FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

FACULTES DES SCIENCES

Caractérisation structurale de la 5-lipoxygénase humaine et de son inhibition : support à la conception rationnelle d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2

Dissertation présentée par
CAROLINE CHARLIER
en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

Prof. J-P. Hénichart (Université de Lille 2, Lille, France)
Dr F. Moureau (UCB, Braine l'Alleud)
Prof. J-M. Dogné (FUNDP, Namur)
Prof. D. Vercauteren (FUNDP, Namur)
Prof. F. Durant (Co-promoteur, FUNDP, Namur)
Prof. J. Wouters (Promoteur, FUNDP, Namur)

2006

Presses universitaires de Namur & Caroline Charlier
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.
Imprimé en Belgique
ISBN-10: 2-87037-514-X
ISBN-13 : 978-2-87037-514-3
Dépôt légal: D / 2006 / 1881 / 7

Caractérisation structurale de la 5-lipoxygénase humaine et de son inhibition: support à la conception rationnelle d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2

par Caroline Charlier

Résumé

En bloquant les deux voies majeures de métabolisation de l'acide arachidonique, les inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 sont de puissants agents anti-inflammatoires non stéroïdiens minimisant les effets secondaires gastro-intestinaux et allergiques (asthme). Par ailleurs, ils offrent de nouvelles perspectives dans le traitement préventif de certains cancers. Contrairement à la COX-2, déjà largement étudiée, le niveau de connaissances concernant la 5-LOX humaine est beaucoup plus restreint. Notre objectif a donc été de caractériser sa structure ainsi que son mode d'interaction avec des inhibiteurs de type non redox, dans le but d'aider à la conception rationnelle d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2. Dans un premier temps, la comparaison d'inhibiteurs 5-LOX non redox de la littérature a permis de mettre en évidence un modèle de pharmacophore à 5 points. Par ailleurs, la structure 3D de la 5-LOX humaine n'étant pas encore déterminée, nous l'avons modélisée par homologie avec la 15-LOX de lapin cristallisée et nous avons étudié, par *docking*, le mode d'interaction d'inhibiteurs 5-LOX non redox au sein du site actif. La combinaison des approches centrées, respectivement, sur les ligands et sur la protéine, nous a permis d'affiner l'hypothèse de pharmacophore et de proposer un modèle général d'interaction au sein du site actif 5-LOX.

Structural characterization of human 5-lipoxygenase and its inhibition: support to the rational design of dual 5-LOX/COX-2 inhibitors

by Caroline Charlier

Abstract

Dual 5-LOX/COX-2 inhibitors, acting on both major arachidonic acid metabolic pathways, are potent non-steroidal anti-inflammatory agents, with a reduced gastro-intestinal toxicity and fewer allergic adverse reactions. Moreover, they are promising in the treatment of several cancers. Whereas COX-2 has already been extensively studied, little structural or mechanistic information is available regarding human 5-LOX. Therefore, we focussed on this enzyme and characterized its 3D structure as well as its interaction with non redox inhibitors in order to help the design of dual 5-LOX/COX-2 inhibitors. Firstly, comparison of non redox 5-LOX inhibitors from the literature led to the generation of a five-point pharmacophore model. The 3D structure of human 5-LOX was then modelled based on the crystal structure of rabbit 15-LOX and, the binding modes of representative ligands were investigated through docking studies. Combination of both ligand-based and target-based approaches allowed the refinement of the pharmacophore hypothesis and led to the proposal of an interaction model for non redox inhibitors inside the 5-LOX active site.

Dissertation doctorale en Sciences Chimiques (Ph.D. thesis in Chemistry)
15 Février 2006 (February 15th, 2006)
Laboratoire de Chimie Biologique Structurale (Prof. J. Wouters)
Promoteur (Advisor): Prof. J. Wouters

Remerciements

Nous y voilà !! C'est déjà le terme d'un beau voyage qui a débuté il y a un peu plus de quatre ans… Un beau voyage rempli de rencontres enrichissantes, enthousiasmantes, de joies et de satisfaction, de périodes de doutes aussi… Un beau voyage qui m'a permis de grandir et de m'épanouir…

Je voudrais remercier ici toutes les personnes qui m'ont accompagnées tout au long de ces années et qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce travail… et en particulier…

Le professeur François Durant qui, dès mon mémoire, m'a chaleureusement accueillie au sein de son laboratoire. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère. Vos grandes qualités humaines et didactiques sont un exemple pour moi…

Le professeur Johan Wouters qui a donné un second souffle à mon doctorat et m'a permis de mener à bien ce travail. Merci pour tes conseils, tes nombreux encouragements et ton enthousiasme. Tu m'as appris l'esprit critique et de synthèse, transmis le goût pour la recherche pluridisciplinaire. De par la confiance que tu m'as accordée, tu m'as permis de m'investir dans de nouveaux projets. Merci pour la visite guidée du synchrotron !

Le docteur Florence Moureau et les professeurs Jean-Michel Dogné, Jean-Pierre Hénichart et Daniel Vercauteren. Je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir jeté un regard critique et constructif sur mon travail…

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance au Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) pour le soutien financier qu'il m'a accordé durant ces années de doctorat…

Merci à Madame Yamina Oudjama (du CERIA) pour ses conseils et son aide lors de la purification de la 5-LOX (tout ça dans la bonne humeur !) et à Monsieur Christophe Lambert pour sa grande disponibilité (heureusement que Mahler n'a pas de secret pour toi !)…

Un merci tout particulier à Madame Bernadette Norberg, non seulement pour votre aide précieuse dans la résolution des structures cristallographiques, mais aussi et surtout

pour m'avoir accueillie dans votre bureau le temps de la rédaction et pour avoir « veillé » sur moi pendant toute cette période !

Merci à Christine (alias Kiki), Marie, Jérôme, Jenny et les mémorantes Julie, Ludivine et Maureen, pour la bonne humeur qui règne au laboratoire, votre disponibilité, la gourmandise partagée, les longueurs de piscine (courage Kiki quand je serai partie !)…

Des amitiés sont nées aussi sur les bancs des cours de chimie… Merci à Olivier, Vinciane et Fred, Adrian et Audrey, Gaëtan et Isa, Grégory, Romu, Catherine et Antoine. Vous ne manquez pas d'être présents dans chacun des moments importants de notre vie. Merci pour vos petits mots (plutôt mails), votre humour (merci Oli de me faire rire !!) et les nombreuses soirées très agréables qu'on a passées et qu'on passera encore ensemble …

Cath, malgré la distance entre nous cette année (le Canada, c'est pas tout près !), tu es toujours restée présente, attentive, à m'encourager et me soutenir. Merci pour nos discussions scientifiques et surtout amicales !

Merci à ma famille et en particulier, à mes parents. Vous m'avez permis d'entreprendre ces études et vous m'avez toujours soutenue dans toutes mes démarches. Merci pour votre exemple et, papa, merci pour ton enthousiasme perpétuel !

Merci à ma chère petite sœur... Nata, tu m'as toujours épaulée et encouragée dans tout ce que j'entreprends. Tes nombreux petits mots m'ont donné beaucoup de confiance en moi et de courage dans les moments plus difficiles. Merci pour ta bonne humeur, ton humour et ton amour !

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement Raf, mon amour, mon ami, mon mari. Tu me supportes (au propre comme au figuré) depuis un petit bout de temps maintenant. Sans toi, le J Med ne serait toujours pas soumis…☺ Merci pour tes encouragements, ta patience, tes remontrances parfois... Sans aucun doute, notre plus belle réussite, ce n'est pas cette thèse mais notre petit bonhomme, Lucas ! (Merci pour ta patience aussi petit Lulu pendant la rédaction… avec des parents un peu stressés, c'est pas toujours évident !) A nous trois, on est plus fort. On pourrait aller jusqu'au bout du monde (et c'est le cas de le dire !!)…

Aventure à suivre en Nouvelle-Zélande…

TABLE DES MATIERES

Abréviations **5**

Code à une et trois lettres des vingt acides aminés naturels **6**

Chapitre 1. Introduction générale ***7***

1. Biosynthèse des eicosanoïdes 9
2. Voie des cyclooxygénases 10
3. Voie des lipoxygénases 26
4. Inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 55

Chapitre 2. Acquis ***61***

1. Pharmacophore d'inhibiteurs sélectifs COX-2 62
2. Relations structure-activité des inhibiteurs 5-LOX et mixtes 5-LOX/COX-2 de type non redox 62

Chapitre 3. Objectifs et stratégie ***71***

Chapitre 4. Matériels et méthodes ***75***

1. Détermination de la structure de petites molécules par diffraction de rayons X 76
2. Banques de données structurales 79
3. Introduction à la mécanique moléculaire 80
4. Exploration de sites d'interaction à l'aide de *GRID* 82
5. Algorithmes de *docking* 82
6. Génération de modèles de pharmacophore à l'aide de *Catalyst* 84

Chapitre 5. Pharmacophore d'inhibiteurs 5-LOX non redox ***85***

1. Stratégie générale 86
2. Sélection des composés 86
3. Analyse conformationnelle 89
4. Génération du pharmacophore 96
5. Evaluation du modèle de pharmacophore 102
6. Ajustement des paramètres contrôlant la génération des hypothèses 107
7. Conclusion 111

Chapitre 6. Etude structurale de la 5-LOX humaine ***113***

1. Tentative de purification de la 5-LOX humaine 114
2. Modèle par homologie de la 5-LOX humaine 130
3. Caractérisation du site actif de la 5-LOX modélisée 145
4. Etude du mode d'interaction de l'acide arachidonique 148

Chapitre 7. Etude du mode d'interaction des inhibiteurs 5-LOX non redox au sein de l'enzyme modélisée **151**

1. Stratégie 152
2. Validation de la méthode de *docking* 152
3. *Docking* d'inhibiteurs 5-LOX non redox au sein de l'enzyme humaine 154
4. Rationalisation du mode d'interaction des composés *Maybridge* sélectionnés au sein du site actif 5-LOX 167

Chapitre 8. Proposition d'un modèle général d'interaction au sein du site actif 5-LOX ***173***

1. Confrontation des résultats de *docking* avec le modèle de pharmacophore 174
2. Affinement du modèle de pharmacophore 176
3. Conclusion : établissement d'un modèle général d'interaction au sein du site actif 5-LOX 179

Chapitre 9. Conclusions et perspectives ***183***

Références bibliographiques ***191***

CD-Rom reprenant les annexes et les complexes obtenus par docking pour les inhibiteurs étudiés

Annexes.pdf

1. Données cristallographiques du composé Aliox23 (dérivé morpholine du composé **15**) 2
2. Paramètres utilisés pour la génération des hypothèses de pharmacophore à l'aide de ***Catalyst*** 9
3. Fiche signalétique du lot de 5-LOX humaine utilisé lors de la purification 12
4. Matrice de substitution basée sur les codons utilisée pour déterminer les substitutions conservatrices entre les parties de séquences des 5- et 15-LOX correspondants à des boucles 13
5. Paramètres de la minimisation énergétique du modèle de la 5-LOX humaine 14

6. Paramètres des algorithmes de *docking* ***GOLD*** et ***Autodock*** 14
7. Description des différentes interactions intermoléculaires et paramètres géométriques caractérisant les ponts H et les interactions de type CH…π et π…π 15

Complexes

Dossier reprenant les structures 3D des complexes obtenus par *docking* lors de l'étude du mode d'interaction des cinq inhibiteurs 5-LOX non redox de la littérature (composés **1**, **6**, **11**, **13** et **15**) et des cinq composés *Maybridge* sélectionnés (**BTB02850**, **BTB02942**, **SPB04623**, **SPB04695** et **SPB04944**) au sein de la 5-LOX humaine modélisée.

Les complexes peuvent être facilement visualisés en téléchargeant le programme *PyMOL*, disponible gratuitement sur le site http://pymol.sourceforge.net/

Pour aider la compréhension du lecteur, différents rabats dépliables se trouvent à la fin du manuscrit.

Volet A : *Données de relations structure-activité*

Volet B : *Structure des composés sélectionnés pour l'élaboration du modèle de pharmacophore*

Volet C : *Représentation schématique du site actif 5-LOX*

Inhibiteurs sélectionnés pour l'étude du mode d'interaction avec la 5-LOX et superposition des points du deuxième pharmacophore (RAAHH)

Volet D : *Structure des composés Maybridge sélectionnés à l'aide du premier modèle de pharmacophore (RAHHH)*

Structure des composés Maybridge reconnus par le deuxième modèle de pharmacophore (RAAHH)

Volet E : *Caractéristiques géométriques des ponts H et des interactions CH…π*

Abréviations

13*S*-HODE	Acide 13-*S*-hydroxyoctadécadiènoïque
3D	Tridimensionnel
5*S*-H(P)ETE	Acide 5*S*-hydro(pero)xyeicosatétraènoïque
AA	Acide arachidonique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
COX	Cyclooxygénase
DRX	Diffraction de rayons X
EETs	Acides époxyeicosatriènoïques
EGF	*Epidermal growth factor*
EGTA	Acide éthylèneglycol-*bis*(β-aminoéthyl)-N,N,N′,N′-tétraacétique
ERK	*Extracellular signal-regulated kinase*
FLAP	*Five-lipoxygenase activating protein*
HETEs	Acides hydroxyeicosatétraènoïques
IL	Interleukine
IMAC	*Immobilized Metal Affinity Chromatography*
kb	*kilo-base pairs*
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriène
MAPK	*Mitogen-activated protein kinase*
NFκB	*Nuclear factor- κB*
PC	Phosphatidylcholine
PDB	*Protein data bank*
PDGF	*Platelet-derived growth factor*
PGs	Prostaglandines
PGHS	*Prostaglandin endoperoxide synthase*, *prostaglandin H_2 synthase*
PLA_2	Phospholipase A_2
PLAT	*Polycystin-1, Lipoxygenase, α-toxin*
PLC	Phospholipase C
PPARs	*Peroxysome proliferator-activated receptors*
RMSD	*Root Mean Square Deviation*

RSA	Relations structure-activité
RXR	Récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*

Code à une et trois lettres des vingt acides aminés naturels

A	Ala	alanine	M	Met	méthionine
C	Cys	cystéine	N	Asn	asparagine
D	Asp	aspartate	P	Pro	proline
E	Glu	glutamate	Q	Gln	glutamine
F	Phe	phénylalanine	R	Arg	arginine
G	Gly	glycine	S	Ser	sérine
H	His	histidine	T	Thr	thréonine
I	Ile	isoleucine	V	Val	valine
L	Leu	leucine	W	Trp	tryptophane
K	Lys	lysine	Y	Tyr	tyrosine

CHAPITRE 1.
Introduction générale

1. Biosynthèse des eicosanoïdes 9
2. Voie des cyclooxygénases 10
    2.1. Réaction enzymatique 10
    2.2. Réponses biologiques associées aux prostanoïdes 12
    2.3. La cyclooxygénase : deux isoformes 13
        2.3.1. Distribution et rôles physio(patho)logiques 14
        2.3.2. Expression génique 14
        2.3.3. Structure enzymatique 15
        2.3.4. Le site actif COX 17
    2.4. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens 19
        2.4.1. Les AINS classiques 19
        2.4.2. Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 20
        2.4.3. Mode de liaison et origine de la sélectivité des inhibiteurs 22
    2.5. Controverse concernant les inhibiteurs sélectifs COX-2 23
3. Voie des lipoxygénases 26
    3.1. Diversité des lipoxygénases 26
        3.1.1. Nomenclature et classification 28
        3.1.2. Réaction enzymatique 29
        3.1.3. Structure des LOXs 32
            3.1.3.1. Reploiement général 33
            3.1.3.2. Centre catalytique 34
            3.1.3.3. Site actif 15-LOX, modèle d'interaction pour le substrat et spécificité de position de l'oxygénation 35
        3.1.4. Rôles biologiques des LOXs 38
            - 15/12-LOXs 38
            - 12-LOXs de type plaquettaire 39
            - LOXs de type épidermique 40
    3.2. Voie de la 5-LOX 41
        3.2.1. Biosynthèse des leucotriènes 41
        3.2.2. Distribution tissulaire des enzymes impliquées dans cette voie 43
        3.2.3. Réponses biologiques associées aux leucotriènes 44
        3.2.4. Caractéristiques de la 5-LOX 45
            - Expression génique 46

- Mutagenèse dirigée 46
- Enzymologie et régulation cellulaire de la 5-LOX 47

3.3 Différentes approches thérapeutiques pour inhiber la biosynthèse des LTs 49

3.3.1. Inhibition directe 49

- Inhibiteurs redox ou antioxydants 49
- Inhibiteurs chélateurs du fer 51
- Inhibiteurs compétitifs non redox 52

3.3.2. Inhibition indirecte : les inhibiteurs de la FLAP 53

4. Inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 55

4.1. Intérêts pharmacologiques et thérapeutiques 55

4.2. Familles d'inhibiteurs développées 56

4.2.1. Di-*tert*-butylphénols 56

4.2.2. Dérivés thiophènes 58

4.2.3. Dérivés pyrazoliniques 58

4.2.4. AINS modifiés 58

4.2.5. Dérivés dihydropyrrolizines 60

Le métabolisme des acides gras polyinsaturés est gouverné par deux types d'enzymes principales, les **cyclooxygénases (COXs)** et **lipoxygénases (LOXs)**. Ensemble, elles mènent à la biosynthèse de métabolites biologiquement actifs, connus sous le nom d'**eicosanoïdes**. La découverte du rôle central joué par ces composés dans les maladies à composante inflammatoire a entraîné d'importants efforts de recherche quant à l'élucidation de la structure et du mécanisme d'action de ces enzymes. Les différentes études menées sur les COXs ont conduit à la mise sur le marché d'un certain nombre de médicaments, les **anti-inflammatoires non stéroïdiens** (AINS). La voie des LOXs, par contre, a été moins investiguée. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ces enzymes, et spécialement à l'isoforme 5-LOX.

Dans ce chapitre d'introduction, nous présenterons les deux voies de métabolisation de l'acide arachidonique, en nous focalisant plus particulièrement sur les lipoxygénases. Nous présenterons également l'intérêt de concevoir des **inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2**, ainsi que les inhibiteurs actuellement développés.

