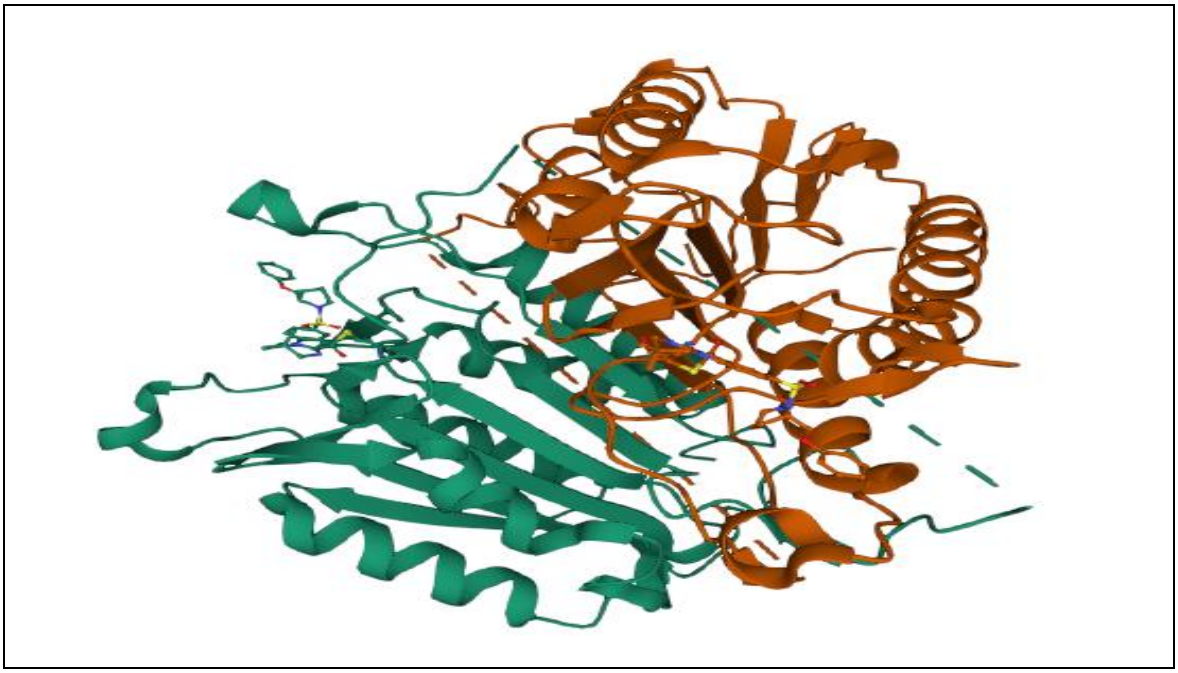


Figure 3.5-Structure de l'enzyme 3H0E (www.rcsb.org/pdb).

Experimental Data

Method: X-RAY DIFFRACTION
Resolution: 2.00 Å
R-Value Free: 0.200
R-Value Work: 0.177
R-Value Observed: 0.178
Space Group: C 1 2 1

Unit Cell:

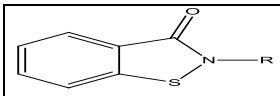
Length (Å)	Angle (°)
a = 125.739	α = 90
b = 69.94	β = 130.08
c = 88.797	γ = 90

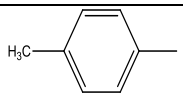
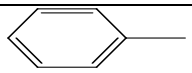
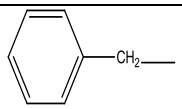
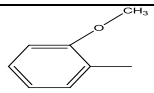
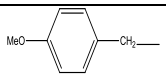
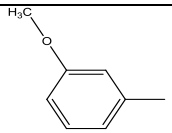
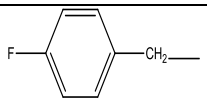
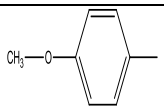
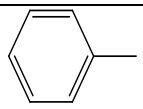
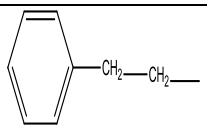
Figure3.6- Les données cristallographiques de l'enzyme.

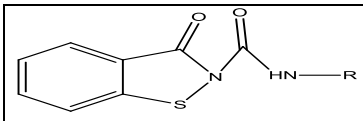
3.3.2 Préparation des ligands :

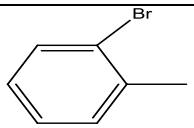
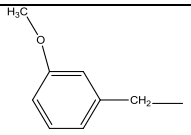
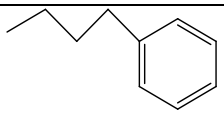
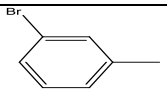
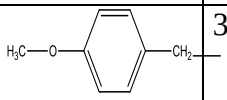
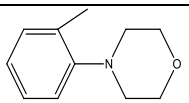
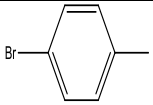
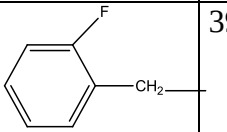
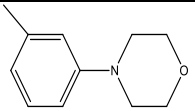
Les ligands qu'on a étudiés sont des dérivés de 1,2-benzisothiazol-3-one, qui sont Considérés comme inhibiteurs de Caspase -3, ces inhibiteurs sont dessinés en utilisant le site ChemDraw. L'optimisation de la géométrie des ligands par le logiciel MOE en utilisant le champ de force Amber 10. Elles sont représentées dans le tableau vers le bas.

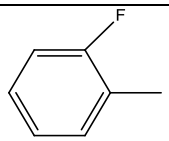
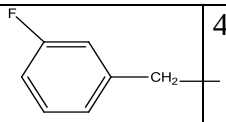
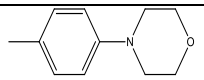
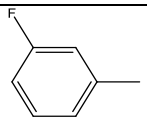
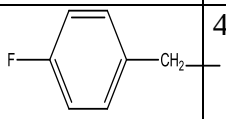
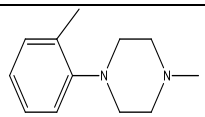
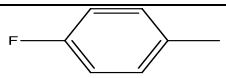
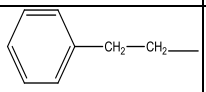
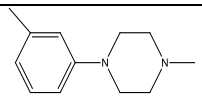
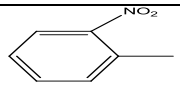
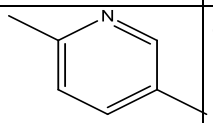
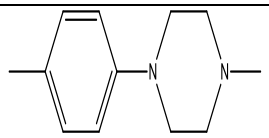
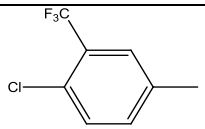
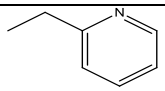
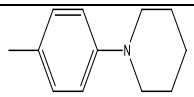
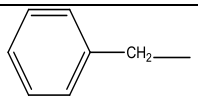
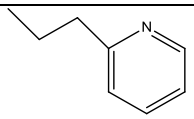
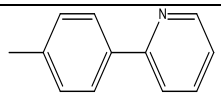
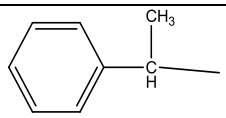
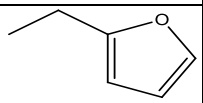
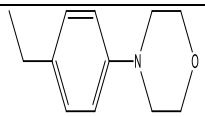
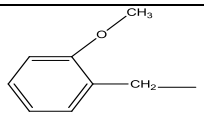
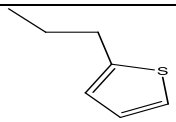
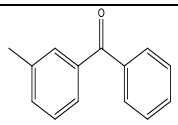
Tableau3.2-Structures chimiques des ligands.