Ce chapitre d'introduction fait l'objet, en partie, d'un article de revue intitulé « *Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs* » paru dans *European Journal of Medicinal Chemistry.* [Charlier, 2003]

1. Biosynthèse des eicosanoïdes [Funk, 2001; Goodman, 1996]

Les eicosanoïdes[1] sont des médiateurs lipidiques, biologiquement actifs, issus d'acides gras polyinsaturés à vingt atomes de carbone. Chez les mammifères, leur principal précurseur est l'acide arachidonique (AA) (**Figure 1. 1**).

Dans l'organisme, les acides gras d'origine alimentaire (essentiels) sont incorporés en grande partie dans les membranes sous forme de phospholipides. Sous l'action d'un stimulus cellulaire (infection microbienne, frottement, coup, blessure, brûlure, substance chimique, facteur de croissance, etc.), la phospholipase A_2 (PLA_2) libère l'AA des phospholipides membranaires et initie ainsi la **cascade de l'acide arachidonique**. En effet, celui-ci peut alors être métabolisé suivant trois voies :

- **la voie des cyclooxygénases**

Elle assure la formation des prostanoïdes. Ce terme regroupe les prostaglandines (PGD_2, PGE_2 et $PGF_{2\alpha}$), la prostacycline (PGI_2) et le thromboxane A_2 (TXA_2). Ces composés jouent un rôle important, notamment, dans les processus inflammatoires et le maintien de l'homéostasie gastro-intestinale et rénale.

- **la voie des lipoxygénases**

Elle donne lieu principalement à la biosynthèse des leucotriènes et des hépoxillines. Ces composés sont impliqués dans plusieurs réponses biologiques importantes telles que l'inflammation et les réactions d'hypersensibilité.

- **la voie des monooxygénases à cytochrome P450**

Ces enzymes assurent la formation de divers époxy- et hydroxy-eicosanoïdes (EETs et HETEs, respectivement), impliqués dans le contrôle de la fonction rénale et du tonus vasculaire. Le rôle physiologique et/ou physiopathologique de ces métabolites de l'AA est l'objet d'intenses recherches, notamment dans le domaine de l'hypertension. [Capdevila, 2002; Sarkis, 2004a; Sarkis, 2004b]

Les voies des cyclooxygénases et lipoxygénases nous intéressant plus particulièrement, elles feront l'objet d'une description plus approfondie dans les paragraphes suivants.

[1] *Eicosa* signifie vingt en grec.

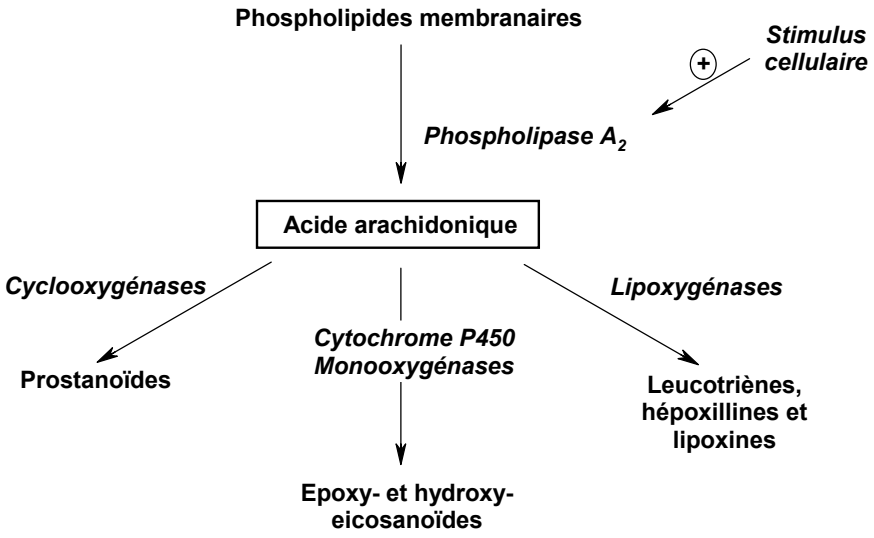


Figure 1. 1 Biosynthèse des eicosanoïdes

2. Voie des cyclooxygénases

2.1. Réaction enzymatique

L'acide arachidonique est le substrat naturel de la *prostaglandin endoperoxide synthase* (PGHS), plus couramment appelée **cyclooxygénase** ou **COX**. Cette enzyme, bifonctionnelle, catalyse les deux premières étapes de la biosynthèse des **prostanoïdes** (**Figure 1. 2**). [Marnett, 2000; Smith, 1996]

D'abord, l'activité CYCLOOXYGENASE (bis-oxygénase) transforme l'AA en hydroperoxy endoperoxyde cyclique PGG_2 par réaction avec deux molécules d'oxygène. Ensuite, l'activité HYDROPEROXYDASE réduit la PGG_2 formée en hydroxy endoperoxyde PGH_2. Cette dernière activité requiert la présence d'un atome de fer au sein d'un noyau hème. [Smith, 2002] Par la suite, la PGH_2, instable, est métabolisée par différentes synthases et isomérases pour former les prostaglandines (PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$), la prostacycline (PGI_2) et le thromboxane A_2 (TXA_2). [Smith, 1991]

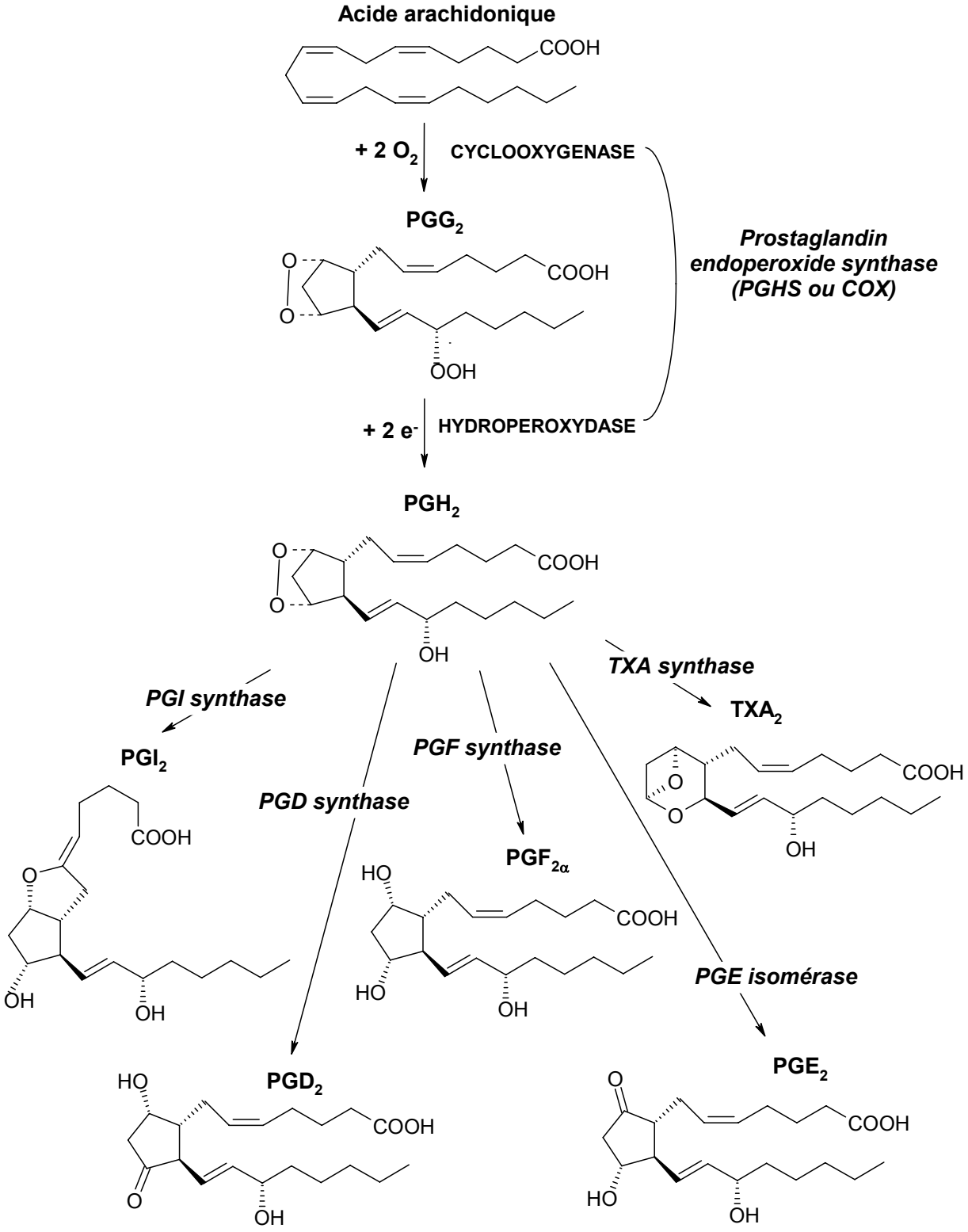


Figure 1. 2 Biosynthèse des prostanoïdes

Les prostanoïdes sont caractérisés par une structure de base théorique, l'acide prostanoïque (**Figure 1. 3**). Ils sont désignés par une lettre majuscule (D, E, F, I, H), dépendant des substituants oxygénés fixés en position 9 et 11 du cycle cyclopentanique.

Seul le thromboxane comporte un cycle de type oxane. Le chiffre qui suit (2 dans ce cas-ci) désigne le nombre de doubles liaisons présentes au niveau des deux chaînes fixées au cycle (caractéristique de l'acide gras précurseur).

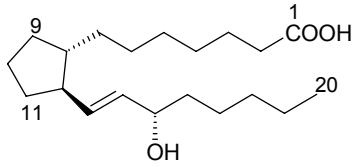


Figure 1. 3 Structure de l'acide prostanoïque

2.2. Réponses biologiques associées aux prostanoïdes

Les prostanoïdes sont des **hormones « locales »**. Une fois formés, ils vont interagir avec des récepteurs couplés à une protéine G, se trouvant soit à la surface de la cellule-mère (action **autocrine**), soit sur des cellules voisines (action **paracrine**). [Katori, 2000] Par ailleurs, certaines prostaglandines (PGs) se lieraient également aux récepteurs nucléaires **PPARs** (*Peroxysome proliferator-activated receptors*). Ces récepteurs, activés par la liaison d'un ligand, forment des hétérodimères avec le récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque (RXR) et peuvent alors agir comme facteur de transcription, **modulant** ainsi **l'expression de gènes cibles**. [Bishop-Bailey, 2003 ; Zingarelli, 2005] Les prostanoïdes sont donc à la fois des **messagers intra- et intercellulaires**.

Bien que leur distribution tissulaire soit fonction de l'équipement enzymatique des cellules, les prostanoïdes interviennent, d'une manière générale, dans tous les processus de régulation de l'organisme. [Mamas, 1997]

Au niveau du <u>système cardiovasculaire</u>, les PGD_2 et PGE_2 ainsi que la PGI_2 présentent de puissantes propriétés vasodilatatrices tandis que le TXA_2 est un vasoconstricteur et la $PGF_{2\alpha}$, un veinoconstricteur. Le TXA_2 constitue un puissant inducteur de l'agrégation plaquettaire tandis que la PGI_2 présente des propriétés antiagrégantes. Le TXA_2 provoque aussi une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire.

Au niveau de l'<u>appareil respiratoire</u>, la PGD_2, la $PGF_{2\alpha}$ et le TXA_2 sont des bronchoconstricteurs, en provoquant une contraction des muscles lisses. La PGI_2 et la PGE_2, par contre, présentent des propriétés bronchodilatatrices.

Au niveau de l'<u>appareil digestif</u>, les PGs, et en particulier les PGI_2 et PGE_2, maintiennent l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale. Différents mécanismes contribuent à leur action cytoprotectrice : l'inhibition de la sécrétion d'acides et de pepsine, la

stimulation de la sécrétion de mucus protecteur et de bicarbonate ainsi que l'amélioration de flux sanguin au niveau de la muqueuse.

Au niveau du système rénal, les PGE_2 et PGI_2, contrairement au TXA_2, stimulent la filtration glomérulaire et par conséquent, la diurèse et la natriurèse. La PGE_2 régule le tonus vasculaire et le flux sanguin dans le rein.

Au niveau de l'appareil reproducteur, les PGE_2 et $PGF_{2\alpha}$, à l'inverse de la PGI_2, provoquent la contraction du muscle utérin. Les PGs sont impliquées dans les principales étapes de la reproduction comme l'ovulation, la fécondation, l'implantation et l'accouchement.

Les effets biologiques associés aux prostanoïdes confirment également leur rôle de médiateurs dans le processus inflammatoire. En effet, la PGE_2 ainsi que la PGI_2 sont de puissants vasodilatateurs qui agissent en synergie avec d'autres autacoïdes[2] comme l'histamine et la bradykinine. L'action combinée de ces médiateurs sur les capillaires contribue à la **rougeur** et à l'afflux de sang dans les régions d'inflammation aiguë. La PGE_2 et la PGI_2 potentialisent également l'effet de l'histamine et de la bradykinine sur la perméabilité vasculaire, contribuant à l'exsudation du plasma et à la formation d'un **œdème** inflammatoire. Elles provoquent aussi une **hyperalgésie** par sensibilisation des fibres C afférentes. Par ailleurs, la PGE_2 agit sur les neurones du système thermorégulateur de l'hypothalamus, causant une **augmentation de la température** corporelle. Cette prostaglandine déclenche la fièvre induite par des pyrogènes endogènes comme la cytokine IL-1. [Parente, 2001]

2.3. La cyclooxygénase : deux isoformes

Bien que l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) remonte à plus d'un siècle, ce n'est qu'en 1971 que les travaux menés par Vane permirent l'identification de leur cible : la COX. [Vane, 1971] Au début des années 1990, une seconde isoforme (COX-2) fut découverte, bien distincte de la première, alors rebaptisée COX-1. [Fu, 1990; O'Banion, 1991; Xie, 1991] Ces deux enzymes sont, d'un point de vue structural, fort semblables et catalysent la même réaction enzymatique. Toutefois, elles présentent certaines différences,

[2] Les autacoïdes sont des substances participant à l'inflammation telles que l'histamine, la sérotonine, le complément, les kinines, le PAF-acéther, les eicosanoïdes, les cytokines et chémokines pro-inflammatoires et les radicaux libres. Leurs activités communes sont la vasodilatation, une action algogène et du chimiotactisme.

notamment au niveau de leur expression, fonction, distribution dans l'organisme et de la structure de leur site actif.

2.3.1. Distribution et rôles physio(patho)logiques

De manière générale et simplifiée, la **COX-1** est dite **constitutive** tandis que la **COX-2** est **inductible**. La COX-1 est présente dans la plupart des tissus et est impliquée dans des processus physiologiques tels que l'agrégation plaquettaire, l'homéostasie du tractus gastro-intestinal et la perfusion rénale. La COX-2, par contre, quasi indétectable chez le sujet sain, est induite par des stimuli inflammatoires (cytokines, IL-1β, TNF-α, LPS), par des facteurs de croissance, par des stimuli mitogènes ou oncogènes (sérum, esters de phorbol) ou encore par d'autres stimuli physiologiques comme un stress mécanique. Elle produit alors les PGs impliquées dans la réponse inflammatoire et responsables des signes cardinaux de l'inflammation (rougeur, douleur, chaleur, œdème capillaire). [Smith, 1996] L'expression de la COX-2 est également associée à des taux élevés de prostanoïdes observés dans des conditions pathologiques comme la progression de certains cancers. [Dannenberg, 2001; Subbaramaiah, 2003]

Cependant, la différenciation des rôles des deux isoformes n'est pas aussi simple qu'il n'y paraît. [Parente, 2003] Plusieurs observations ont démontré que la COX-2 n'est pas exclusivement une enzyme pro-inflammatoire inductible. L'expression de la COX-2 a été observée dans certains tissus, dans des conditions normales, suggérant son implication dans la régulation de processus physiologiques. Par ailleurs, d'autres études montrent que la COX-1 est régulée positivement dans des types particuliers de cellules. Les **COX-1 et COX-2** sont donc toutes deux impliquées dans des processus à la fois **physiologiques et pathologiques**. [Bertolini, 2001; Parente, 2003; Wallace, 1999] (cfr **point 2.5**)

2.3.2. Expression génique [Tanabe, 2002]

Les deux isoformes COX-1 et COX-2 sont codées par des gènes distincts, localisés sur des chromosomes différents. Leurs principales caractéristiques sont reprises dans le **Tableau 1. 1**.

Tableau 1. 1 Principales caractéristiques des gènes codant pour les isoformes COX-1 et COX-2

	COX-1	**COX-2**
Localisation	Chromosome 9	Chromosome 1
Taille du gène	22 kb	8.3 kb
Nombre d'exons	11	10
Taille de l'ARNm	2.8 kb (stable)	4.6 kb (instable)
Type d'expression	Constitutive	Inductible

Le **gène cox-1** présente les caractéristiques d'un **gène domestique**[3] (« *housekeeping » gene)*, à savoir, pas de boîte TATA (*TATA box*), une région riche en GC et peu d'éléments *cis* dans le promoteur. Le **gène cox-2**, par contre, présente de nombreux éléments de régulation en 5', et notamment des sites de liaison pour des facteurs de transcription tels que NF-κB, NF-IL-6, AP-2 et CRE. Cytokines, stress mécanique et plusieurs facteurs de croissance activent ces facteurs de transcription et par conséquent, régulent positivement l'expression du gène cox-2. Dans la région 3' du gène, on trouve 17 copies de la séquence ATTTA (séquence de Shaw et Kamen). Ce motif est commun à de nombreux **gènes précoces**[3] (*small immediate early genes)* et contribue à l'instabilité de l'ARNm. [Morita, 2002]

2.3.3. Structure enzymatique [Garavito, 1996; Garavito, 2002]

Les COXs sont des **enzymes intégrales membranaires monotopiques**. Elles sont situées sur la face luminale du réticulum endoplasmique mais aussi, pour la COX-2 principalement, sur les membranes interne et externe de l'enveloppe nucléaire. [Morita, 1995]

La différence majeure entre les deux enzymes réside dans la présence d'un peptide signal de longueur différente (25 résidus chez COX-1 et 17 chez COX-2) ainsi que dans l'insertion, chez COX-2, d'une séquence de 18 acides aminés proche de l'extrémité C-terminale.