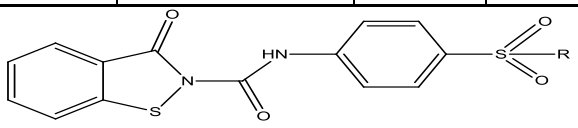


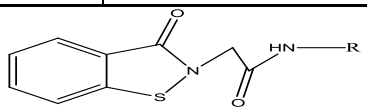
Composé	R	Composé	R	Composé	R
1	H	6		11	
2	CH3-	7		12	
3	CH3CH2-	8		13	
4	CH2=CHCH2-	9		14	
5		10			

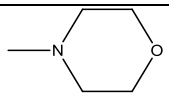
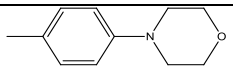
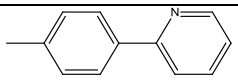
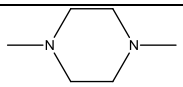
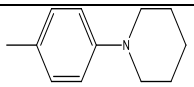
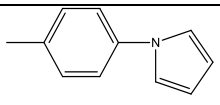


Composé	R	composé	R	composé	R
15		26		37	
16		27		38	
17		28		39	

18		29		40	
19		30		41	
20		31		42	
21		32		43	
22		33		44	
23		34		45	
24		35		46	
25		36		47	





Composé	R	Composé	R	Composé	R
48		50		52	
49		51		53	

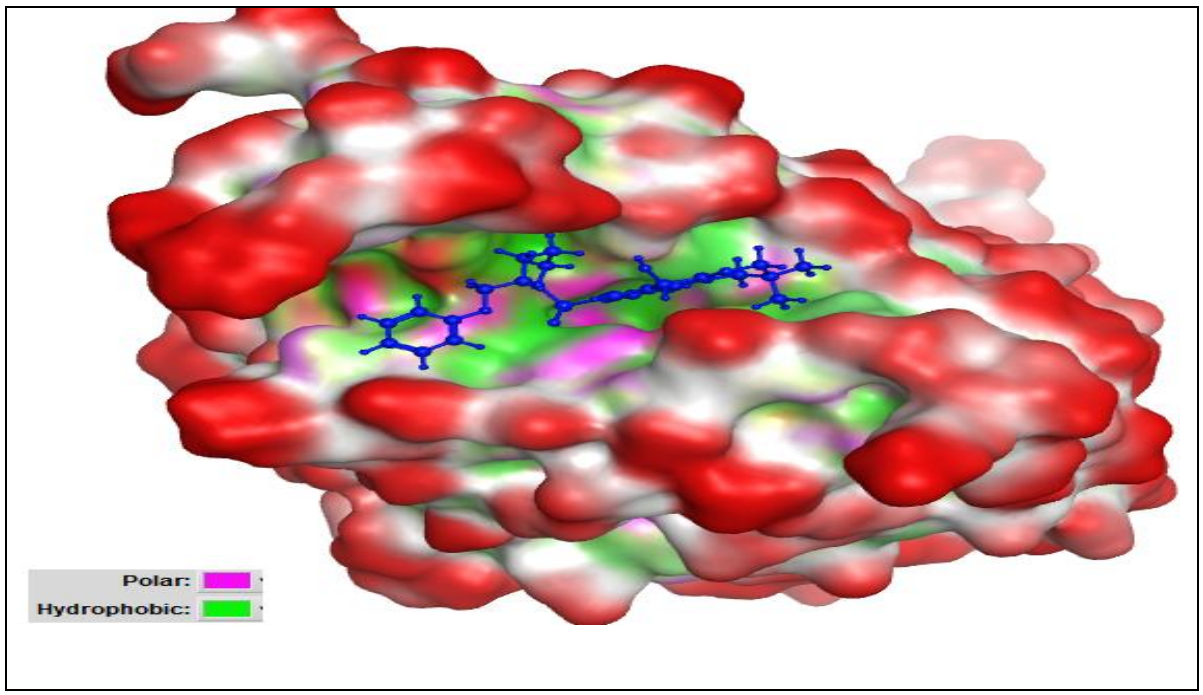
3.3.3 Détection des cavités :

L'identification des sites actifs est d'une grande importance pour comprendre la fonction d'une protéine et le mécanisme des interactions. Il existe un certain nombre de cavités ou de poches à la surface des protéines où se lient de petites molécules. Par conséquent, l'identification de telles cavités est souvent le point de départ de la prédiction du site de liaison protéine-ligand pour l'annotation de la fonction protéique et la conception de médicaments basée sur la structure. La détection correcte du site actif du ligand est une condition préalable à l'amarrage de protéine-ligand et au criblage virtuel à haut débit pour identifier les médicaments candidats dans les processus de découverte de médicaments **(6).** Quatorze cavités ont été détectées dans l'enzyme 3H0E par logiciel MOE.

Tableau 3.3-Les volumes des différentes cavités.

Cavités	Volume Å ^{3}	Cavités	Volume Å 3
Cavité 1	58	Cavité 8	9
Cavité 2	35	Cavité 9	12
Cavité 3	12	Cavité 10	12
Cavité 4	24	Cavité 11	16
Cavité 5	11	Cavité 12	6
Cavité 6	13	Cavité 13	6
Cavité 7	7	Cavité 14	3

Nous avons choisi la cavité 1 **(Figure 3.7**), dans laquelle on réalise le Docking moléculaire. Cette cavité couvre le ligand de référence (Co-cristalliser) et aussi possède un volume important par rapport aux autres cavités.