[3] Un **gène domestique** est un gène qui assure les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Un **gène précoce**, par contre, est un gène dont l'expression est induite dans une situation physiologique ou pathologique et de façon très rapide et transitoire.

Après les modifications post-traductionnelles, le clivage du peptide signal et l'insertion dans la membrane, la COX-1 mature contient 576 acides aminés tandis que la COX-2 en compte 587. [Smith, 2000] Pour une même isoforme, les COXs d'espèces différentes présentent entre 85 et 90% d'identité de séquence. Par contre, au sein d'une même espèce, ce pourcentage n'est plus que de 60 à 65% entre les deux isoformes. [Griswold, 1996]

La structure tridimensionnelle (3D) de la COX-1 ovine a été déterminée par diffraction de rayons X (DRX) pour la première fois en 1994 [Picot, 1994], rapidement suivie de celle des COX-2 humaine et de souris. [Kurumbail, 1996; Luong, 1996] Les deux isoenzymes se présentent sous forme d'un **homodimère** (**Figure 1. 4**), chaque monomère étant constitué de trois domaines structuraux distincts :

- le **domaine *EGF-like***, par analogie au facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*). Ce petit domaine compact est formé de deux feuillets-β maintenus par trois ponts disulfures. Il est situé à l'interface du dimère (extrémité N-terminale). Sa fonction est encore mal définie. Il pourrait toutefois contribuer à la conformation de l'enzyme, permettant les interactions entre monomères.

- le **domaine de liaison à la membrane** (« MBD » pour *membrane binding domain*). Il est formé de quatre hélices α amphipathiques qui insèrent l'enzyme dans un feuillet de la bicouche lipidique, de telle sorte que les faces hydrophobes et celles faiblement chargées des hélices interagissent respectivement avec les corps hydrophobes et les têtes hydrophiles des phospholipides. Ce mode de liaison à la membrane est dit monotopique.

- le **domaine catalytique globulaire** à l'extrémité C-terminale. Il comprend le site actif CYCLOOXYGENASE où vient se loger le substrat (l'AA) et le site actif HYDROPEROXYDASE qui comprend l'hème. Ces deux sites, adjacents, sont physiquement distincts et un transfert électronique s'effectue de l'un à l'autre via un résidu tyrosine (Tyr385).

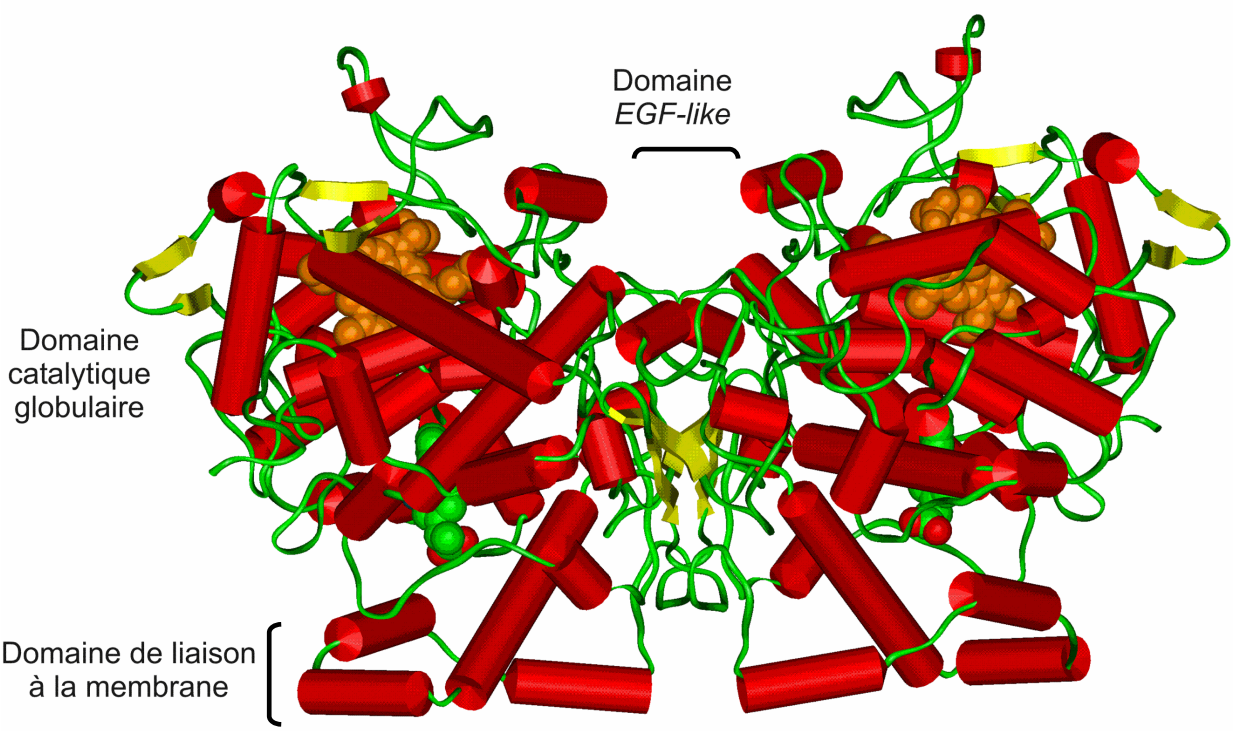


Figure 1. 4 Structure de la COX-1 (code PDB : 1PRH) sous forme d'homodimère. L'hème (en orange) marque le site actif HYDROPEROXYDASE tandis que le flurbiprofène (en couleur par atomes) est lié au sein du site actif CYCLOOXYGENASE.

Aujourd'hui, de nombreuses structures cristallographiques des deux isoenzymes, de plusieurs espèces, sont disponibles dans la banque PDB, seules ou en complexe avec différents acides gras, comme l'acide arachidonique [Kiefer, 2000], l'acide dihomo-γ-linolénique [Thuresson, 2001] ou l'acide linoléique [Malkowski, 2001], avec des inhibiteurs non sélectifs, tels que le flurbiprofène [Kurumbail, 1996; Picot, 1994], l'aspirine [Loll, 1995] et l'indométhacine [Kurumbail, 1996], le diclofénac [Rowlinson, 2003] ou encore avec des inhibiteurs sélectifs de l'isoforme COX-2, comme le SC-558. [Kurumbail, 1996]

2.3.4. Le site actif COX [Kurumbail, 1996; Picot, 1994; Smith, 2000]

Les COX–1 et –2 ont des sites actifs similaires. Tous les résidus considérés comme essentiels à l'activité catalytique sont conservés.

Chaque monomère comprend un long et étroit tunnel hydrophobe qui s'étend du domaine de liaison à la membrane jusqu'au cœur du domaine catalytique globulaire. Le site de liaison de l'AA est situé dans la moitié supérieure du tunnel. Il est bordé, d'un côté par la Tyr385, à proximité de l'hème et de l'autre, par l'Arg120. Des études de mutagenèse dirigée

montrent l'importance de ce résidu comme point d'ancrage pour la liaison des substrats. [Bhattacharyya, 1996]

Malgré leur similarité, le site actif de la COX-2 est près de 20% plus large et possède une forme légèrement différente de celui de la COX-1. Ceci s'explique par plusieurs substitutions dans la séquence en acides aminés (**Figure 1. 5**).

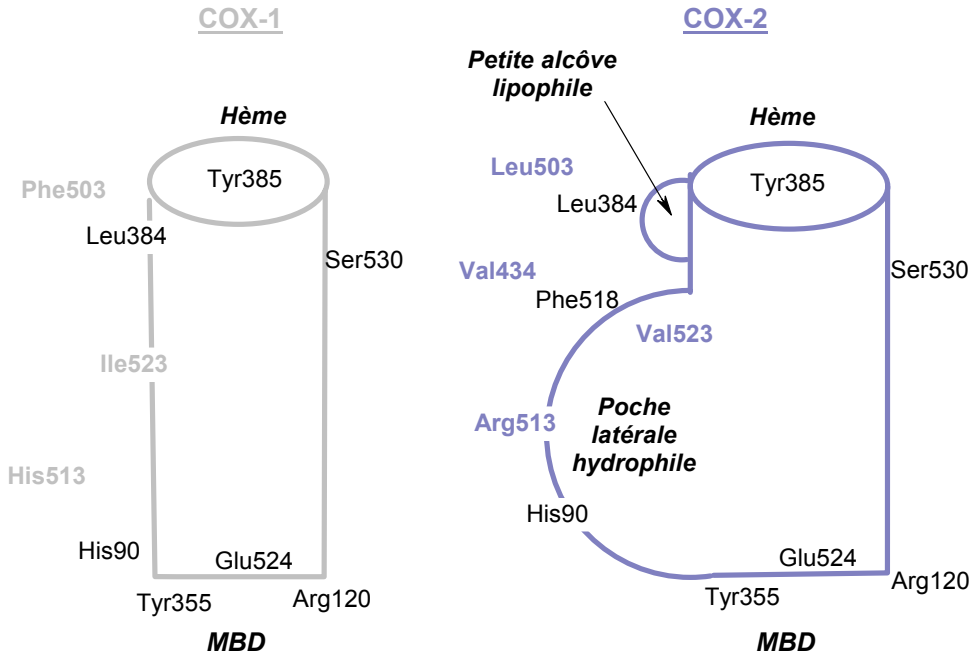


Figure 1. 5 Représentation schématique des sites actifs des COX-1 et COX-2 (les résidus conservés entre les deux isoformes sont représentés en noir)

En effet, l'Ile523 chez COX-1 est remplacée par une valine chez COX-2. Cette substitution augmente le volume du site actif COX-2 : la valine, moins encombrante, donne accès à une poche hydrophile, adjacente au tunnel. L'isoleucine, par contre, avec sa chaîne latérale plus longue, rend inaccessible cette cavité secondaire chez COX-1.

Par ailleurs, la substitution de l'Ile434 par une valine chez COX-2 provoque un déplacement de la Phe518, agrandissant encore la cavité latérale hydrophile. Des interactions supplémentaires pourront être réalisées, au sein de cette poche, avec des résidus tels que l'Arg513 (His chez COX-1). Enfin, la chaîne latérale de la Leu384, conservée d'une isoforme à l'autre et située à proximité de la Tyr385, est orientée différemment chez COX-1 et COX-2. Cette différence découle de la substitution de la Phe503 chez COX-1 par une leucine chez COX-2. Cette dernière, plus petite, permet à la chaîne latérale de la Leu384 de s'écarter du tunnel, libérant de ce fait une petite alcôve lipophile. [Bayly, 1999]

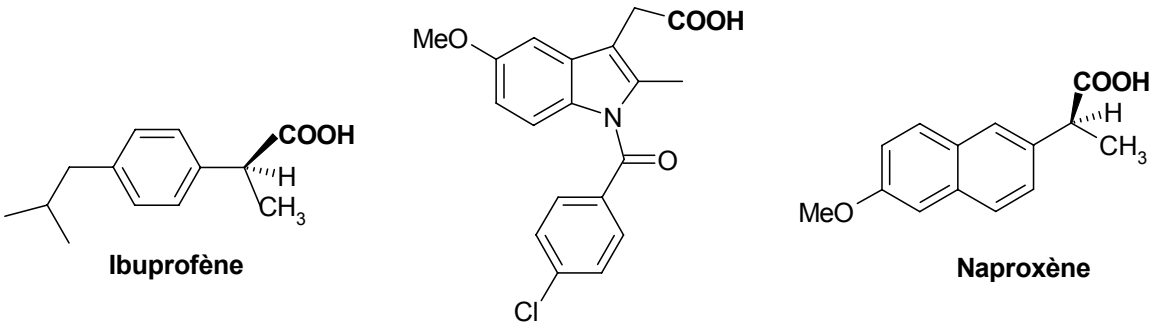
Ces différences au niveau de la taille et de la forme des sites actifs COX contribuent, d'une part, à la sélectivité des inhibiteurs [Gierse, 1996; Wong, 1997] et d'autre part, permettent à la COX-2 d'accepter une plus grande variété de substrats que la COX-1. [Kozak, 2001; Kurumbail, 2001; Laneuville, 1995; Vane, 1998a]

2.4. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les AINS sont des inhibiteurs des cyclooxygénases. [Vane, 1998b] Ils entrent en compétition avec l'AA pour se lier au site actif COX de l'enzyme et bloquer son activité. [Smith, 1991] Il existe deux classes distinctes d'AINS : d'une part, les AINS classiques (découverts avant 1995) et d'autre part, les inhibiteurs préférentiels ou sélectifs de la COX-2.

2.4.1. Les AINS classiques

L'aspirine, développée en 1897 chez Bayer, a été le précurseur des AINS classiques. [Moore, 2000] Depuis principalement les années 1960, un grand nombre d'anti-inflammatoires de ce type a été mis sur le marché, parmi lesquels l'ibuprofène (Brufen®, Nurofen®, …), l'indométhacine (Indocid®, …) et le naproxène (Apranax®, …) (**Figure 1. 6**). [Dannhardt, 2000]



Ibuprofène **Indométhacine** **Naproxène**

Figure 1. 6 Structure de quelques AINS classiques

Malgré leur diversité structurale, ces inhibiteurs possèdent tous une **fonction carboxylique**. Ce groupement, sous forme de carboxylate au pH physiologique, interagit de manière électrostatique avec l'Arg120, seul résidu chargé positivement dans le tunnel hydrophobe des COXs. [Mancini, 1995] Le mode d'interaction (réversible ou irréversible) de ces composés sera discuté au **point 2.4.3.**

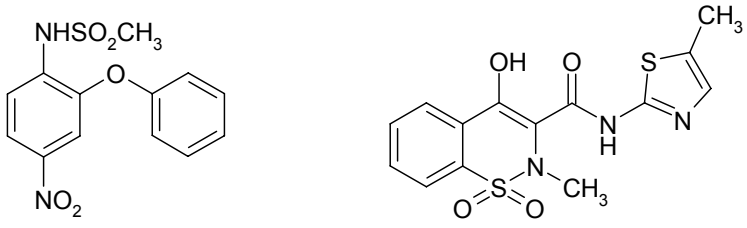
Par ailleurs, ces composés partagent les mêmes propriétés thérapeutiques : ils exercent une **action analgésique, anti-pyrétique et anti-inflammatoire**. [Taketo, 1998] Malheureusement, ils sont également responsables d'**effets secondaires gastriques** (ulcères et hémorragies gastro-intestinales) **et rénaux** qui peuvent entraîner la mort.[4] [Fosslien, 1998] En effet, les AINS classiques inhibent les deux isoformes de la COX avec peu de spécificité. Or, comme nous l'avons vu précédemment, la COX-2 est surexprimée au niveau des sites d'inflammation tandis que la COX-1 est responsable de la production basale de PGs importantes pour les fonctions physiologiques rénales et gastro-intestinales. Dès lors, les effets indésirables des AINS classiques seraient à attribuer principalement à l'inhibition de la COX-1.

Ces observations ont ouvert de nouvelles perspectives quant à la conception d'agents anti-inflammatoires. Des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 offrent la possibilité d'inhiber la production de PGs « inflammatoires » sans affecter les PGs générées par la COX-1 au niveau gastro-intestinal. [Vane, 1998b]

2.4.2. Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2

Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 ont donc les **mêmes propriétés thérapeutiques que les AINS classiques** mais, présentent **moins d'effets secondaires gastro-intestinaux**. [Marnett, 1998]

La première génération de ces composés a été découverte par hasard, à partir de modèles animaux. Le nimésulide (Mesulid ®) et le méloxicam (Mobic ®) (**Figure 1. 7**), notamment, ont été les premiers AINS présentant un meilleur profil pharmacologique. Ce n'est que plus tard qu'on découvrit qu'ils inhibaient préférentiellement la COX-2. [Vane, 1998b]



Nimésulide **Méloxicam**

Figure 1. 7 Structure d'inhibiteurs préférentiels COX-2

[4] Remarquons qu'un effet secondaire de l'aspirine, particulièrement intéressant, est son action anti-thrombotique, aujourd'hui utilisée en prévention primaire et secondaire de l'infarctus du myocarde.

Actuellement, plus de 500 inhibiteurs spécifiques de la COX-2 ont été conçus. [Dannhardt, 2000] La majorité peut être répartie en cinq familles chimiques : les diarylhétérocycles, les sulfonanilides (diaryl- ou aryl/hétéroaryl-éthers ou thioéthers), les AINS modifiés, les di-*tert*-butylphénols (dérivés antioxydants) et les *cis*-stilbènes (dérivés 1,2-diaryléthylènes). [Dannhardt, 2001]

La plupart des inhibiteurs sélectifs COX-2 ne possèdent plus le groupement carboxylate caractéristique des AINS classiques mais présentent souvent un groupement sulfone ou sulfonamide, pouvant interagir avec l'Arg513 présente au sein de la poche latérale du site actif COX-2 (voir **point 2.4.3**). [Vane, 1998b]

Quatre composés de la famille des diarylhétérocycles sont actuellement commercialisés pour l'homme : le célécoxib (Célébrex®), le valdécoxib (Bextra®), le sodium parécoxib (Dynastat®), prodrogue du valdécoxib, et l'étoricoxib (Arcoxia®) (**Figure 1. 8**). Ils sont indiqués dans le traitement des maladies rhumatismales comme l'arthrite rhumatoïde et l'ostéoarthrite. [Alsalameh, 2003; Goldenberg, 1999; Riendeau, 2001] Plusieurs autres composés, comme le lumaricoxib et le JTE-522, ont fait l'objet d'études cliniques.