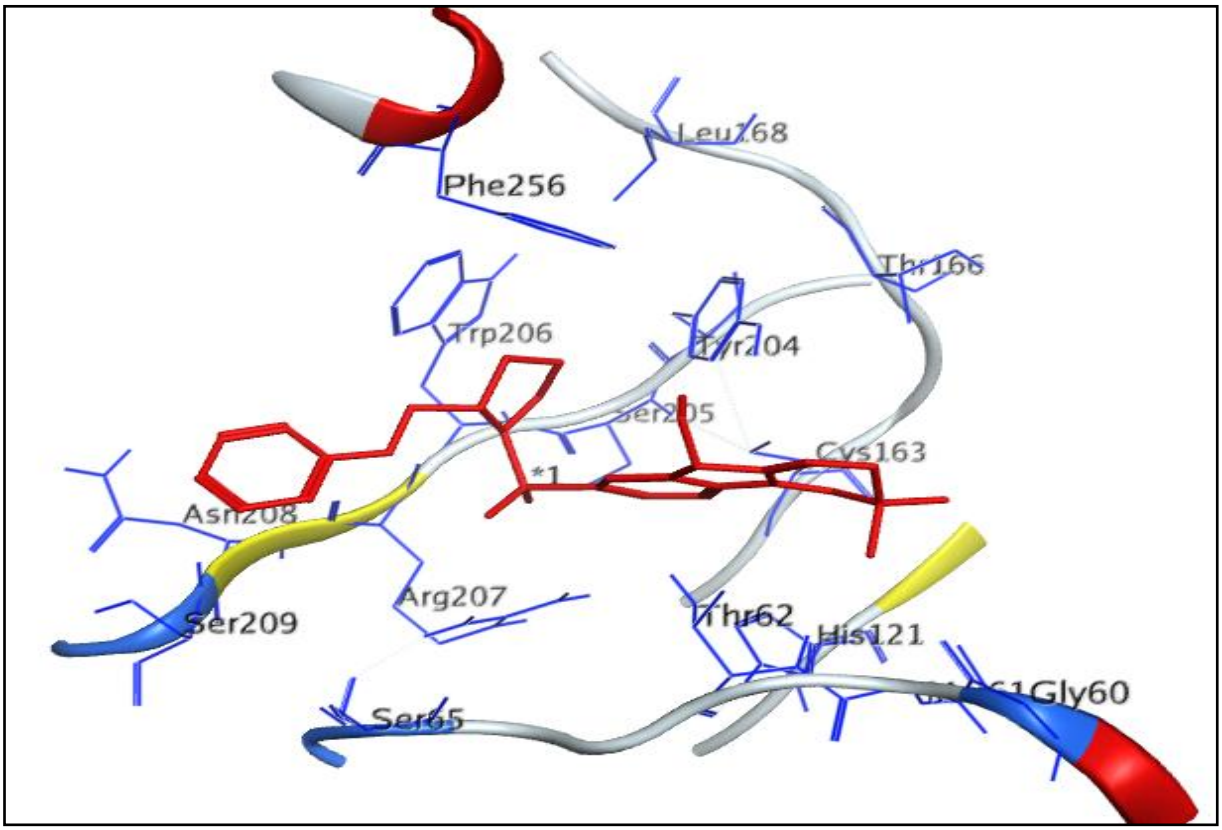


Figure 3.7 –Cavité1 de l'enzyme 3H0E.

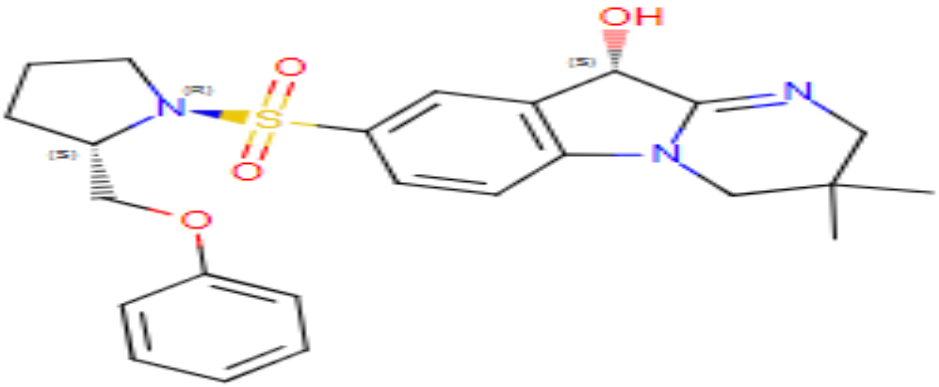


Figure 3.8 – Structure chimique de ligand référence.

Tableau 3.4 -Présente les déférentes propriétés de la cavité N˚1.

Cavité	Volume	Hyd	Résidus
1	**58**	**17**	THR62 ARG64 SER120 HIS121 GLY122 GLN161 ALA162 CYS163 TYR204 SER205 TRP206 ARG207 PHE256

3.3.4. Etude de Docking moléculaire :

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

Ainsi, le Docking de chaque ligand généré un ensemble de modes de liaison appelés «**poses**» pour lesquelles un score est calculé. Ce score est une approximation de l'énergie de liaison du complexe (Kcal/mol) et donc plus il est négatif meilleurs est l'affinité prédite. Le ligand Co cristallisé représente alors souvent la référence idéale **(7).**

3.4. Résultats :

Le Docking moléculaire a été effectué à l'aide de l'outil Moe. Tous les 53 composes ont été proposés pour se lier avec Caspase3 dans la poche active. Sur la base de la conformation de liaison, Moe a généré des énergies pour toutes les molécules. Nous avons sélectionné les cinq meilleurs composés sur la base des meilleures énergies et effectué des interactions caspase3 -inhibiteurs. Nous avons illustré, les énergies, les acides aminés en interaction et le nombre de liaisons hydrogène de six composés (**tableau 3.5**).

Tableau3.5 - Résultats énergétiques de Docking moléculaire.

N° Des ligands	S-score (kcal mol)	N° Des ligands	S-score (kcal mol)
L1	-3.54	L28	-5.21
L2	-3.31	L29	-4.87
L3	-3.86	L30	-5.09
L4	-4.36	L31	-5.35
L5	-4.35	L32	-4.74
L6	-4.41	L33	-5.18
L7	-4.60	L34	-5.05
L8	-4.77	L35	-4.84
L9	-4.62	L36	-5.37
L10	-4.64	L37	-5.17
L11	-4.31	L38	-5.35
L12	-4.72	L39	-5.34
L13	-4.96	L40	-5.28
L14	-4.59	L41	-5.14
L15	-5.15	**L42**	**-5.58**
L16	-4.98	L43	-5.37
L17	-5.03	L44	-5.14
L18	-4.92	L45	-5.31
L19	-5.02	L46	-5.23
L20	-4.54	**L47**	**-5.70**
L21	-5.42	L48	-5.38
L22	-5.03	**L49**	**-5.83**
L23	-5.33	**L50**	**-6.30**
L24	-5.07	**L51**	**-5.78**
L25	-5.53	L52	-5.22
L26	-5.22	L53	-5.25
L27	-5.18	**Lréf**	**-5.51**

A. Étude des interactions enzyme-ligand de référence :

Les résultats montrent que le ligand de référence se caractérise par un score-5.51kcal/mol. Il établit trois liaisons est de type H-pi qui est formée entre C30 et le noyau benzoïque du ligand et le résidu TRP206 et TYR204 et SER209 avec la distance 4.24Ået 4.29Å et 4.47Å (**Figure 3.6).**

Tableau3.6–Résultats des interactions entre les meilleurs ligands et les résidus de site actif de 3H0E.

Ligand	Receptor	Interaction	Distance	E (kcal/mol)
C 30	6-ring TRP 206 (A)	H-pi	4.24	-0.9
6-ring	CE1 TYR 204 (A)	pi-H	4.29	-0.8
6-ring	N SER 209 (A)	pi-H	4.47	-1.6