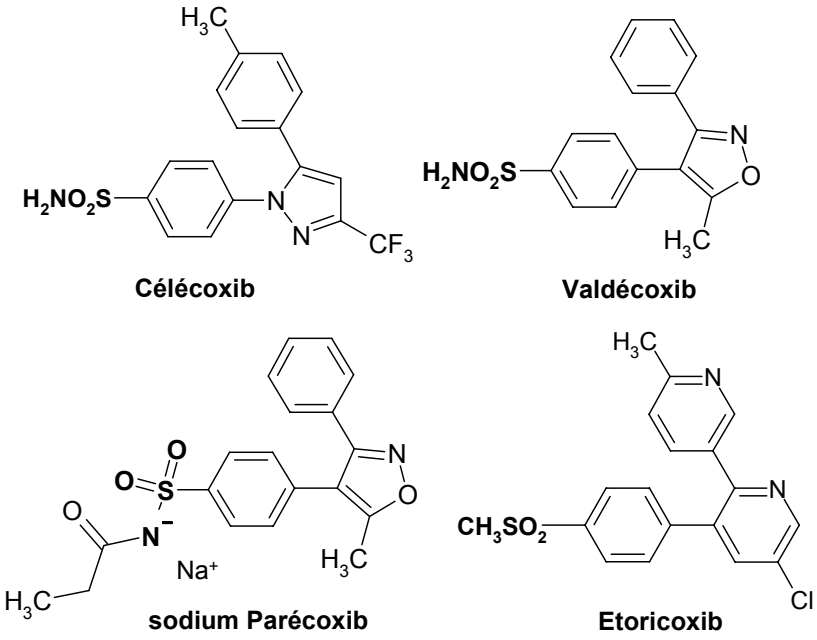


Figure 1. 8 Structure des inhibiteurs sélectifs COX-2 actuellement commercialisés

Ces inhibiteurs offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le traitement de certains types de cancer et notamment, le cancer du côlon, de la prostate, du sein ou du pancréas. [Kawai, 2002; Marnett, 2002b; Ricchi, 2003; Singh-Ranger, 2002] L'implication de

la COX-2 dans le développement des maladies neurodégénératives d'Alzheimer et de Parkinson, par contre, reste controversée et, des investigations supplémentaires sont nécessaires avant que l'intérêt des inhibiteurs sélectifs COX-2 dans ces maladies ne soit avéré. [Aisen, 2002; Secko, 2005]

2.4.3. Mode de liaison et origine de la sélectivité des inhibiteurs

L'étude de la structure des COXs, seules ou en complexe, par DRX (voir **point 2.3.3**) a permis d'élucider le mode d'interaction de certains inhibiteurs au sein du site actif et d'expliquer, en partie, l'origine de leur sélectivité.

La **Figure 1. 9** illustre le mode d'interaction du flurbiprofène, un inhibiteur non sélectif, au sein du site actif COX-1 et du SC558, un inhibiteur sélectif COX-2, apparenté aux « Coxibs », au sein du site actif COX-2. On observe clairement que le groupement phénylsulfonamide du **SC558** exploite la **poche latérale hydrophile**, inexistante chez COX-1 et interagit avec l'**Arg513**. Le **flurbiprofène**, par contre, est localisé dans le **tunnel hydrophobe** et forme un pont salin avec l'**Arg120**. [Smith, 2000]

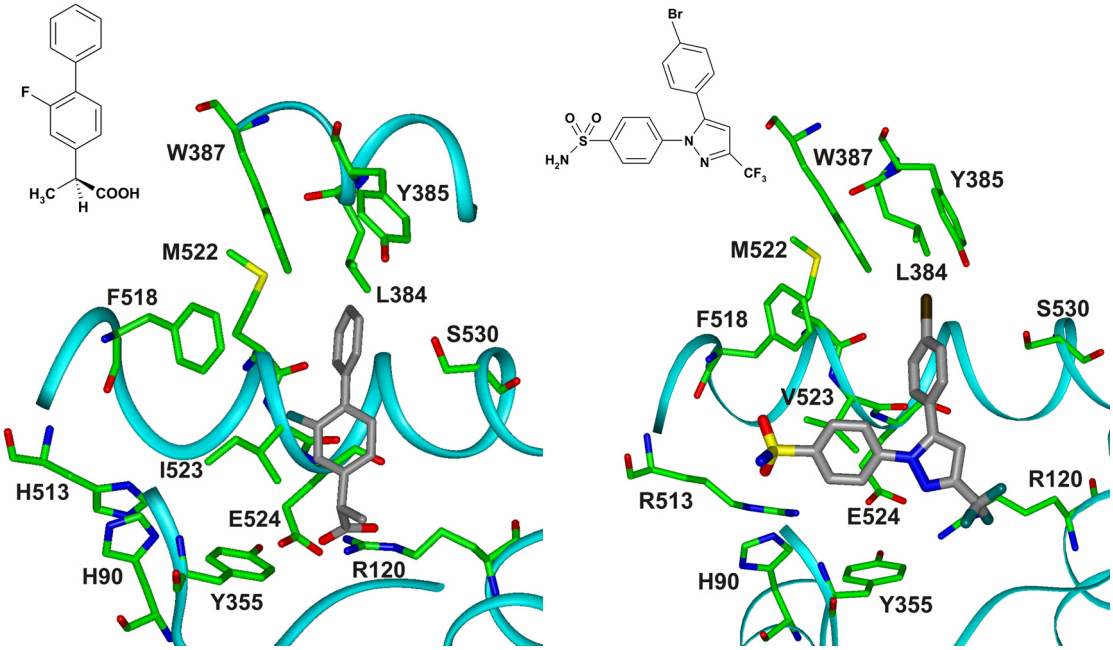


Figure 1. 9 Complexe du flurbiprofène et de la COX-1 ovine (code PDB 1CQE) (à gauche) et complexe du SC558 et de la COX-2 de souris (code PDB 1CX2) (à droite)

Ces deux complexes résultent d'une inhibition lente, dépendante du temps, des deux isoformes. En effet, du point de vue cinétique, tous les AINS (classiques et sélectifs COX-2) peuvent être répartis en quatre classes : [Garavito, 2002 ; Kurumbail, 2001; Kurumbail, 1996]

- Les **inhibiteurs irréversibles**. Les seuls représentants connus à l'heure actuelle sont l'aspirine et ses dérivés sélectifs de la COX-2. [Kalgutkar, 1998] Ils inactivent l'enzyme en acétylant la Ser530, cette modification covalente interférant avec la liaison du substrat au sein du site actif.
- Les **inhibiteurs rapides compétitifs et réversibles <u>des deux isoformes</u>** (inhibition indépendante du temps). C'est le cas de l'ibuprofène.
- Les **inhibiteurs lents, dépendant du temps, <u>des deux isoformes</u>**. Pour ces composés, l'inhibition des COXs se déroule en deux étapes. [Rome, 1975] D'abord, l'inhibiteur se lie de manière rapide, réversible et compétitive au site actif de l'enzyme. Ensuite, ce complexe (EI) évolue en un nouveau complexe (E*I) pseudo-irréversible où, suite à un changement de conformation de l'enzyme, l'inhibiteur y est plus fortement lié et peut difficilement être déplacé.

$$E + I \rightleftharpoons EI \longrightarrow E^*I$$

  Ce type de cinétique biphasique, pour l'inhibition des deux isoformes, est rencontré, entre autres, pour le flurbiprofène et l'indométhacine.
- Les **inhibiteurs réversibles compétitifs <u>de la COX-1</u> et inhibiteurs lents, dépendant du temps <u>de la COX-2</u>**. Cette classe correspond aux inhibiteurs sélectifs de la COX-2 comme les diarylhétérocycles. Remarquons que l'interaction de ces inhibiteurs sélectifs avec l'isoforme COX-2 serait plus complexe qu'une cinétique d'inhibition biphasique et résulterait de multiples équilibres, menant au complexe pseudo-irréversible E*I. [Marnett, 2002a]

Pour une description plus détaillée des approches structurales et rationnelles (modélisation moléculaire) mises en œuvre pour comprendre le mode d'interaction et l'origine de la sélectivité des inhibiteurs spécifiques de la COX-2, le lecteur est invité à lire l'article de revue « *Structural approach for COX-2 inhibition* » paru dans *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* en 2004. [Michaux, 2004b]

2.5. Controverse concernant les inhibiteurs sélectifs COX-2

L'objectif visé lors de la conception des inhibiteurs sélectifs COX-2, à savoir diminuer les effets secondaires gastro-intestinaux comparativement aux AINS classiques, a été atteint, comme l'attestent différentes études cliniques. [Bombardier, 2002; Laine, 2002]

Cependant, fin septembre 2004, Merck & Co décide volontairement de retirer son médicament phare, le rofécoxib (**Figure 1. 10**), du marché mondial. En effet, une étude montre que l'occurrence d'évènements thromboemboliques graves est multipliée par 3.9 chez les personnes prenant du rofécoxib depuis 18 mois, à raison de 25 mg par jour. [Dogne, 2005]

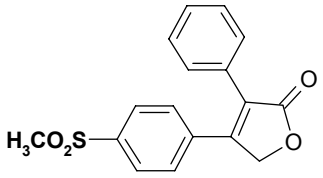


Figure 1. 10 Structure du rofécoxib

Par ailleurs, il est devenu évident que **la distinction entre les deux isoformes COX-1 et COX-2 n'est pas aussi stricte qu'initialement pensé**. Différentes observations tendent à remettre en cause les deux principes fondamentaux sur lesquels repose la conception d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2, à savoir que les PGs responsables de l'intégrité de la muqueuse gastrique et de la fonction rénale ne sont produites que par la COX-1, tandis que celles médiatrices de l'inflammation ne sont formées que par la COX-2. [Wallace, 1999]

D'abord, la **COX-2** est exprimée de manière **constitutive** dans différents tissus, tels que l'endothélium vasculaire, le rein, le système reproducteur féminin, la muqueuse gastrique et le cerveau, suggérant son implication dans la régulation de plusieurs processus physiologiques.

- La COX-2 est responsable de la **synthèse de PGI_2** au niveau des cellules endothéliales. [McAdam, 1999] Par conséquent, les inhibiteurs sélectifs COX-2, en réduisant fortement la formation de PGI_2 sans modifier la production du TXA_2 par COX-1, peuvent causer un déséquilibre de la **balance PGI_2 – TXA_2** en faveur du TXA_2, agrégant plaquettaire puissant et donc agent pro-thrombotique. [Mukherjee, 2002] Le récent retrait du marché du rofécoxib pose la question des effets cardiovasculaires sur toute la classe des inhibiteurs sélectifs COX-2. [Dogne, 2005; Solomon, 2005]
- En plus de son implication dans le **développement du rein**, la COX-2 joue un rôle important dans la **régulation** de la **fonction rénale** (perfusion, rétention d'eau, libération de la rénine) dans des conditions para-physiologiques, c'est-à-dire chez des personnes souffrant d'une cirrhose du foie, d'insuffisance rénale ou encore de

congestion cardiaque. Ces patients risquent donc une ischémie rénale lorsque la production de PGs par la COX-2 est inhibée par des AINS classiques et/ou des inhibiteurs sélectifs COX-2. [Bertolini, 2001; Gambaro, 2002; Parente, 2001; Vane, 1998a]

- L'induction hormonale cyclique de la COX-2 joue un rôle important dans l'**ovulation**. Elle est également exprimée dans l'épithélium utérin à **différents stades de la grossesse** : au début, elle contribue à l'implantation de l'ovule et à l'angiogenèse nécessaire à l'établissement du placenta, tandis qu'à la fin, elle est importante pour le déclenchement du travail (parturition). L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs COX-2 est donc à éviter dans les premiers mois de la grossesse. Par contre, leur utilisation pourrait être utile dans le retardement des accouchements prématurés. [Vane, 1998a]
- Les PGs produites par la COX-2 jouent également un rôle crucial dans le **maintien de l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale**, en particulier lorsque celle-ci est **ulcérée** ou **enflammée**. La COX-2 est rapidement induite sur les sites d'ulcération où elle produit des PGs impliquées dans le processus de cicatrisation et de guérison (« cytoprotection adaptive du tractus gastro-intestinal »). L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs COX-2 est donc à éviter chez des patients sensibles au niveau gastro-intestinal. [Parente, 2001; Parente, 2003; Wallace, 1999]

Ensuite, il a été remarqué que la **COX-1** peut être **induite**, dans certaines cellules, sur les sites d'inflammation. Plusieurs études ont montré que l'efficacité d'inhibiteurs de la COX-2 n'était observée qu'à des doses importantes, inhibant également la COX-1. [Parente, 2001]

Enfin, l'**existence d'une « COX-3 »** est avancée. [Botting, R., 2003; Botting, R. M., 2000; Chandrasekharan, 2002; Willoughby, 2000] Il s'agit en fait, non pas d'une nouvelle isoforme codée par un troisième gène COX, indépendant des deux autres, mais de **« variantes COX »** provenant des gènes codant pour les COX-1 et -2 et résultant d'**épissages alternatifs** des ARN_m. L'utilisation du nom « COX-3 » apporte de la confusion car il a été donné à des variantes COX différentes. [Davies, 2004] La « COX-3 », variante COX-2, serait induite lors de la phase de résolution de la réponse inflammatoire et produirait des PGs anti-inflammatoires, les PGD_2, $PGF_{2\alpha}$ et un membre de la famille cyclopenténone, la 15-déoxy$\Delta^{12\text{-}14}PGJ_2$. [Willoughby, 2000] Par ailleurs, la « COX-3 », variante COX-1 cette fois, serait exprimée principalement dans le cortex cérébral et le cœur humain et serait sélectivement inhibée par des composés comme l'acétaminophène (**Figure 1. 11)**, qui

diminuent la douleur (analgésique) et la fièvre (anti-pyrétique) mais sont de mauvais anti-inflammatoires. [Chandrasekharan, 2002]

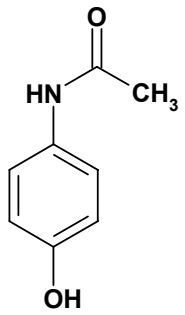


Figure 1. 11 Structure de l'acétaminophène (paracétamol)

Ces nouvelles découvertes démontrent la **complexité de la réponse inflammatoire** ainsi que la **complexité des rôles joués par les COX-1, COX-2 et leurs variantes**.

Il apparaît donc que les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 n'apportent pas une réponse complète à la recherche d'agents anti-inflammatoires présentant moins d'effets secondaires. Il serait dès lors intéressant de concevoir des stratégies alternatives, intervenant, notamment, au niveau de la voie des lipoxygénases (LOXs), et en particulier la voie de la 5-LOX, régulée positivement lors de l'inhibition de la voie des COXs et responsable d'effets indésirables. [Fiorucci, 2001]

3. Voie des lipoxygénases

Les lipoxygénases (LOXs), en plus de leur rôle important au sein de la cascade de l'acide arachidonique chez l'homme, constituent une famille d'enzymes peroxydant les lipides, largement distribuée dans toute la nature. [Casey, 1999] Elles représentent d'importants régulateurs des réactions de défense de l'organisme.

3.1. Diversité des lipoxygénases

Les LOXs sont présentes à la fois dans le règne végétal et le règne animal. [Brash, 1999] On les retrouve également chez les champignons, les invertébrés et les coraux. [Brash, 1996; Shibata, 1995] Plus récemment, un gène codant pour une 15-LOX a été découvert dans un organisme procaryote, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. [Vance,

2004] Il semblerait que cette bactérie se soit appropriée ce gène eucaryote par transfert horizontal[5]. [Porta, 2001]

Dans un effort de récolter, ordonner et classer toutes les informations disponibles dans la littérature sur les LOXs, une banque de données, accessible gratuitement via le web a été créée. [Lutteke, 2003] Actuellement, elle comprend 102 entrées (isoformes de mammifères, végétaux, invertébrés et champignons).

Les LOXs[6] catalysent l'**oxygénation** stéréo- et régio-sélective d'acides gras polyinsaturés, libres ou estérifiés, présentant un ou plusieurs **systèmes 1,4-*cis,cis*-pentadiène** en dérivés hydroperoxy correspondants (**Figure 1. 12**). [Hamberg, 1967; Prigge, 1997] Ce sont des dioxygénases [Samuelsson, 1989], possédant toutes un **atome de fer non hémique**. [Kuhn, 2000] Dans certaines isoformes, le cofacteur métallique peut également être du manganèse. [Su, 1998] Elles sont caractérisées par un motif riche en histidines de structure **His-X_4-His-X_4-His-X_{17}-His-X_8-His**.

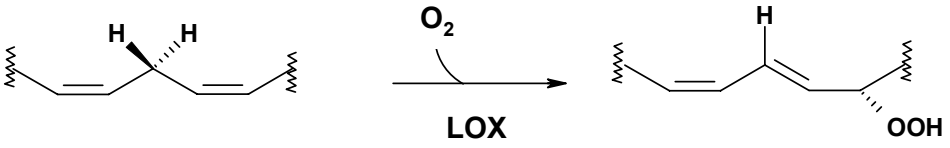


Figure 1. 12 Représentation schématique de la réaction catalysée par les LOXs

Les LOXs animales nous intéressant plus particulièrement, elles feront l'objet d'une description plus détaillée, comparativement aux LOXs végétales. Pour plus d'informations sur ces dernières, le lecteur est invité à se référer à plusieurs articles de revues intéressants. [Grechkin, 1998; Oliw, 2002; Porta, 2002; Shibata, 1995]

[5] Le **transfert horizontal** correspond au transfert de gènes entre individus par l'intermédiaire de vecteurs comme les virus ou les agents infectieux, sans reproduction. Le **transfert vertical**, au contraire, est le transfert de gènes des parents vers leur descendance.

[6] Les LOXs sont des oxydoréductases appartenant à la catégorie **EC 1.13.11**. Leur nom systématique est ***substrate : oxygen oxydoreductase***.

3.1.1. Nomenclature et classification

Selon leur origine, végétale ou animale, les LOXs ont des substrats différents. Par ailleurs, des isoformes distinctes existent dans chacun des deux règnes, historiquement classées selon leur spécificité de position de l'oxygénation de leur substrat principal.

Les **LOXs végétales** ont pour substrats principaux les acides linoléique et α-linolénique (**Figure 1. 13**). Deux isoformes existent : les **9- et 13-LOXs**.[7] Elles catalysent la biosynthèse de différentes **oxylipines**[8] telles que l'acide jasmonique, une des hormones végétales les plus répandues. [Grechkin, 1998]

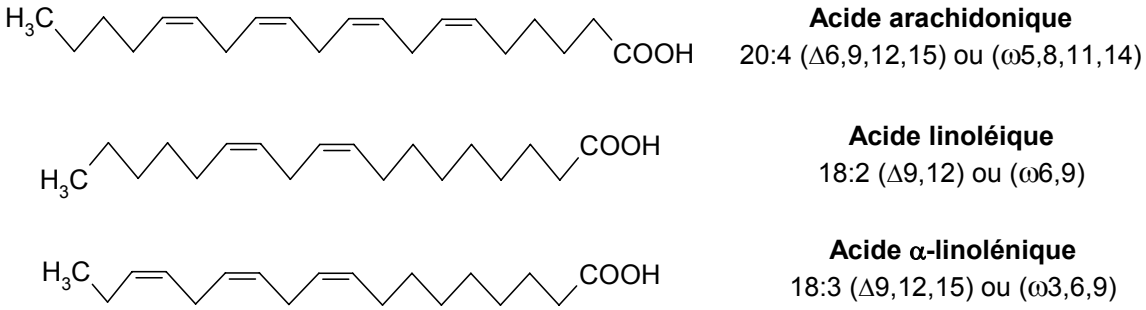


Figure 1. 13 Structure des acides gras polyinsaturés, principaux substrats des LOXs animales et végétales. 20:4, 18:2, 18:3 réfèrent au nombre de carbones : nombre de doubles liaisons. La position des doubles liaisons est, par convention, décrite par la distance en terme de carbones à partir de l'extrémité carboxylique (COOH) (Δ) ou à partir du méthyle (CH3) terminal (ω).

Pour les **LOXs animales**, le substrat principal est l'acide arachidonique (**Figure 1. 13**). Quatre isozymes existent : les **5-, 8-, 12- et 15-LOXs**. Elles catalysent la biosynthèse d'acides hydroperoxyeicosatétraénoïques (HPETEs) qui seront convertis en divers **eicosanoïdes**, dont les leucotriènes (LTs) et lipoxines.

Cette nomenclature des LOXs animales, basée sur l'AA, est généralement bien acceptée par la communauté scientifique. Toutefois, elle présente deux inconvénients majeurs. [Kuhn, 2000; Kuhn, 1995] D'une part, la spécificité de position n'est pas une

[7] Remarquons que certaines isoformes, notamment les enzymes de soja, sont dénommées, non pas suivant leur spécificité de position de l'oxygénation, mais sur base du nom du gène associé. Ainsi, on a les isoformes LOX-1, LOX-2, LOX-3 et LOX-4 de soja qui sont en fait des 13-LOXs (LOX-1 et LOX-4) et des 13-/9-LOXs (LOX-2 et LOX-3).

[8] Le terme **oxylipine** regroupe tous les produits issus de l'oxydation d'acides gras polyinsaturés.

propriété absolue de l'enzyme mais est fonction de la structure du substrat, de son alignement au sein du site actif et des conditions de réaction. D'autre part, elle regroupe des isoformes qui ne sont pas proches phylogénétiquement et qui, clairement, ne présentent pas les mêmes propriétés enzymatiques.

Dès lors, une classification alternative a été proposée, basée sur les relations phylogénétiques existant entre les isoformes (**Figure 1. 14**). On distingue quatre groupes d'enzymes : (i) les 5-LOXs, (ii) les 12-LOXs de type plaquettaire, (iii) les 15/12-LOXs (15-LOX-1 de type réticulocytaire et 12-LOX de type leucocytaire, les deux présentant une spécificité de position mixte) et (iv) les LOXs de type épidermique (12(*R)*-LOX, 15-LOX-2, 8-LOX). [Kuhn, 2000; Kuhn, 1999] Le rôle biologique des différentes isoformes sera présenté au **point 3.1.4**.

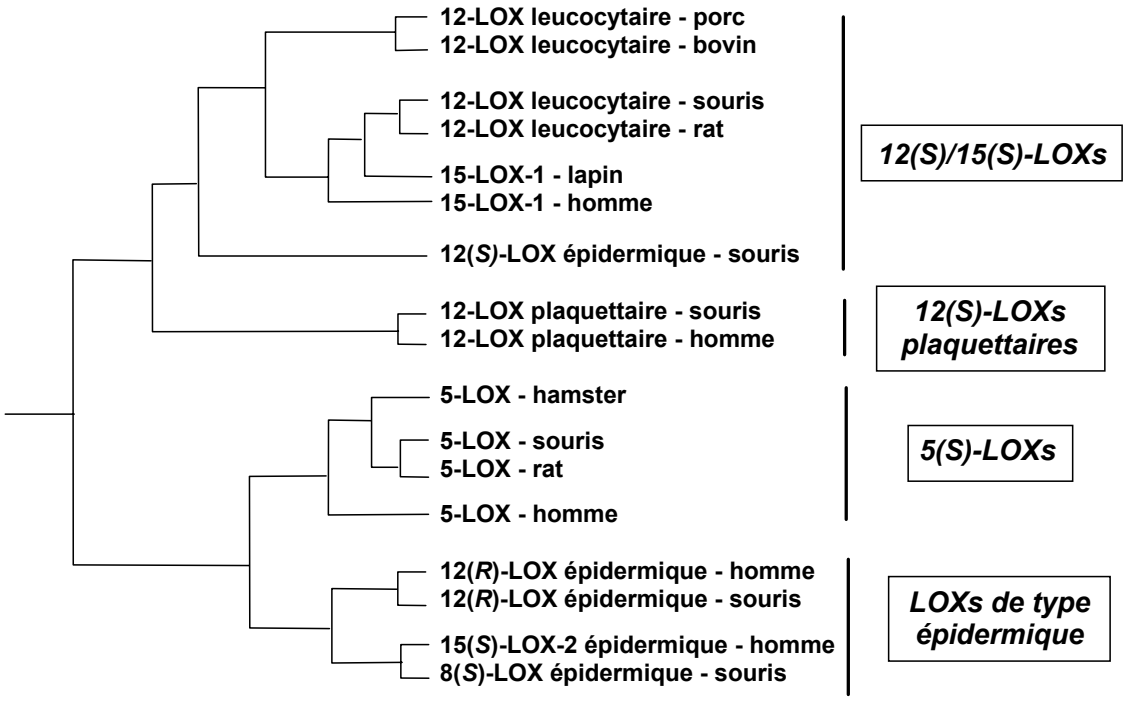


Figure 1. 14 Arbre phylogénétique pour les LOXs animales (adapté de [Kuhn, 1999])

3.1.2. Réaction enzymatique

Actuellement, le mécanisme détaillé de la réaction de lipoxygénation est toujours l'objet de controverses. Sa nature radicalaire ne fait toutefois pas de doute. La réaction se déroulerait en trois étapes consécutives (**Figure 1. 15**). [Kuhn, 2000; Kuhn, 1999]

- Etape 1 : **abstraction stéréosélective** d'un atome d'**hydrogène** d'un groupe méthylène bis-allylique pour conduire au radical pentadiényle

Cette étape limite la vitesse de réaction et est contrôlée à deux niveaux de sélectivité. En effet, si on prend, par exemple, l'AA comme substrat, trois possibilités existent pour l'abstraction de l'atome d'hydrogène : soit en C-7, C-10 ou C-13 (**régiosélectivité**). Par ailleurs, chacun de ces groupements méthylène présente un H pro-*S* et un H pro-*R* (**énantiosélectivité**). Six atomes d'hydrogène différents peuvent donc être enlevés lors de cette première étape. La plupart des LOXs, cependant, n'attaquent qu'un seul H, qui est fonction de l'alignement du substrat par rapport au centre catalytique, c'est-à-dire l'atome de fer activé (Fe^{3+}).

- Etape 2 : **réarrangement radicalaire** du radical pentadiényle formé

Le radical pentadiényle subit une redistribution de ses électrons, dans la direction de l'extrémité soit méthylène [+2], soit carboxylique [-2]. Cette étape est également fonction de la position du substrat au sein du site actif.[9]

- Etape 3 : **insertion stéréospécifique** d'**oxygène** moléculaire

L'insertion stéréospécifique de l'O_2 conduit à la formation d'un radical hydroperoxy intermédiaire qui est ensuite réduit en l'acide HPETE correspondant. Les étapes d'abstraction d'un atome d'hydrogène et d'insertion d'oxygène moléculaire sont antarafaciales, c'est-à-dire qu'elles ont lieu sur des faces opposées du substrat.

[9] Nous n'entrerons pas dans les détails de la discussion concernant la direction du réarrangement radicalaire. Toutefois, pour plus d'informations, le lecteur peut se référer aux articles suivants : [Browner, 1998], [Funk and Loll, 1997], [Kuhn, 2000], [Prigge, 1998]

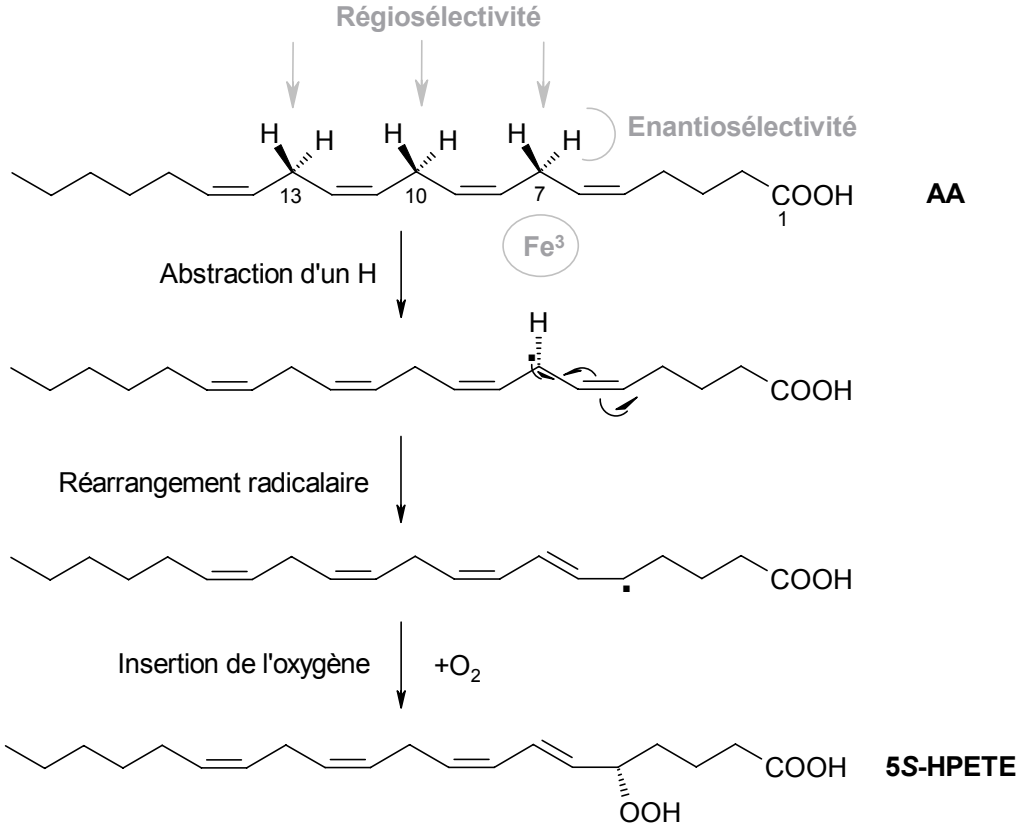


Figure 1. 15 Réaction de lipoxygénation de l'AA catalysée par l'enzyme 5-LOX et conduisant à la formation du 5S-HPETE. Abstraction stéréosélective de l'H pro-S du C-7 de l'AA ; réarrangement radicalaire [-2] ; insertion stéréospécifique de l'O2 en C-5 de l'AA et réduction en dérivé hydroperoxyde.

Les quatre isoformes de LOXs animales insèrent l'O_2 respectivement en C-5, C-8, C-12 et C-15 de l'AA et forment donc les 5-, 8-, 12- et 15-HPETEs (**Figure 1. 16**).

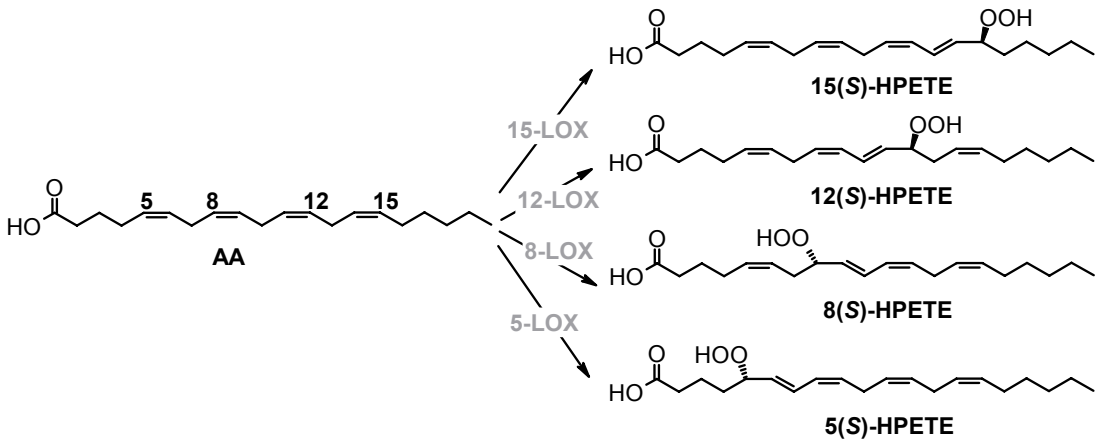


Figure 1. 16 Spécificité des LOXs d'origine animale

Ces intermédiaires instables peuvent ensuite être convertis en acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE) correspondant, soit de manière non enzymatique, soit par l'action d'une peroxydase.

Les produits issus de la voie des LOXs, aussi bien dans le règne animal que végétal, sont **principalement de stéréochimie *S***. Cependant, des produits de stéréochimie *R* ont déjà été observés, notamment dans des invertébrés aquatiques, des plantes et aussi chez l'homme (**point 3.1.4**). [Brash, 1999; Brash, 1996; Schneider, 2002a] Récemment, il a été montré qu'un seul résidu (une alanine hautement conservée chez les *S*-LOXs et une glycine chez les *R*-LOXs) contrôle la stéréochimie de la réaction catalysée par les LOXs. [Coffa, 2004]

3.1.3. Structure des LOXs

Les LOXs existent toutes sous forme de monomères et sont présentes dans le cytosol des cellules.

Les **LOXs végétales** sont des protéines d'environ 95 kDa, qui comptent approximativement 840 résidus. Les **LOXs animales**, par contre, sont plus petites, elles possèdent environ 670 acides aminés. Elles présentent, d'un règne à l'autre, environ 25% d'identité de séquence en acides aminés. Au sein d'une même espèce, par contre, des homologues fonctionnels partagent de 70 à 95 % d'identité de séquence. [Brash, 1999]

Actuellement, 18 structures de LOXs ont été résolues par DRX et sont répertoriées dans la banque de données PDB. Parmi celles-ci, on ne trouve qu'une seule structure de LOX animale, la 15-LOX de lapin co-cristallisée avec l'inhibiteur RS75091 [Gillmor, 1997], contre 17 structures de LOXs végétales. La structure de l'isoforme LOX-1 native, issue de graines de soja, a été élucidée [Boyington, 1993; Minor, 1996], de même que celle de différents mutants. [Tomchick, 2001] La LOX-3, elle, a été étudiée seule [Skrzypczak-Jankun, 1997] ou en complexe avec les composés naturels polyphénoliques curcumin [Skrzypczak-Jankun, 2000; Skrzypczak-Jankun, 2003] et quercétine [Borbulevych, 2004], avec le 4-nitrocatéchol [Skrzypczak-Jankun, 2004], ou encore en complexe avec un acide gras, l'acide 13(*S*)-hydroperoxy-9(*Z*),11(*E*)-octadécadiènoïque. [Skrzypczak-Jankun, 2001] Cette dernière structure cristallographique est la seule à présenter l'atome de fer sous forme activée Fe^{3+} (pour toutes les autres, l'enzyme est inactive, c'est-à-dire avec l'atome de fer sous forme Fe^{2+}).

3.1.3.1. **Reploiement général** [Boyington, 1993; Gillmor, 1997; Skrzypczak-Jankun, 1997]

Bien que la similarité de séquence entre les LOXs animales et végétales soit faible et donc, leur comparaison assez limitée, elles possèdent une **conformation globale semblable**, caractérisée par **deux domaines distincts** (**Figure 1. 17**).

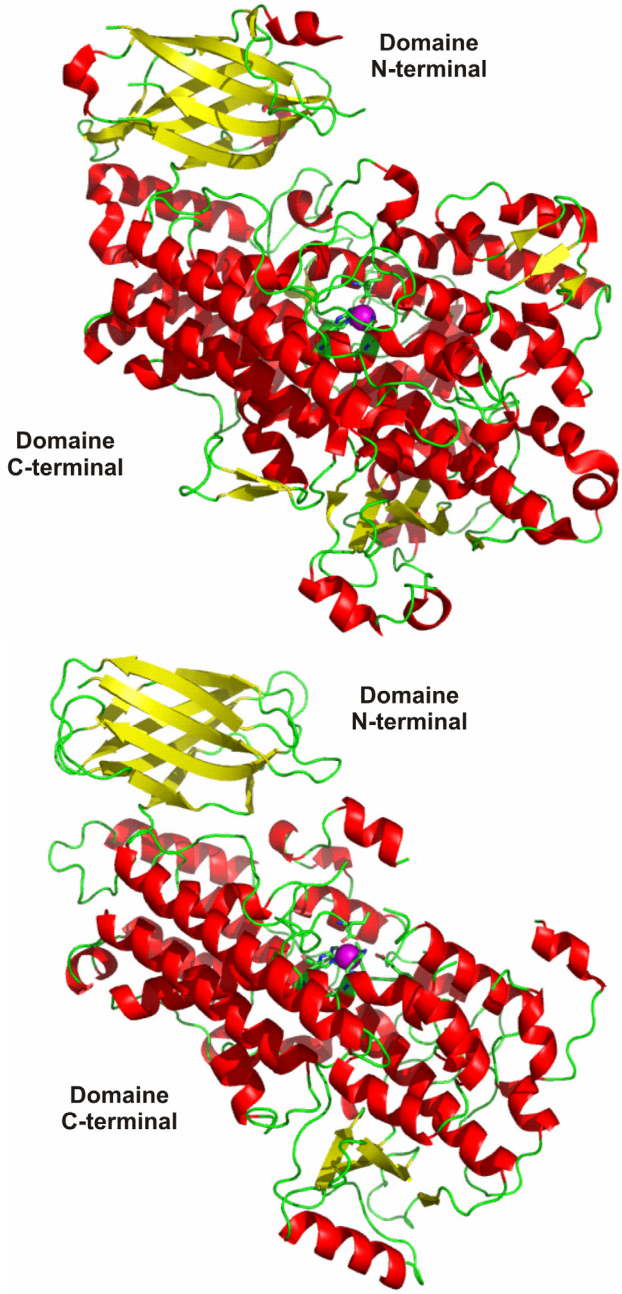


Figure 1. 17 Structure de la LOX-1 de soja (code PDB : 1F8N) en haut et de la 15-LOX de lapin (code PDB : 1LOX)[10] en bas. Les hélices sont représentées en rouge et les feuillets en jaune.