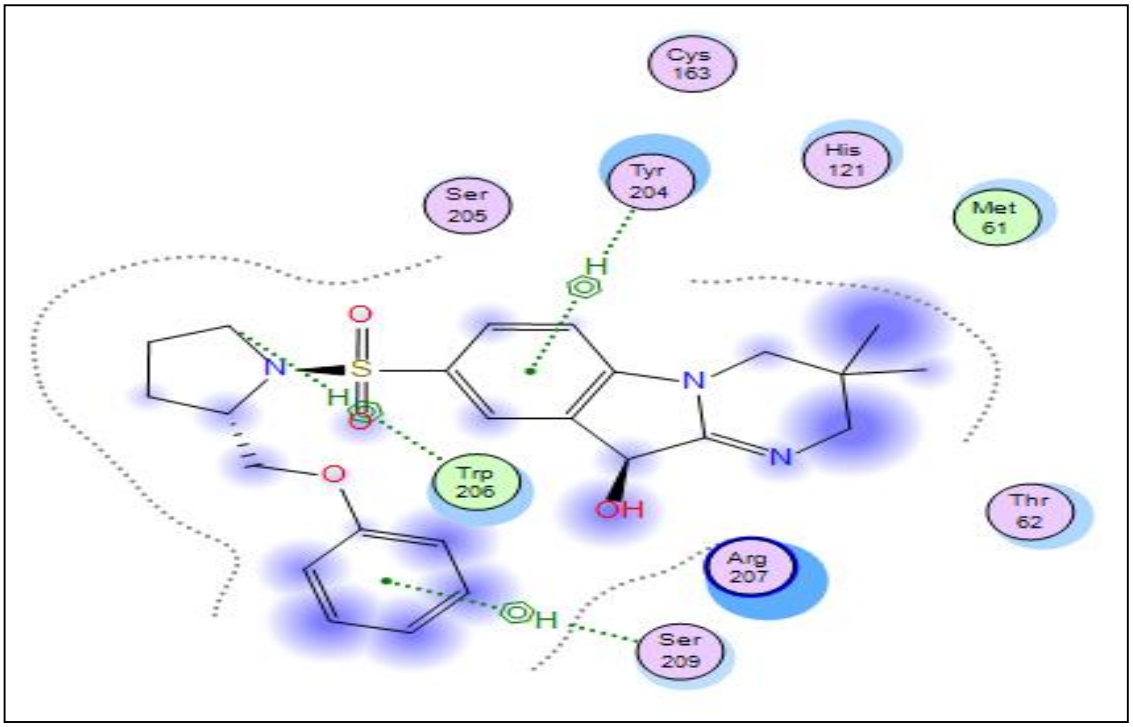


Figure 3.9 –Interaction entre Lréf et les résidus du site actif de3H0E.

B. Étude des interactions enzyme-ligand :

Cette recherche a été menée sur les six meilleurs ligands **(L50, L49, L51, L47, L42, L25)** Les résultats de l'interaction entre ces ligands et l'enzyme 3H0E sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau3.7–Résultats de Docking moléculaire et analyse des interactions pour les composés identifiés.

Inhibiteur	Le nom de composé	Hydrogène Bonds	Hydrophobique	Autre bond	S (kcal/mol)
50	N-(4-((4-morpholinophenyl) sulfonyl)phenyl)-3-oxohexahydrobenzo [d]isothiazol-2(3H)-carboxamide	THR62 ARG207 PHE250	MET61 HIS121	TYR204 ARG207	-6.30
49	N-(4-((4-methylpiperazin-1-yl)sulfonyl)phenyl)-3-oxohexahydrobenzo [d]isothiqwol-2(3H)-carboxamide	ARG207 TYR204 GLY122 HIS121	HIS121	CYS163 GLU123	-5.8399
51	2-(3-oxohexahydrobenzo [d] Isothiazol-2(3H)-yl)-N-(4-piperidin-1-yl)acetamide	ARG207	TYR204 TRP206	///////	-5.78
47	N-(3-benzoylphenyl)-3-oxobenzo[d]isothiazol-2(3H)-carboxamide	PHE252 SER251 ARG207	PHE250 TYR204	ARG207	-5.70
42	3-oxo-N-(4-(m-tolyl)piperazin-1-yl) benzo[d]isothiazol-2(3H)-carboxamide	ARG207 TYR204	HIS121 CYS163	//////	-5.58
25	N-(2-methoxybenzy)-3-oxobenzo[d]isothiazol-2(3H)-carboxamide	SER205 ARG207 HIS121	TRP206 PHE256 TYR204 CYS163 HIS121	///////	-5.53

1) Interactions3H0E–L50 :(Figure 3.10)

Le Complexe (**3H0E–L50)** se caractérise par un score -6.30kcal/mol. Montrer l'existence de trois type de liaison, savoir Les liaisons sont de type liaison H, formées entre les atomes d'oxygène des groupes carbonyle de ligand et les résidus ARG207, Thréonine62 et Phénylanine250.Les autres liaisons sont de type hydrophobique entre cycle hexane et le résidu MET61 et HIS121.Et autres bond type pi- sulfur avec l'atome S et les résidus TYR204 et ARG207.

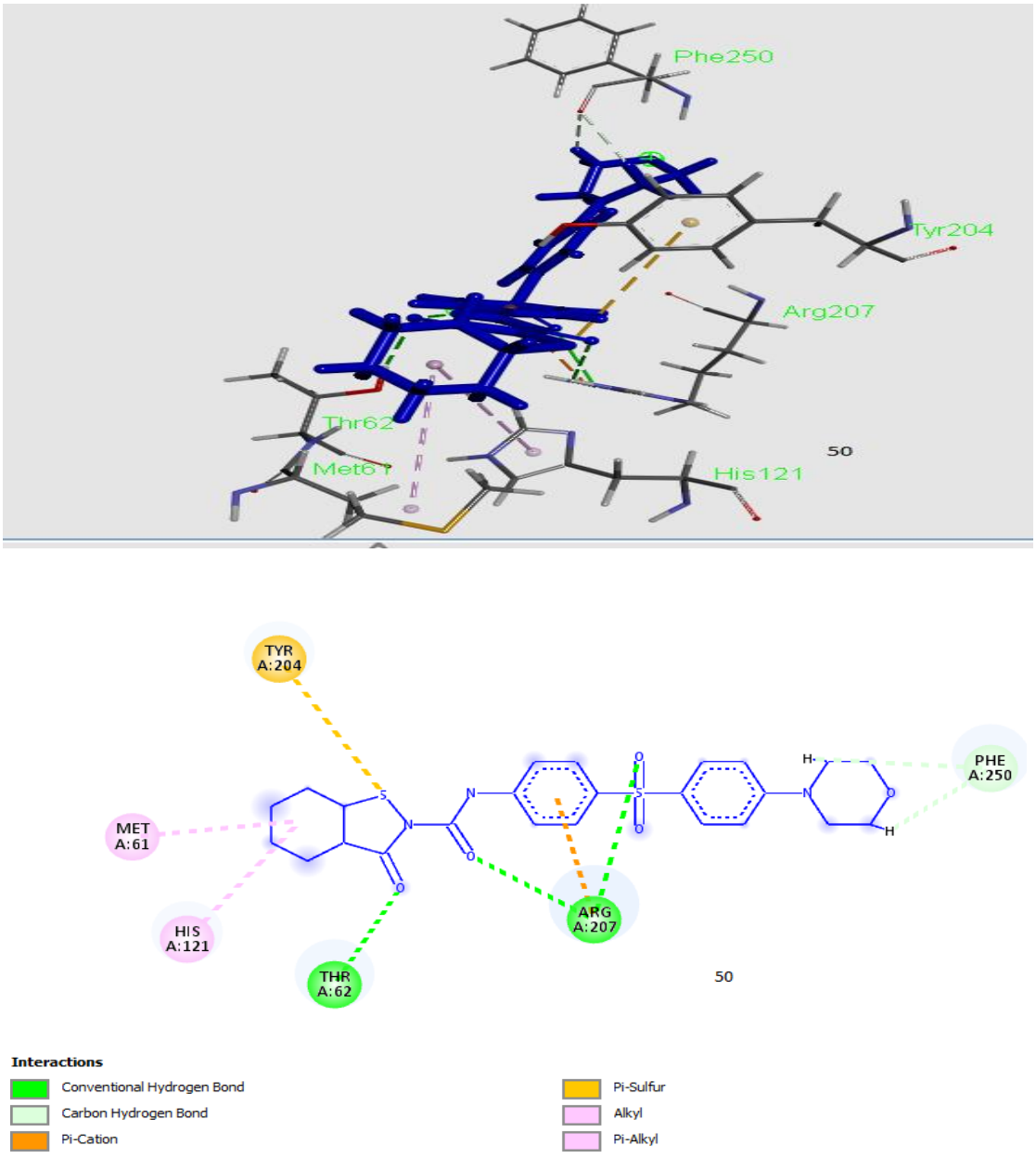


Figure 3.10-Interactions entre le ligand 50et les résidus de site actif de 3H0E.