[10] Certains endroits dans la structure de la 15-LOX présentent des cassures. On peut notamment remarquer une interruption dans la structure d'une hélice (partie supérieure droite du domaine C-terminal). La résolution par DRX (2.4 Å) n'a pas pu fournir de coordonnées pour trois régions : résidus 177-188 ; 210-211 ; 601-602.

Le **domaine N-terminal** est constitué de deux couches de 4 feuillets-β anti-parallèles (motif de *β-barrel* ou domaine *β-sandwich*). Il est compact et séparé du reste de la protéine. Chez les LOXs animales, ce domaine est similaire en taille et en structure au domaine C-terminal de lipases pancréatiques. Il présente 23 % d'identité de séquence en acides aminés avec celui-ci, contre 11% avec celui des LOXs végétales. [Gillmor, 1997] Il jouerait un rôle dans l'interaction de la protéine avec les membranes lipidiques. [Chen, 2001] Remarquons que ce domaine en β-sandwich est un des membres définissant la famille de domaines **PLAT** (pour ***P**olycystin-1, **L**ipoxygenase, α-**T**oxin*). [Bateman, 1999]

De taille plus importante, le **domaine C-terminal** est principalement formé d'hélices (18 chez la 15-LOX et 23 chez la LOX-1) et contient l'atome de fer non hémique, essentiel à l'activité des LOXs. Deux longues hélices se trouvent au centre de ce domaine catalytique. Elles ont la particularité de présenter deux segments adoptant une conformation d'hélice π[11] (résidus 360-366 et 537-543 chez la 15-LOX et, résidus 495-506 et 685-690 chez la LOX-1). Ces fragments sont importants pour la structuration du centre catalytique car ils comportent plusieurs des résidus coordonnant l'atome de fer non hémique (3 chez la LOX-1 et 4 chez la 15-LOX).

3.1.3.2. Centre catalytique

Le centre catalytique des LOXs est constitué de l'atome de fer non hémique. Il est ancré au sein du site actif grâce à un motif structural dit de **triade faciale 2-His-1-carboxylate**. En fait, le complexe de coordination présente une géométrie octaédrique et une des faces de l'octaèdre est occupée par deux histidines et un groupement carboxylate (**Figure 1. 18**). Ce motif structural est observé dans de nombreuses enzymes présentant ce cofacteur métallique. [Hegg, 1997]

Pour la plupart des protéines présentant cette triade, le carboxylate correspond à la chaîne latérale d'un résidu acide, tel l'aspartate ou le glutamate. Chez les LOXs, par contre,

[11] Les hélices π sont caractérisées par la formation de ponts H entre les résidus *i* et *i+5* et non entre les résidus *i* et *i+4*. On les rencontre beaucoup plus rarement dans la nature, comparativement aux hélices α.

c'est le groupement carboxylate du résidu C-terminal (une isoleucine, conservée dans toutes les isoformes) qui coordonne l'atome de fer.

Deux des trois sites de coordination X, Y, Z sont occupés par une histidine et une asparagine chez les LOXs végétales et deux histidines chez la 15-LOX de lapin. Le dernier site de chélation peut être occupé par un ligand exogène, comme une molécule d'eau, un inhibiteur chélateur ou encore le substrat.

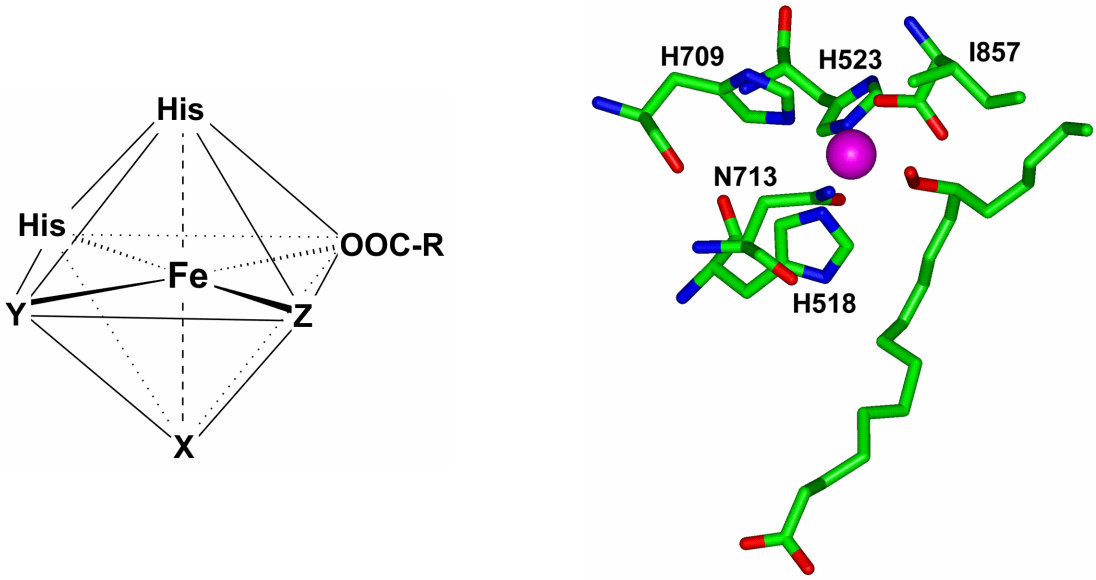


Figure 1. 18 Représentation schématique du complexe de coordination de l'atome de fer non hémique, caractérisé par un motif structural de triade faciale 2-His-1-carboxylate (à gauche) et centre de coordination du fer dans la LOX-3 de soja co-cristallisée avec un acide gras (code PDB 1IK3) (à droite)

3.1.3.3. Site actif 15-LOX, modèle d'interaction pour le substrat et spécificité de position de l'oxygénation

Le **site de liaison du substrat** a pu être clairement identifié grâce à l'inhibiteur compétitif RS75091 co-cristallisé avec l'enzyme. C'est une **cavité en forme de botte**, coudée au niveau de centre de coordination de l'atome de fer, directement accessible depuis la surface de l'enzyme (**Figure 1. 19** et **Figure 1. 20a**). Elle est définie à la base par les résidus Met419 et Ile418. Les « murs » sont principalement **hydrophobes** et à l'entrée de la cavité, se trouve une arginine (Arg403). [Borngraber, 1999]

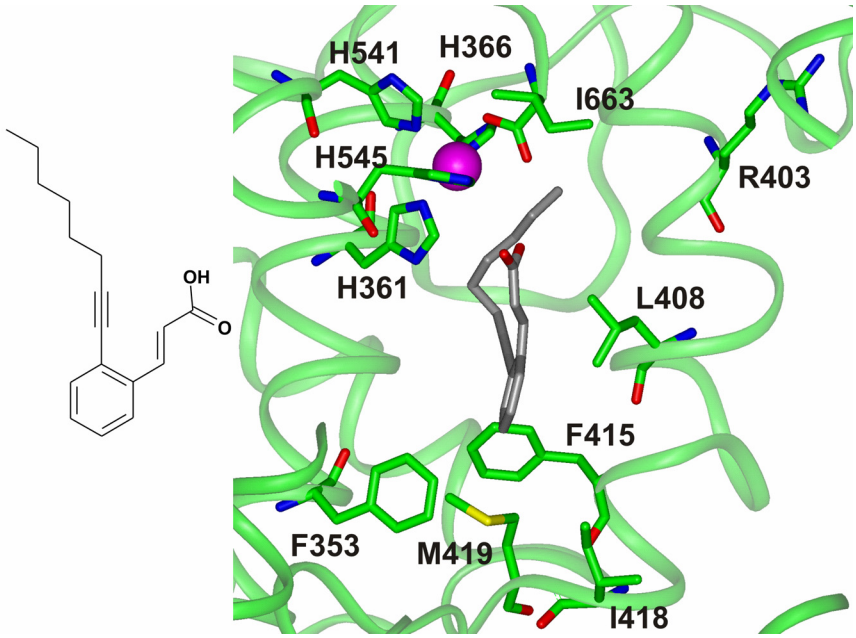


Figure 1. 19 Site actif de la 15-LOX de lapin, complexée avec l'inhibiteur RS75091

Sur base de cette structure cristallographique, Gillmor a proposé un **modèle d'interaction pour l'AA** [Gillmor, 1997]: l'acide gras adopterait une conformation étendue avec son extrémité méthyle enfouie profondément dans la poche hydrophobe et sa terminaison carboxylate « attachée » à la surface de l'enzyme par l'Arg403 (**Figure 1. 20a**). Ce modèle est validé par différents résultats de mutagenèse dirigée. [Borngraber, 1999; Chen, 1993; Gan, 1996; Sloane, 1991]

Par ailleurs, Gillmor a également proposé une **hypothèse** expliquant la **spécificité de position de l'oxygénation de l'AA des 5-, 12- et 15-LOXs**. L'AA adopterait la même orientation dans chaque isoforme : l'extrêmité méthyle serait enfouie dans la poche hydrophobe, assez bien conservée mais de volume différent pour chaque enzyme, tandis que le groupement carboxylate serait lié à la surface de la protéine par un résidu chargé positivement, une arginine ou une lysine (**Figure 1. 20**). [Gillmor, 1997]

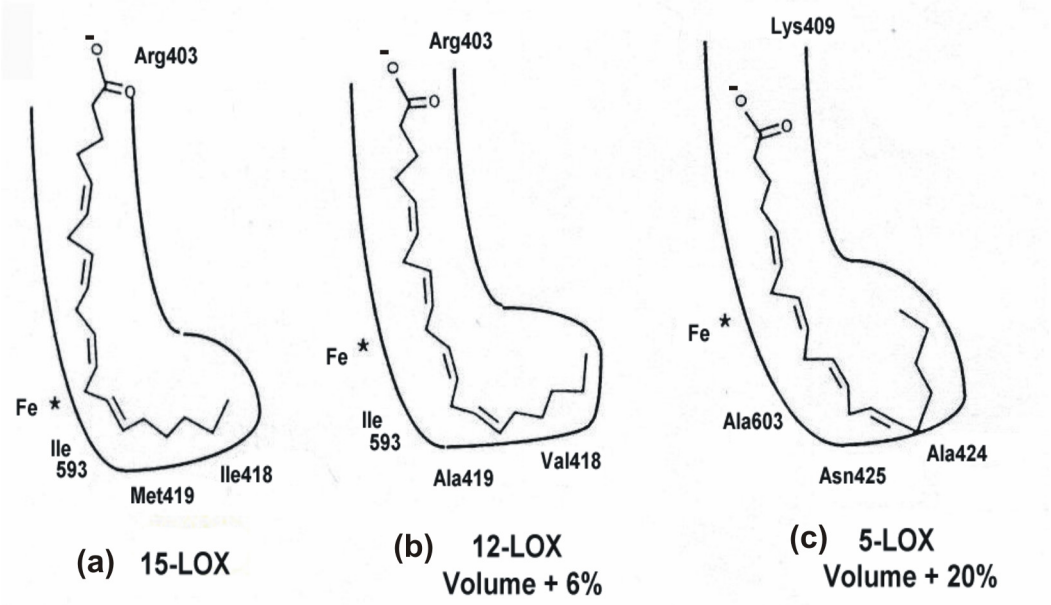


Figure 1. 20 Modèle proposé pour expliquer la spécificité de position de l'oxygénation de l'AA par les 15- (a), 12- (b) et 5-LOXs (c), en fonction du volume de leur site actif respectif

L'Ile418 et la Met419 chez la 15-LOX sont plus volumineuses que les résidus correspondants (Ala et Val) chez la 12-LOX. Cette différence de près de 6% dans le volume du site actif de cette dernière permettrait à l'AA de faire pénétrer trois groupements méthylènes de plus par rapport à la 15-LOX et mènerait à l'abstraction de l'hydrogène de l'atome C-10. Chez la 5-LOX, les résidus Ala424, Asn425 et Ala603 augmente le volume d'environ 20%. L'AA pourrait donc s'insérer plus profondément dans la poche et positionner l'atome C-7 à proximité du centre catalytique. [Gillmor, 1997]

Ce modèle est en accord avec des études de mutagenèse dirigée montrant que la spécificité de position de l'oxygénation de l'AA est déterminée par le volume à la base du site actif et non par la nature des résidus bordant la cavité. [Borngraber, 1999; Sloane, 1991]

Notons qu'un second modèle a été proposé pour rendre compte de la spécificité de position des LOXs. [Prigge, 1997] Contrairement au modèle de Gillmor (**modèle basé sur le volume de la cavité**), il suggère une orientation différente de l'AA au sein du site actif 5-LOX, comparativement à son orientation au sein des 12- et 15-LOXs (**modèle basé sur l'orientation du susbtrat**). L'acide gras pénètrerait dans la cavité avec son groupement carboxylate en premier. De cette manière, l'atome C-7 serait correctement positionné, à proximité du centre catalytique, et l'hydrogène pro-*S* pourrait être arraché. [Prigge, 1998]

Bien que ce modèle concorde parfaitement avec la stéréochimie *S* des produits formés, il implique d'enfouir une charge négative dans une cavité hydrophobe, ce qui

représente une barrière énergétique importante [Browner, 1998; Funk, 1997] et semble donc peu probable.

3.1.4. Rôles biologiques des LOXs

Rappelons que sur base des relations phylogénétiques existant entre les isoformes LOXs, quatre groupes d'enzymes peuvent être distingués (**point 3.1.1**) : (i) les 5-LOXs, (ii) les 12-LOXs de type plaquettaire, (iii) les 15/12-LOXs (15-LOX-1 de type réticulocytaire et 12-LOX de type leucocytaire, les deux présentant une spécificité de position mixte) et (iv) les LOXs de type épidermique (12(*R*)-LOX, 15-LOX-2, 8-LOX). Alors que la voie de la 5-LOX a été largement étudiée (cfr **point 3.2**), le rôle biologique des autres isoformes au sein de l'organisme n'est pas encore bien clarifié.

- **15/12-LOXs** [Kuhn, 1995; Kuhn, 2002]

La **15-LOX de type réticulocytaire** (15-LOX-1), d'abord découverte à partir de réticulocytes de lapin, a également été purifiée à partir d'éosinophiles humains [Sigal, 1988] mais n'a pas encore été isolée chez d'autres mammifères. Par contre, une **12-LOX de type leucocytaire** a été identifiée chez la souris, le cochon et le rat. Elle présente les mêmes propriétés enzymatiques (spécificité de substrat, cinétique de réaction, etc.) et partage 99 % d'identité de séquence avec la 15-LOX réticulocytaire. Elle serait donc l'équivalent fonctionnel de la 15-LOX-1 dans ces espèces.

La 15-LOX de type réticulocytaire reconnaît une **large variété de substrats** : elle transforme l'AA et les acides linoléique et α-linolénique, mais également les esters lipidiques, tels que les phospholipides et les esters de cholestérol, et des assemblages complexes de protéines-lipides, comme les biomembranes ou les lipoprotéines. Elle présente une **spécificité de position mixte** pour l'oxygénation de l'AA.

Son implication dans différents processus physio(patho)logiques est avancée.

La 15-LOX-1 est impliquée dans le **développement cellulaire** et la **différenciation** de certaines cellules comme les réticulocytes, les cellules trachéobronchiales et les macrophages. [Kuhn, 1999]

Des taux élevés de produits dérivés de la 15-LOX-1 (15*S*-HETE et 13*S*-HODE[12]) ont été observés pendant la réponse inflammatoire et ils présenteraient des **propriétés anti-inflammatoires**. [Dailey, 1999] L'activité *in vivo* de l'enzyme serait donc une réponse protectrice pour limiter les symptômes inflammatoires.

Par contre, au sein de l'épithélium respiratoire, son rôle est loin d'être compris. On observe une augmentation de son expression dans des conditions d'**asthme bronchique**. [Kuhn, 2002]

La 15-LOX-1 a également été impliquée dans la **carcinogenèse** et est l'objet de controverses. D'une part, il a été montré que l'enzyme est surexprimée dans les tumeurs du côlon. [Ikawa, 1999] D'autre part, une diminution de son expression a été associée au cancer du côlon et le 13*S*-HODE aurait un effet anti-tumoral en supprimant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose. [Shureiqi, 2001]

Enfin, un **rôle pro-athérogène** de la 15-LOX-1 a été montré dans des modèles murins d'athérosclérose. Son mécanisme d'action n'est pas encore clarifié mais l'enzyme est capable d'oxyder les lipoprotéines de basse densité (LDL) en leur forme athérogène. [Kuhn, 1995] Par ailleurs, elle produit des composés qui agissent comme molécules signal et initient des processus athérogènes tels que la migration et la prolifération cellulaire, l'expression de molécules d'adhésion. [Kuhn, 2002]

- **12-LOXs de type plaquettaire**

La 12-LOX de type plaquettaire présente entre 60 et 70 % d'identité de séquence avec l'isoforme de type leucocytaire. [Yoshimoto, 1995] Contrairement à cette dernière qui peut métaboliser l'AA ou l'acide linoléique en 12*S*-HETE ou 15*S*-HETE, la 12-LOX plaquettaire convertit uniquement l'AA en 12*S*-HETE. Elle joue un rôle majeur dans l'**agrégation des thrombocytes** mais également dans le processus de **prolifération cellulaire et de survie** (notamment dans le cancer de la prostate) [Steele, 1999], ainsi que dans la **formation des métastases**. [Dailey, 1999]

Par ailleurs, la 12-LOX (plaquettaire et leucocytaire) est impliquée dans la biosynthèse de deux groupes d'eicosanoïdes biologiquement actifs, les hépoxillines et les lipoxines. [Yamamoto, 2005; Yoshimoto, 1995]

[12] Le **13*S*-HODE** (acide 13-*S*-hydroxyoctadécadiénoïque) est le produit de la réaction de la 15-LOX avec l'acide linoléique (introduction de l'oxygène en C-13).

Les **hépoxillines A_3 et B_3** sont des dérivés 8- et 10-hydroxy-11,12-époxy de l'AA. [Pace-Asciak, 1995] Elles présentent des activités biologiques variées en relation avec la libération de Ca^{2+} intracellulaire et l'ouverture des canaux potassiques.

Les **lipoxines A_4 et B_4** sont des dérivés trihydroxy de l'AA qui comportent un tétraène conjugué. La 12-LOX est impliquée dans la **biosynthèse transcellulaire** de ces composés, à partir du LTA_4. [Serhan, 1995] Ils fonctionnent comme signal endogène de ralentissement dans les réactions de défense de l'hôte, d'inflammation et d'hypersensibilité. [Yamamoto, 2005]

- **LOXs de type épidermique**

La classe des LOXs de type épidermique est constituée des 15-LOX-2, 8-LOX et 12*R*-LOX.

La **12*R*-LOX**, récemment découverte chez l'homme, présente une distribution tissulaire très limitée ; on la trouve uniquement dans la peau normale et souffrant de psoriasis ainsi que dans les amygdales. Des taux élevés de 12*R*-LOX et de 12*R*-HETE ont d'ailleurs été associés au **psoriasis** et à d'autres dermatoses prolifératives de la peau. [Schneider, 2002a]

La **8-LOX** est présente chez la souris mais n'a pas été identifiée chez l'homme. Avec 78 % d'identité de séquence en acides aminés, elle est proche de la **15-LOX-2** humaine. Elles présentent des fonctions biologiques équivalentes. En effet, la 8-LOX est impliquée dans la **différenciation** des kératinocytes, en produisant du 8*S*-HETE qui active spécifiquement le récepteur nucléaire PPAR-α. La 15-LOX-2, elle, forme du 15*S*-HETE, activateur du récepteur nucléaire PPAR-γ et est engagée dans la différenciation des sébocytes. [Furstenberger, 2002]

Remarquons que le **8*S*-HETE** a déjà été observé, en faible quantité, chez l'homme. Il proviendrait du métabolisme de l'AA par la P450 monooxygénase ou d'une peroxydation lipidique non-enzymatique. [Furstenberger, 2002] Il peut, par ailleurs, être oxydé par la 15-LOX-2 en **8*S*,15*S*-diHETE**, produit également activateur de PPAR-α. [Jisaka, 2005]

Les rôles biologiques de ces isoformes sont loin d'être totalement identifiés. Sur base du concept de la cascade de l'AA, les LOXs sont impliquées dans la biosynthèse d'hormones lipidiques. Toutefois, de par leurs propriétés enzymatiques, certaines d'entre elles jouent également un rôle biologique important, en-dehors de la cascade de l'AA.

3.2. *Voie de la 5-LOX [Goodman, 1996; Samuelsson, 1983]*

La **5-LOX** est, d'un point de vue biologique, la plus importante des LOXs. Elle est impliquée dans la formation des **leucotriènes** (LTs). Le nom de ces médiateurs pro-inflammatoires reflète d'une part, leur découverte dans les leucocytes et d'autre part, leur structure caractéristique de triène conjugué. [Samuelsson, 1983]

3.2.1. Biosynthèse des leucotriènes

La 5-LOX est une enzyme bifonctionnelle. En effet, elle catalyse les deux premières étapes de la biosynthèse des LTs (Figure 1. 21) : d'abord, l'oxygénation de l'AA menant au **5*S*-HPETE** et ensuite, la déshydratation de ce hydroperoxyde pour donner l'époxyde **LTA_4**. [Rouzer, 1986; Shimizu, 1984]

A partir de cet intermédiaire instable, deux voies métaboliques sont possibles. D'une part, le LTA_4 peut être converti en **LTB_4** par la LTA_4 hydrolase. [Samuelsson, 1989] D'autre part, il peut être conjugué au tripeptide glutathion par la LTC_4 synthase pour donner le LTC_4. Celui-ci peut ensuite, être métabolisé en LTD_4 par clivage de l'acide glutamique par la γ-glutamyl-transférase. A son tour, le LTD_4 peut être converti en LTE_4 suite à l'élimination de la glycine par une dipeptidase. Ces composés **LTC_4, D_4 et E_4** sont également appelés **cystéinyl- ou peptido-LTs**.

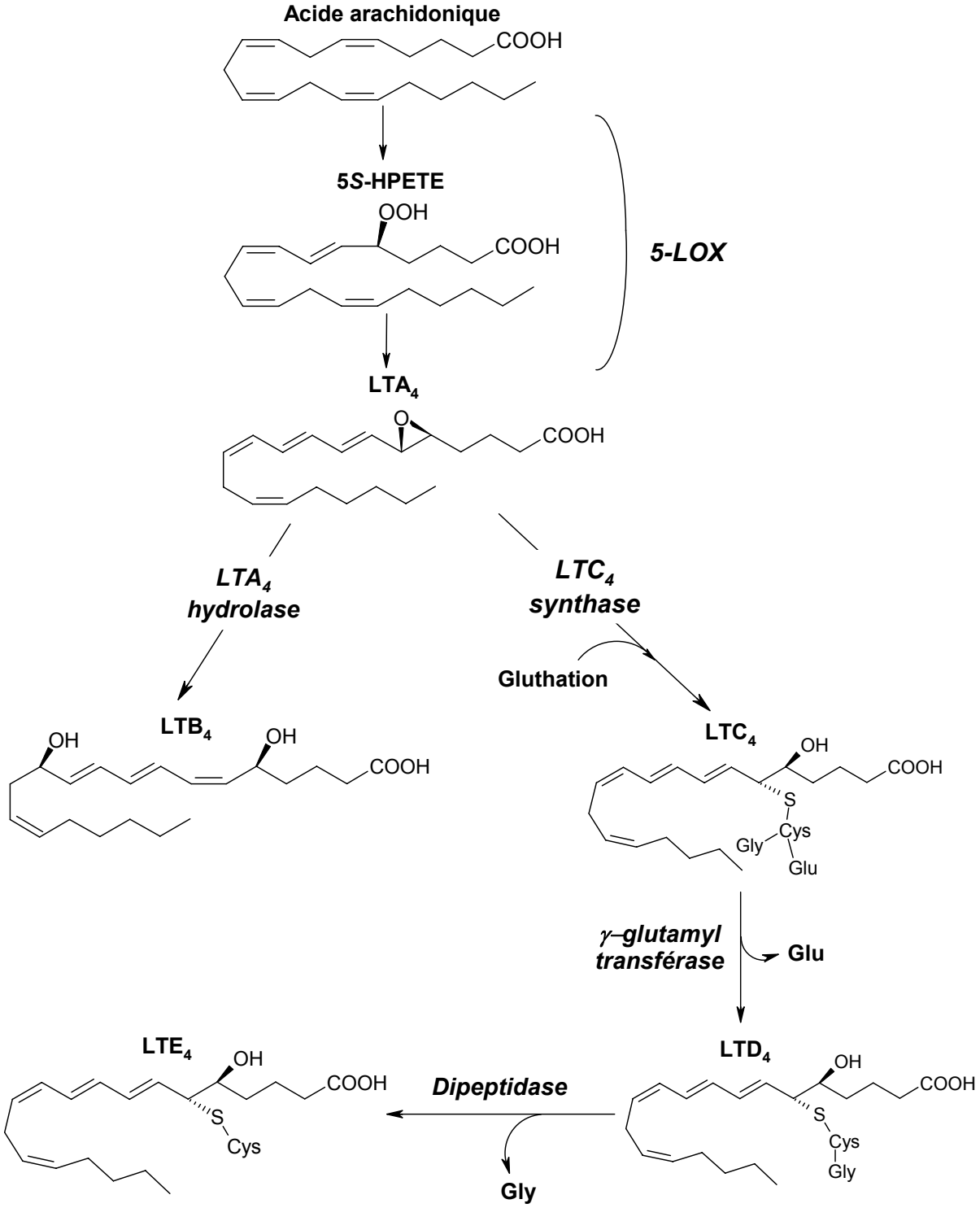


Figure 1. 21 Biosynthèse des leucotriènes

3.2.2. Distribution tissulaire des enzymes impliquées dans cette voie [Haeggstrom, 2002]

Au contraire des prostanoïdes, les LTs sont synthétisés de manière prépondérante par les **cellules inflammatoires**, comme les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages et les mastocytes. Cependant, celles-ci, selon leur équipement enzymatique, n'expriment pas tous les composants de cette voie.

La **5-LOX** est spécifiquement exprimée dans les cellules d'origine myéloïde comme les leucocytes polymorphonucléaires, les macrophages, les monocytes, les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes B. [Steinhilber, 1999]

La **LTA_4 hydrolase**, par contre, est plus largement distribuée : on la retrouve dans l'intestin, la rate, les poumons, mais aussi au niveau du sang dans les neutrophiles, monocytes, lymphocytes et érythrocytes.

La **LTC_4 synthase** possède également une large distribution. Elle est présente dans les myélocytes, mastocytes, éosinophiles mais également dans les cellules endothéliales, plaquettes et cellules musculaires lisses.

Cette large répartition permet la production de LTs à partir de cellules qui ne possèdent pas la 5-LOX et ce, par un **métabolisme transcellulaire**. [Lewis, 1990] En effet, à condition que le substrat LTA_4, fourni par les cellules possédant la 5-LOX, soit disponible dans le liquide extracellulaire, il peut être exporté vers d'autres cellules possédant les enzymes capables de le métaboliser.

Ainsi, le LTA_4 produit en excès dans le milieu extracellulaire par les leucocytes polymorphonucléaires peut être métabolisé en LTB_4 au niveau des érythrocytes par la LTA_4 hydrolase ou encore en LTC_4 dans les cellules endothéliales par la LTC_4 synthase. (**Figure 1. 22**)

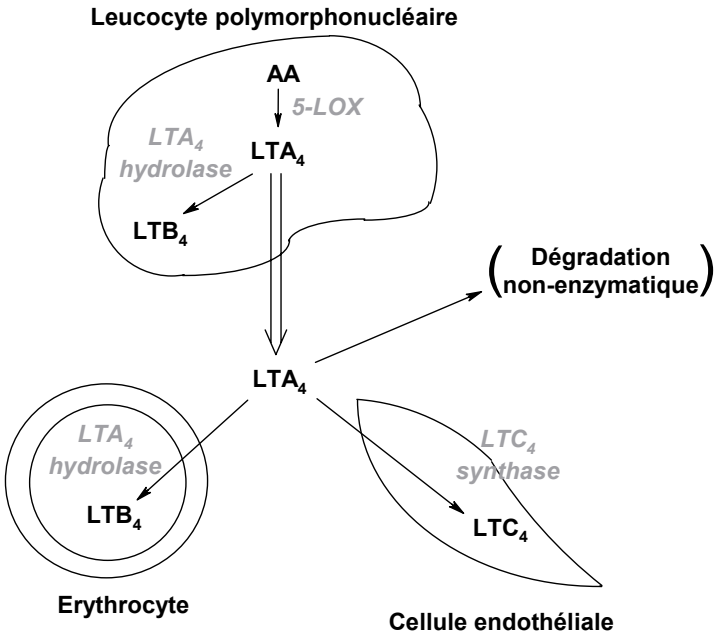


Figure 1. 22 Métabolisme transcellulaire du LTA_4 à partir d'un leucocyte polymorphonucléaire

L'interaction des différentes cellules au niveau enzymatique permet donc une **amplification de la synthèse des LTs** et donc, de leur impact physiopathologique.

3.2.3. Réponses biologiques associées aux leucotriènes [Hay, 1995; Lewis, 1990; Samuelsson, 1983]

Les LTs sont des **hormones paracrines**, interagissant avec des récepteurs spécifiques couplés à une protéine G. Ils présentent un large spectre d'activités biologiques. [Haeggstrom, 2002] Par ailleurs, au sein du noyau, les LTs peuvent engendrer une **réponse génomique**. Le LTB_4, notamment, peut se lier au **récepteur nucléaire PPAR-α** et activer de ce fait, la transcription de certains gènes cibles. [Funk, 2001]

Le **LTB_4** est un **agent chémotactique** puissant pour les neutrophiles, les macrophages et les éosinophiles. Il intervient donc dans la migration des leucocytes du sang vers les sites d'inflammation. En activant les neutrophiles, il provoque d'une part, leur dégranulation avec libération d'enzymes lysosomiales et génération de superoxyde, et d'autre part, il accroît leur adhésion à l'endothélium vasculaire et leur migration au travers de ce dernier. Il stimule la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les lymphocytes, et joue donc un rôle important dans les réponses immunologiques.

Les **cystéinyl-LTs** (LTC_4, D_4 et E_4) forment le mélange des **« substances à réaction lente de l'anaphylaxie »**[13] initialement découvert en 1940. Ce sont des médiateurs des **réactions immédiates d'hypersensibilité**. [Ford-Hutchinson, 1994] Ils sont de puissants constricteurs des muscles lisses (de 100 à 1000 fois plus puissants que l'histamine), particulièrement au niveau des voies aériennes où ils provoquent une importante **bronchoconstriction**. Au niveau de la micro-circulation, ils contractent les cellules musculaires lisses adjacentes aux cellules endothéliales, augmentant de ce fait la perméabilité des vaisseaux et pouvant alors occasionner l'**apparition d'œdèmes** par extravasation du plasma. Au niveau des voies aériennes, ces composés stimulent également la **sécrétion de mucus** et jouent un rôle important dans la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques. Le **LTE_4** est moins puissant que les deux autres mais son effet dure plus longtemps. Par ailleurs, il possède des **propriétés chémoattractrices** pour les éosinophiles, cellules produisant les cystéinyl-LTs. Enfin, il a été montré, chez des cobayes, que ces LTs peuvent interagir avec des fibres sensorielles, modifiant leur excitabilité et conduisant à une libération accrue des tachykinines. [Haeggstrom, 2002; Hay, 1995]

Suite à leurs puissantes activités biologiques, les LTs sont des médiateurs chimiques importants dans un certain nombre de pathologies inflammatoires et désordres allergiques tels que l'arthrite rhumatoïde, la maladie inflammatoire de l'intestin, la colite ulcérative, le psoriasis, la rhinite allergique et, principalement, l'asthme bronchique. [Lewis, 1990; Samuelsson, 1983; Samuelsson, 1987] Plus récemment, la voie de la 5-LOX a également été associée avec l'athérosclérose [De Caterina, 2004; Kuhn, 2005; Mehrabian, 2003] et certains types de cancer (cfr **point 4.1**).

3.2.4. Caractéristiques de la 5-LOX

La 5-LOX a été caractérisée à partir d'un grand nombre de sources mammifères dont notamment, le rat et l'homme. [Chen, 1995; Dixon, 1988; Hogaboom, 1986] L'identité de séquence entre les différentes espèces est supérieure à 90 %. L'enzyme humaine est une protéine monomérique de 78 kDa comportant 673 acides aminés. [Ford-Hutchinson, 1994; Radmark, 2000]

[13] L'anaphylaxie est l'état d'un être vivant qui, sensibilisé par l'introduction d'un allergène dans son organisme, est susceptible de réagir violemment à l'introduction ultérieure d'une nouvelle dose, même minime, de cet allergène. [Mornin, 1995]

- **Expression génique**

Contrairement aux autres gènes lox, qui se trouvent sur le chromosome 17 et ont une taille comprise entre 7 et 21 kb [Funk, 2002], le gène de la 5-LOX humaine est localisé sur le chromosome 10. Il compte plus de 82 kb, avec 14 exons séparés par 13 introns. [Radmark, 1995] Il présente certaines caractéristiques des gènes domestiques, à savoir pas de boîte TATA et une région riche en GC dans le promoteur. [Funk, 1989] L'enzyme étant présente pratiquement uniquement dans les cellules d'origine myéloïde, il est clair que son expression est régulée de manière très efficace et en fonction du type de cellule. [Ford-Hutchinson, 1994] L'analyse de la séquence du promoteur du gène a permis la mise en évidence d'éléments de régulation *cis*, à savoir des sites de liaison pour les facteurs de transcription tels Sp-1, AP-2 et NF-κB. [Hoshiko, 1990]

- **Mutagenèse dirigée**

Comme les autres isoformes, la 5-LOX contient un atome de fer non hémique, essentiel à son activité catalytique. [Percival, 1991] La comparaison des séquences des différentes isozymes LOXs clonées, en combinaison avec différentes études de mutagenèse dirigée, a permis d'identifier les résidus coordonnant l'atome métallique. [Gillmor, 1997; Hammarberg, 1995; Ishii, 1992; Nguyen, 1991; Zhang, 1993; Zhang, 1992] Des études similaires ont également permis de mettre en évidence les résidus intervenant dans la spécificité de position de l'oxygénation [Schwarz, 2000; Schwarz, 2001], l'import de la protéine dans le noyau [Jones, 2002; Jones, 2003] et la stabilité de la protéine. [Okamoto, 2005] L'ensemble de ces données est repris à la **Figure 1. 23**. Pour faciliter la comparaison, les résidus correspondants chez la 15-LOX de lapin sont également présentés.

```
h5-LOX     D166 D176 W226 D229 F232 G239 N241 K351 D358 F359
r15-LOX    D164 D174 W223 D226 F229 G236 N238 K345 D352 F353

                  *         *
h5-LOX     H362 H367 L368 H372 L373 E376 H390 H399 K409 A410
r15-LOX    H356 H361 L362 H366 L367 E370 H384 H393 R403 A404

                                                     *    *
h5-LOX     L414 L420 A424 N425 D473 D496 D502 E504 H550 N554
r15-LOX    L408 I414 I418 M419 D464 D487 D493 E495 H541 H545


h5-LOX     G556 Q557 C561 N566 H600 A603 V604 L607 N669 S670
r15-LOX    G547 Q548 F552 N557 Q590 I593 V594 L597 N659 S660

                       *
h5-LOX     V671 A672 I673
r15-LOX    V661 A662 I663
```

Figure 1. 23 Données issues des expériences de mutagenèse dirigée et de la comparaison des séquences de LOXs (les résidus conservés parmi toutes les LOXs sont présentés en noir ; les résidus impliqués dans la spécificité de position de l'oxygénation et l'interaction avec le substrat sont en vert ; les résidus coordonnant l'atome de fer sont marqués d'une astérisque).