2) Interactions 3H0E–L49 :(Figure 3.11)

Le ligand L49 forme trois interactions avec les résidus de site actif, la première de type H-bond (entre les atomes O et H et le résidu ARG207et TYR204 et GLY122 et Histidine121), la deuxième de type Hydrophobique (entre le noyau benzoïque et le résiduHIS121), et autre type (entre le noyau benzoïque et H et le résidu CYS163 et GLU123).

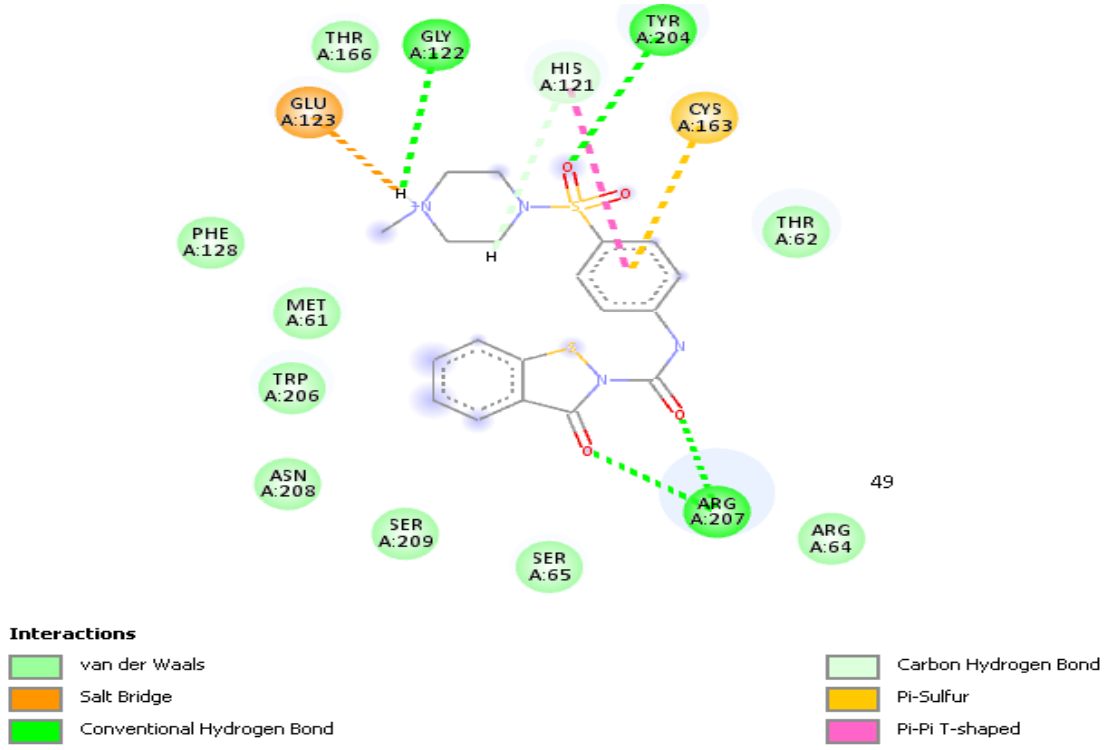


Figure3.11 –Interactions entre le ligand 49 et les résidus de site actif de 3H0E.

3) Interactions 3H0E–L51 :(Figure 3.12)

On observe que le complexe formé par ligand L51a une faible énergie de Score (-5.78Kcal/mol) et forme interactions avec les résidus de site actif, la première de type H-bond (entre l'atome O et le résidu ARG207), la deuxième de type Hydrophobique (entre le noyau benzoïque et cycle hexane et le résidu TYR204 et TRP206).

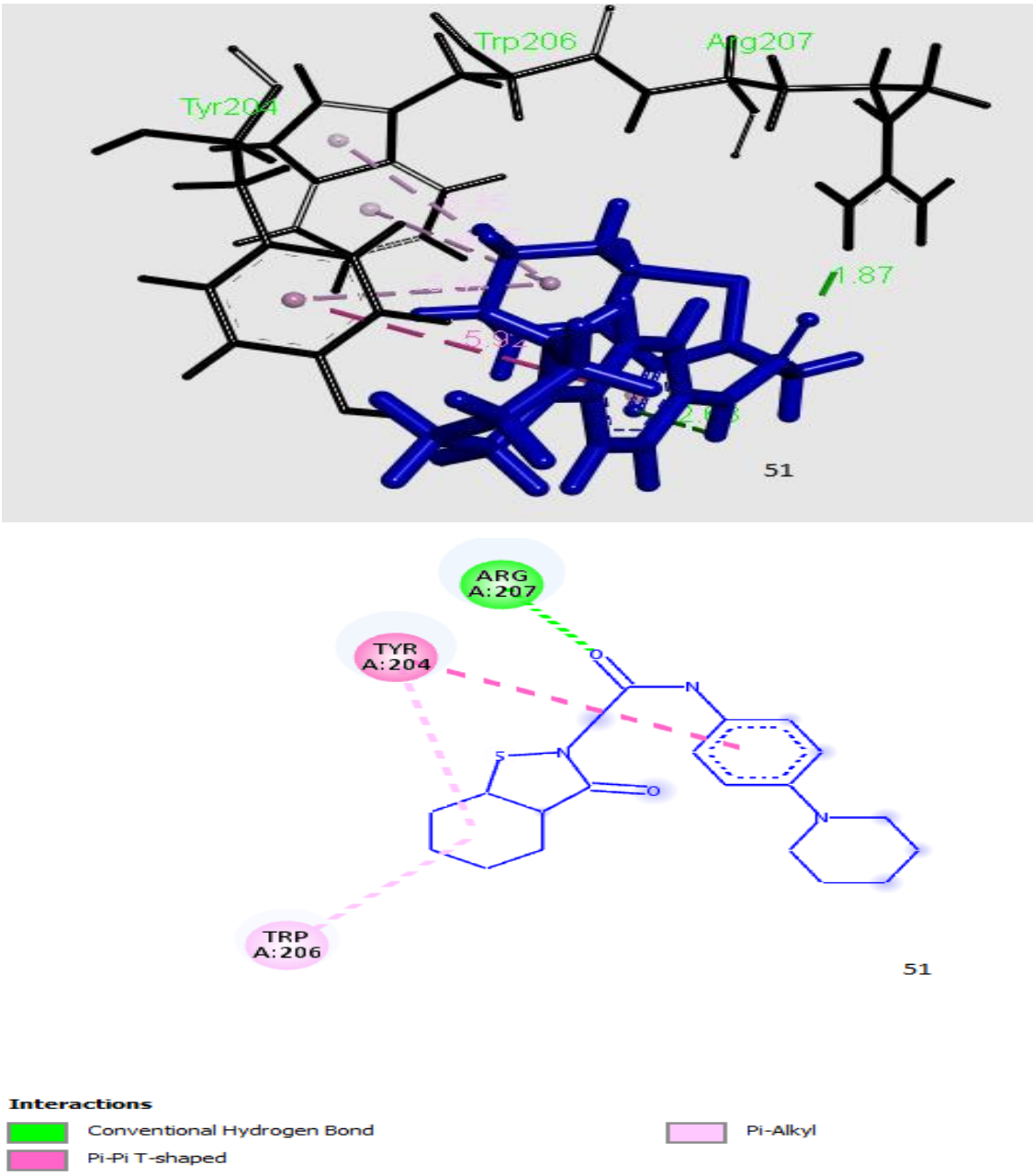


Figure3.12 –Interactions entre le ligand 51 et les résidus de site actif de 3H0E.

4) Interactions3H0E–L47 :(Figure 3.13)

Le ligand L47forme trois interactions avec les résidus de site actif, la première de type H-bond (entre les atome O et le résidu PHE252 et SER251 et Arginine207), la deuxième de type Hydrophobique (entre le noyau benzoïque et le résiduTYP204 et PHE250 et PHE252), et autre type (entre le noyau benzoïque et le résidu ARG207).

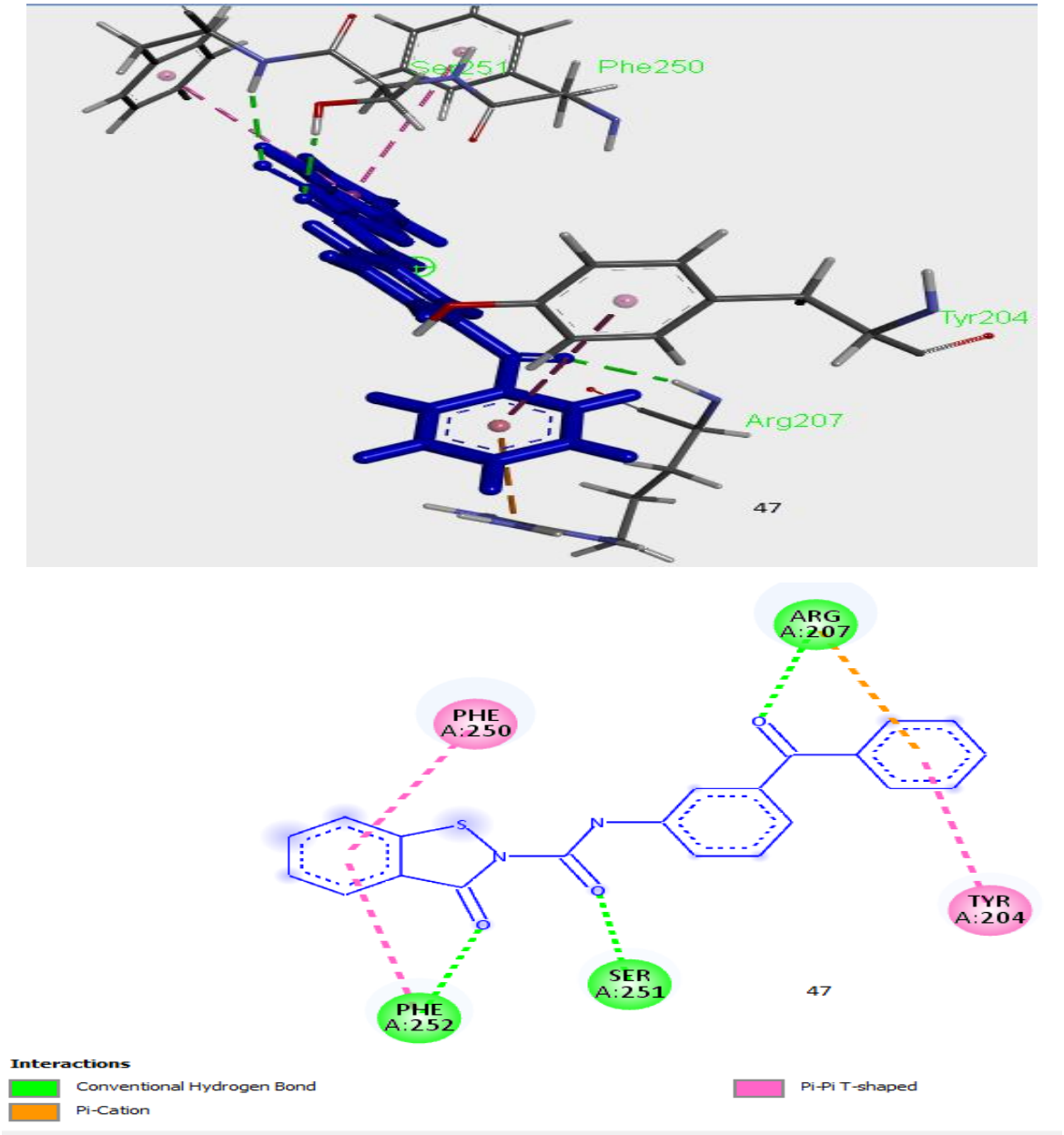
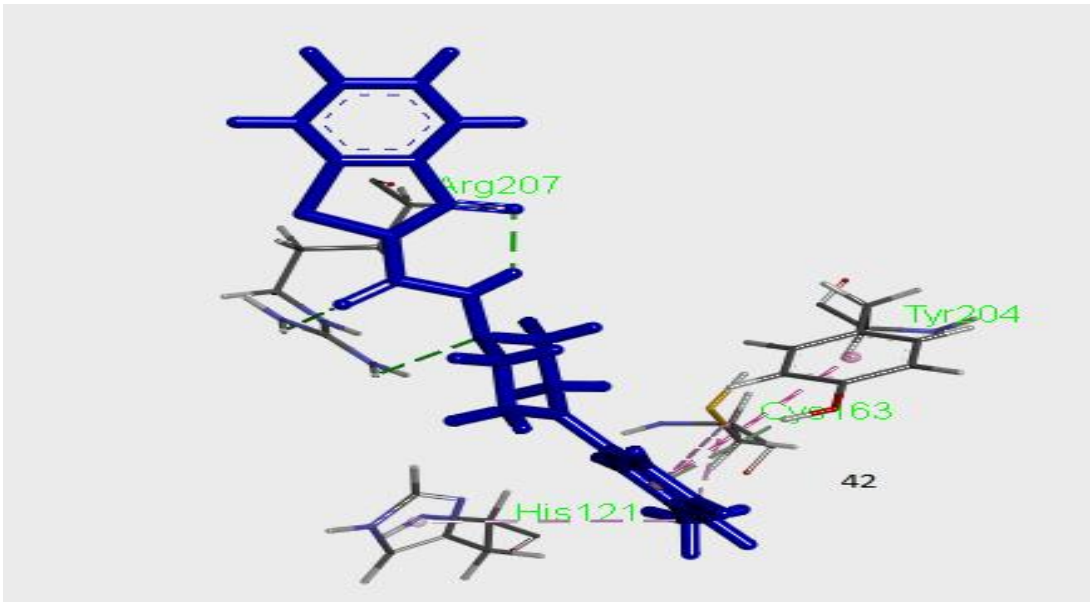


Figure 3.13–Interactions entre le ligand 47 et les résidus de site actif de 3H0E.

5) **Interactions3H0E–L42 :(Figure 3.14)**

Le ligand L42 forme deux interactions avec le résidu de site actif, de type H-bond (entre l'atome O et N et le résidu), et de type hydrophobique (entre le noyau benzoïque et C et le résidu CYS163 et HIS121).



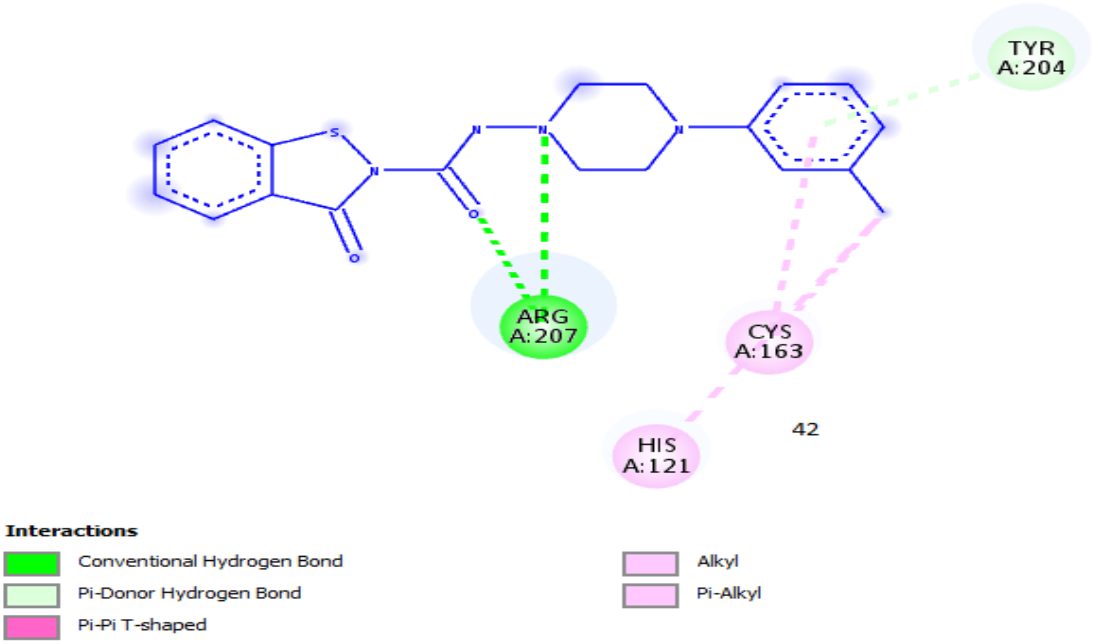


Figure3.14- Interactions entre le ligand 42et les résidus de site actif de 3H0E.

6) Interactions3H0E–L25 :(Figure 3.15)

le ligand L25 forme les interactions avec les résidus de site actif, de type H-bond (entre l'atome O et H et le résiduSER205 ARG207 et HIS121), et de type hydrophobique (entre le noyau benzoïque et cycle et C le résidu PHE256 et TRP206 et CYS163 et TYR 204).

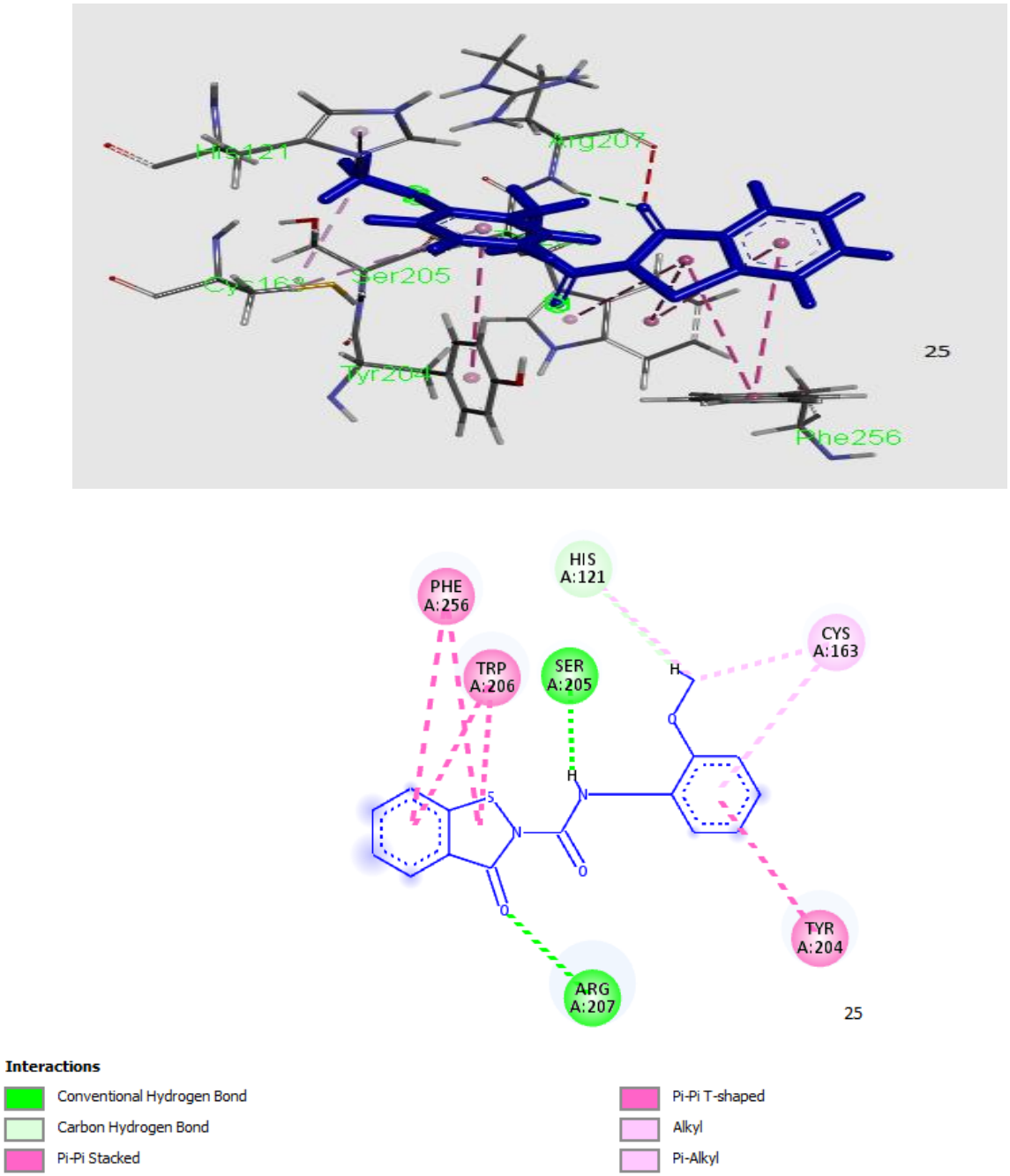


Figure 3.15- Interactions entre le ligand 25 et les résidus de site actif de 3H0E.

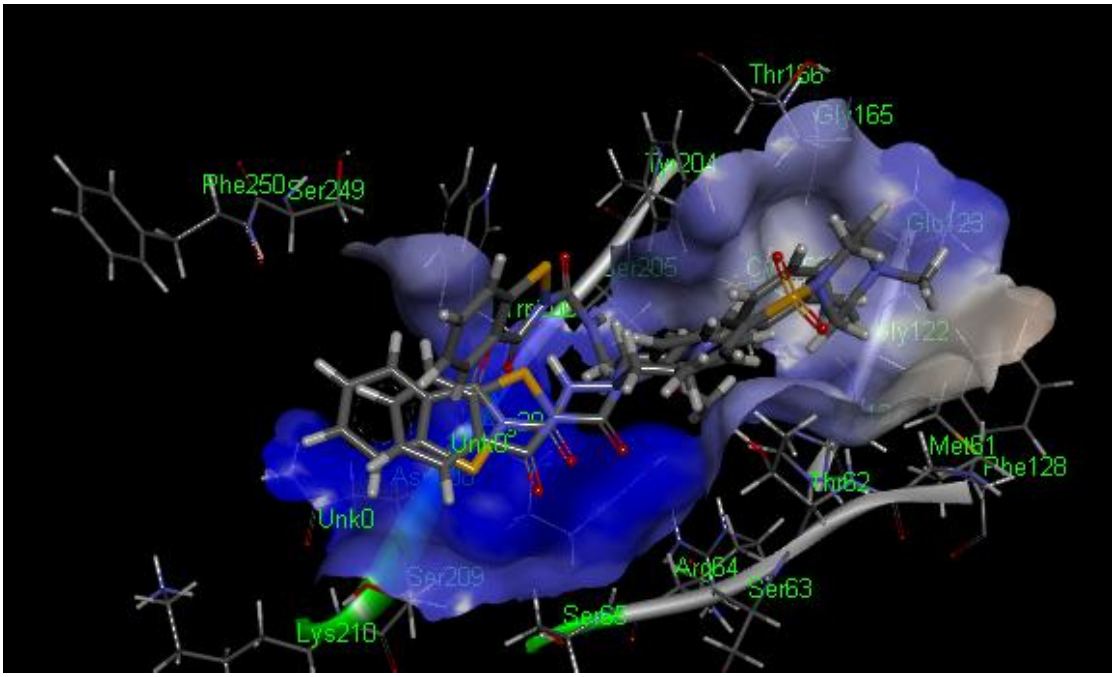


Figure 3.16 –Orientation des ligands dans le site active.

3.5. Discussion :

L'orientation proposée de chacun de ces composés était donc très similaire à celle du ligand de référence dans la protéine Caspas3. **Voir la figure 3.16**.

Notre analyse a révélé la présence de diverses interactions intermoléculaires telles que des contacts hydrophobes, π•••π, cation•••π, et liaisons hydrogène dans les complexes. Globalement, la poche de Caspase-3 dans chaque monomère peut être considérée comme ayant une région intérieure hydrophobe et une région polaire extérieure. La région hydrophobe comprend TYR204, CYS163, PHE256′ et MET61 tandis que la région polaire comprend GLU146, HIS121, GLU147, ARG207.

Les quatre composés présentant un top score ont un aromatique fragment qui forment tous une interaction avec TYR204. Les conformations des trois autres composés montrent la présence d'une interaction h-bond avec ARG207 suggérant qu'une capacité à engager ARG207 pourrait être cruciale pour effectuer l'inhibition de la Capase-3.

Bien que la conformation ancrée du ligand de référence ne forme pas l'interaction h-bond avec ARG207, elle forme pi-H interaction avec SER209, ce qui pourrait à son tour stabiliser son interaction avec la Caspase-3.

Réference Bibliographique :

(1) **(1)**MELLEAttaf Dalila., Résolution du Docking moléculaire le prototype API-Dock.

(2) **(2)** Krid Y. Conception in silico de nouveaux flavonols inhibant potentiellement L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine pour le traitement de l'hypertension Artérielle. Mémoire de Master en Biochimie Moléculaire et Santé, Université des Frères Mentouri, Constantine.Algérie. 2013. 51 p.

(3) **(3)** Protein Data Bank (PDB). Biological Macromolecular Resource. [En ligne] http://www.pdb.org/pdb/home. Consulté le [25-04-2018].

(4) **(4)** IEC107- introduction to Computing for pharmacy.

(5) **(5)** Molecular Operating Environment (MOE), 2015.10 ; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015.

(6) **(6)** Zhang, Z., et al, Identification of cavities on protein surface using multiple Computational approaches for drug binding site prediction. Bioinformatics, 2011. 27(15) : p. 2083-2088.

(7) **(7)** C.R. Corbeil, P. Englebienne, N. Moitessier. Docking Ligands Into Flexible and Solvated Macromolecules-1. Development and Validation of Fitted 1.0. Journal Of Chemical Informatic Modelling, 2007, 47, 435-449

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Notre travail de master avait pour but essentiel d'acquérir des compétences en simulation informatique, notamment le Docking moléculaire par « MOE » afin de contribuer au développement in silico de nouveaux inhibiteurs de la Caspase-3, inhibe la production de ROS et est nécessaire pour une exécution efficace de l'apoptose , il cible l'enzyme 3H0E.

Dans un premier temps, nous avons présenté la Caspase de façon générale.

Par ailleurs, dans une deuxième partie, nous avons abordés les principes fondamentaux de la méthode de Docking moléculaire.

Dans la troisième partie, nous avons présenté la partie la plus importante dans ce travail qui est le développement de protocole de Docking moléculaire par le logiciel MOE (version 2014) pour les inhibiteurs proposés.

Dans un premier lieu, nous avons conçu et préparer 53 composés, puis on a appliqué le Docking moléculaire sur ces inhibiteurs avec l'enzyme 3H0E, les résultats obtenus nous permet de déterminer les meilleurs complexes stables formés.

Nos études sont basées sur le calcul des énergies d'interactions, et les distances d'interaction entre les inhibiteurs et le récepteur.

Les résultats obtenus montrent que les Six ligands L50, L49, L51, L47, L42, et L25formant un complexe avec le récepteur 3H0E, et qui possèdent les plus petites énergies Score par rapport au ligand de référence (S=-5.51kcal/mol), ceci montre que ces complexes sont plus stables. On peut les classer selon l'ordre suivant : L50< L49< L51< L47< L42< L 25.

Notre analyse a révélé la présence de diverses interactions intermoléculaires telles que des contacts hydrophobes, π•••π, cation•••π, et liaisons hydrogène dans les complexes. Globalement, la poche de Caspase-3 dans chaque monomère peut être considérée comme ayant une région intérieure hydrophobe et une région polaire extérieure. La région hydrophobe comprend TYR204, CYS163, PHE256′ et MET61 tandis que la région polaire comprend GLU146, HIS121, GLU147, ARG207.

Les quatre composés présentant un top score ont un aromatique fragment qui forment tous une interaction avec TYR204. Les conformations des trois autres composés montrent la présence d'une interaction h-bond avec ARG207 suggérant qu'une capacité à engager ARG207 pourrait être cruciale pour effectuer l'inhibition de la Caspase-3.

Résumé :

Avec le développement des outils informatiques au cours des 20 dernières années, la modélisation moléculaire et l'amarrage moléculaire plus précis sont entrés très rapidement dans le domaine de la recherche sur les médicaments.

L'objectif de notre travail est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la Caspase-3 en utilisant Docking moléculaire pour simuler les interactions enzyme-inhibiteur. Nous nous basons spécifiquement sur deux paramètres : le score énergétique et la distance d'interaction entre le ligand et le résidu du site actif. L'analyse des résultats obtenus a montré que six composés dérivés 1, 2-benzisothiazole-3-one sont L25, L42, L47, L49, L50 et L51. Ils ont un meilleur effet inhibiteur, ce qui nous permet de les choisir ces derniers comme étant de nouveaux inhibiteurs potentiels de la Caspase3.

Mots clés : Docking moléculaire - Caspase-3-Le score-Les dérivés de 1, 2-benzisothiazole-3-one.

Abstract:

With the development of computer tools over the past 20 years, molecular modeling and more precise molecular docking have entered the realm of drug research very quickly. The objective of our work is to contribute to the development of novel caspase-3 inhibitors by using molecular docking to simulate enzyme-inhibitor interactions. We specifically base ourselves on two parameters: the score and the distance of interaction between the ligand and the residue of the active site. Analysis of the results obtained showed that six compounds are L25, L42, L47, L49, L50 and L51. They have a better inhibitory effect, which allows us to choose them as potential new inhibitors of caspase3.

Mos keys: Docking moléculaire - Caspase-3- the score- 1, 2-benzisothiazol-3-one Derivatives.