- **Enzymologie et régulation cellulaire de la 5-LOX** [Bigby, 2002; Radmark, 2000]

A la différence des autres isoformes, la 5-LOX est localisée dans le **cytosol** mais également dans le **noyau** de certains types de cellules, tels les macrophages alvéolaires. [Chen, 2001; Woods, 1995] Son activité est régulée, d'une manière complexe, par différents facteurs. [Werz, 2005]

La 5-LOX est **activée par** le **calcium**. Deux ions Ca^{2+} peuvent, en effet, se lier de manière réversible au domaine N-terminal de l'enzyme[14]. [Hammarberg, 2000; Hammarberg, 1999] La 5-LOX est également stimulée par des **nucléotides**, comme l'ATP, en présence de Ca^{2+} (**effet « co-stimulateur »**), par les hydroperoxydes lipidiques et la phosphatidylcholine (PC). [Falgueyret, 1995; Riendeau, 1989]

Lorsque la cellule est activée et que le taux de Ca^{2+} intracellulaire augmente, la 5-LOX, qu'elle soit cytosolique ou nucléaire, se **déplace jusqu'à l'enveloppe nucléaire** (**Figure 1. 24**). [Peters-Golden, 1998; Rouzer, 1987] Cette spécificité de translocation résulterait d'une grande affinité de l'enzyme pour la phosphatidylcholine (PC), particulièrement abondante dans les membranes nucléaires et périnucléaires. [Kulkarni, 2002] Elle interagit alors, avec une petite protéine membranaire de 18 kDa, dénommée

[14] Remarquons que la stimulation par le Ca^{2+} n'est pas indispensable à l'activité de l'enzyme purifiée mais, est essentielle lorsqu'elle se trouve dans une cellule intacte ou dans une préparation isolée incubée avec des membranes ou des phospholipides.

FLAP (*Five-Lipoxygenase Activating Protein*). [Kargman, 1992; Vickers, 1995] Elles forment ensemble un complexe stable. Bien que le mécanisme d'action de la FLAP ne soit pas encore bien compris, il semblerait que cette protéine présente ou transfère, à la 5-LOX, l'AA libéré des phospholipides membranaires par la PLA_2. Cette translocation et l'interaction avec la FLAP sont indispensables à la biosynthèse des LTs. [Dixon, 1990; Miller, 1990]

Il a été récemment montré que le domaine N-terminal de type cylindre-β de la 5-LOX est essentiel pour son déplacement jusqu'à l'enveloppe nucléaire. Il gouvernerait, comme le **domaine C2**[15] de la protéine kinase C (PKC) ou de la PLA_2 cytosolique, la translocation de l'enzyme jusqu'à l'enveloppe nucléaire. [Allard, 2005; Chen, 2001]

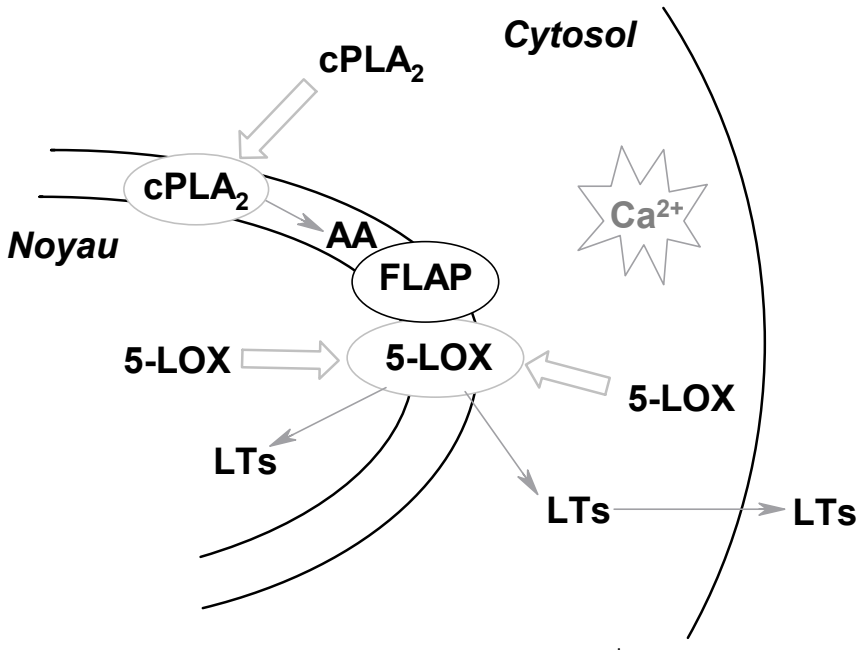


Figure 1. 24 Voie cellulaire de la 5-LOX.

Lors de l'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+}, la cPLA2 (phospholipase A_2 cytosolique) et la 5-LOX, qui se trouve dans le cytosol et le noyau, se déplacent jusqu'à l'enveloppe nucléaire. La 5-LOX interagit alors avec la FLAP (*five lipoxygenase activating protein*). Celle-ci lui transfère l'AA (acide arachidonique) libéré des phospholipides membranaires par la $cPLA_2$. La biosynthèse des LTs (leucotriènes) peut alors avoir lieu. Ceux-ci, au sein du noyau, engendrent une réponse génomique, tandis que ceux libérés dans le cytosol sortent de la cellule et vont soit interagir avec des récepteurs situés sur des cellules voisines, soit subir un métabolisme transcellulaire.

Par ailleurs, il a été montré que deux types de kinases, les p38 MAPK kinases et ERK1/2, phosphorylent la 5-LOX (aux positions Ser271 et Ser663, respectivement) et

[15] Rappelons que le domaine *β-sandwich* des LOXs appartient à la famille de **domaines PLAT** (cfr **point 3.1.3.1**). Cette famille est elle-même une sous-classe des **domaines C2**. Ces deux types de domaines présentent donc des caractéristiques structurales communes. [Allard, 2005]

interviennent, de cette façon, dans l'activation de l'enzyme et sa translocation jusqu'à l'enveloppe nucléaire. [Werz, 2002a; Werz, 2000] L'efficacité de la phosphorylation est augmentée en présence d'acides gras polyinsaturés. [Werz, 2002b] Ces kinases n'affectent pas l'activité enzymatique de l'enzyme mais régulent plutôt son interaction avec des composants cellulaires. [Werz, 2005]

3.3. Différentes approches thérapeutiques pour inhiber la biosynthèse des LTs

Vu les propriétés pro-inflammatoires du LTB_4 et les multiples activités des cystéinyl-LTs, la modulation de cette voie pourrait avoir d'importantes implications dans le traitement de maladies comme l'asthme [Kontogiorgis, 2002; Wenzel, 1998], les allergies et tout désordre inflammatoire. [McMillan, 1992; Musser, 1992] Différentes stratégies ont été développées pour empêcher l'action des LTs. [Brooks, 1996; Julemont, 2003; Young, 1999]

D'une part, vu le cycle catalytique de la 5-LOX, il est possible de bloquer son activité soit en interférant avec le cycle redox, soit en chélatant l'atome de fer, ou encore, en entrant en compétition avec l'AA pour occuper le site actif de l'enzyme (**inhibition directe**).

D'autre part, il est également possible d'inhiber son interaction avec la FLAP, empêchant de ce fait le transfert du substrat vers la 5-LOX (**inhibition indirecte**).

3.3.1. Inhibition directe

- **<u>Inhibiteurs redox ou antioxydants</u>**

Les inhibiteurs redox de la 5-LOX sont généralement de petites molécules aromatiques mono- ou polycycliques (de type catéchol, quinone, phénol, etc.). Il est difficile de définir des relations structure-activité pour les nombreuses familles existantes. Toutefois, en plus de leur faible potentiel redox, la lipophilie est une caractéristique importante pour leur activité inhibitrice. [Hammond, 1989]

Ces agents, réducteurs à un électron, entrent en compétition avec l'AA pour occuper le centre catalytique (l'atome de fer). Ils peuvent alors agir comme un substrat alternatif pour la 5-LOX et être oxydés par un transfert radicalaire, convertissant de ce fait l'atome de fer activé (Fe^{3+}) en Fe^{2+} inactif. Ils détournent donc l'enzyme de sa tâche normale. [Dailey, 1999]

Les prototypes de cette classe sont les dérivés pyrazoline : phénidone et BW-755C (**Figure 1. 25**). [McMillan, 1992] L'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) est très utilisé dans les études pharmacologiques. [Dailey, 1999]

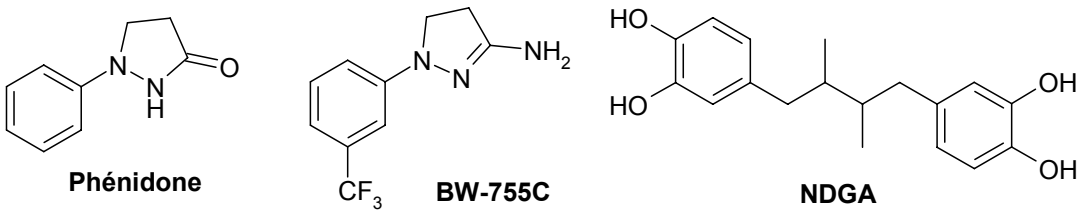


Figure 1. 25 Quelques inhibiteurs redox de la 5-LOX

Bien que beaucoup de ces composés présentent une inhibition puissante de la 5-LOX, ils possèdent également de nombreux effets secondaires, soit par interférence directe avec d'autres processus biologiques de type redox, soit par production d'espèces radicalaires réactives. [Ford-Hutchinson, 1994] Ils provoquent principalement de la génotoxicité et la formation de méthémoglobine[16]. [Young, 1999] Ces problèmes, liés à l'activité redox ont d'ailleurs été jugés trop importants que pour justifier le développement de ces composés. [Young, 1999]

Remarquons néanmoins que quelques inhibiteurs de la 5-LOX de type anti-oxydant ont démontré une efficacité clinique, principalement suite à une application topique : le lonapalène (RS-43179) et le R-68151 dans le psoriasis [Young, 1999], le docébénone (AA-861) dans les rhinites allergiques (**Figure 1. 26**). Leur spécificité vis-à-vis de la 5-LOX est, cependant, controversée. [Musser, 1992]

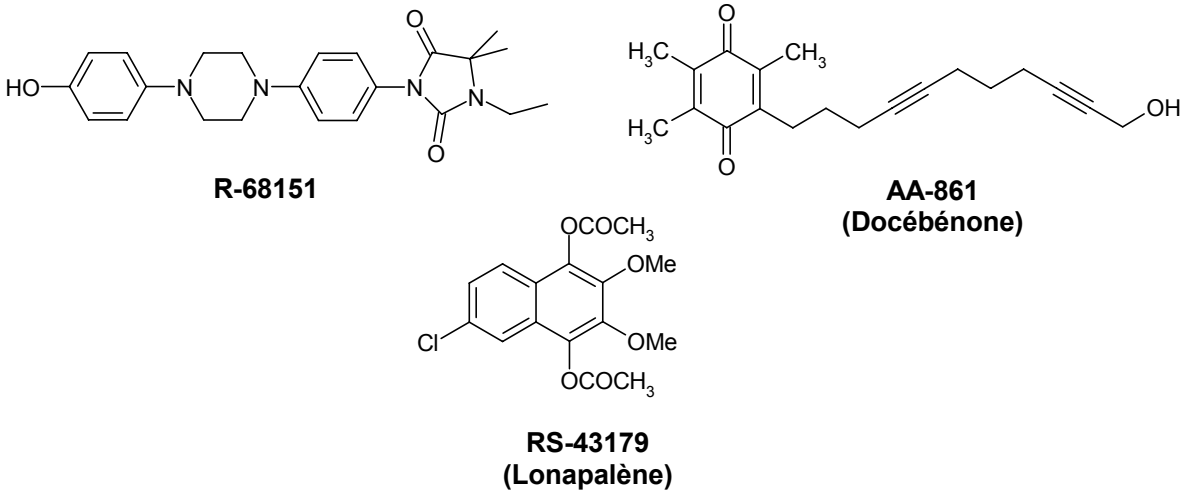


Figure 1. 26 Inhibiteurs redox de la 5-LOX présentant une efficacité clinique (application topique)

[16] La méthémoglobine est une molécule d'hémoglobine dont l'atome de fer est à l'état ferrique (oxydé, Fe^{3+}), ce qui la rend inapte au transport de l'oxygène. [Mornin, 1995]

- **Inhibiteurs chélateurs du fer**

La conception d'inhibiteurs capables de chélater l'atome de fer présent au sein de la 5-LOX s'est avérée être une démarche intéressante.

De nombreux inhibiteurs de la 5-LOX ont présenté, dans un premier temps, une fonction acide hydroxamique, un des ligands de métaux les plus puissants. [Muri, 2002] Bien que ces composés possèdent un pouvoir inhibiteur important *in vitro*, le groupement hydroxamate (type A, **Figure 1. 27**) est rapidement hydrolysé *in vivo* pour donner le carboxylate correspondant inactif. [Brooks, 1996]

Dans le but de réduire ce métabolisme hydrolytique, des modifications structurales importantes ont été effectuées : la substitution d'un groupement lipophile R_2 sur l'hydroxylamine a conduit aux acétylhydroxamates (type B, **Figure 1. 27**) tel que le BW-A4C (**Figure 1. 28**).

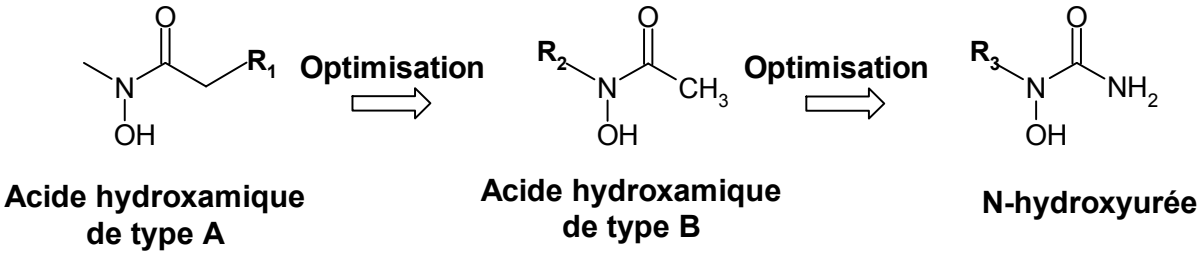
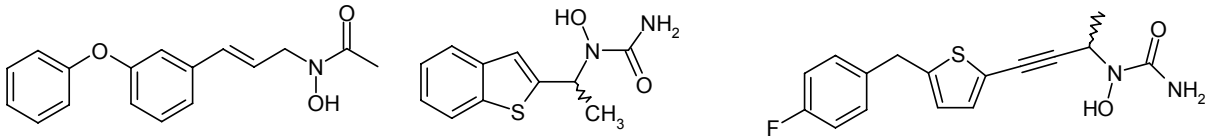


Figure 1. 27 Optimisation des inhibiteurs chélateurs du fer de la 5-LOX

Ces composés présentent encore, malgré tout, des problèmes de métabolisation *in vivo*, notamment de glucuronidation. D'autres études ont conduit à l'identification des N-hydroxyurées, plus stables du point de vue métabolique (**Figure 1. 27**). [Brooks, 1996]

Parmi celles-ci, le zileuton (Zyflo®, **Figure 1. 28**) est le premier inhibiteur sélectif de la 5-LOX mis sur le marché. [Wenzel, 1996] Il est indiqué dans le traitement de l'asthme chronique. Il présente cependant certains effets indésirables, notamment une toxicité hépatique. Des analogues du zileuton, possédant de meilleures propriétés pharmacocinétiques, ont été synthétisés, dont l'ABT-761 (**Figure 1. 28**), actuellement en essais cliniques de phase III, pour le traitement de la bronchoconstriction dans l'asthme. [McMillan, 1992; Muri, 2002]



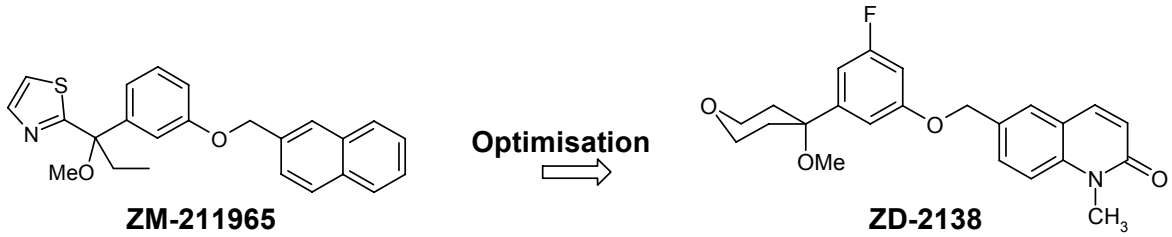
BW-A4C **Zileuton** **ABT-761 (Atreleuton)**

Figure 1. 28 Quelques inhibiteurs chélateurs du fer de la 5-LOX.

- **Inhibiteurs compétitifs non redox**

Vu les toxicités et difficultés multiples rencontrées dans le développement d'inhibiteurs redox et chélateurs de la 5-LOX, une autre stratégie a été développée : la recherche d'inhibiteurs dirigés contre le site actif de l'enzyme. [Brooks, 1996] Une meilleure connaissance de son mécanisme catalytique a d'ailleurs permis de définir des critères pour l'évaluation et l'identification d'inhibiteurs compétitifs non redox. [Falgueyret, 1993]

L'optimisation de dérivés arylméthoxythiazoles, comme le ZM-211965, a conduit à la découverte du composé ZD-2138, un inhibiteur compétitif non redox sélectif de la 5-LOX (**Figure 1. 29**). [Crawley, 1992] Il présente une activité inhibitrice 10 fois supérieure à celle du zileuton. [McMillan, 1992] Il a été évalué en essais cliniques pour le traitement de l'arthrite et l'asthme mais n'a pas été plus longuement développé suite à une faible efficacité au niveau des sites d'inflammation chronique.



ZM-211965 **ZD-2138**

Figure 1. 29 Optimisation d'inhibiteurs compétitifs non redox de la 5-LOX

Une série d'analogues, basés sur la justicidine E, composé naturel présentant une activité modérée, et sur le ZD-2138, a conduit à des molécules hybrides comme le L-697,198. [Ducharme, 1994] Plus puissantes que leur chef de file naturel, elles présentent une excellente biodisponibilité et activité orale mais également un métabolisme extensif au niveau du cycle pyrane (**Figure 1. 30**).

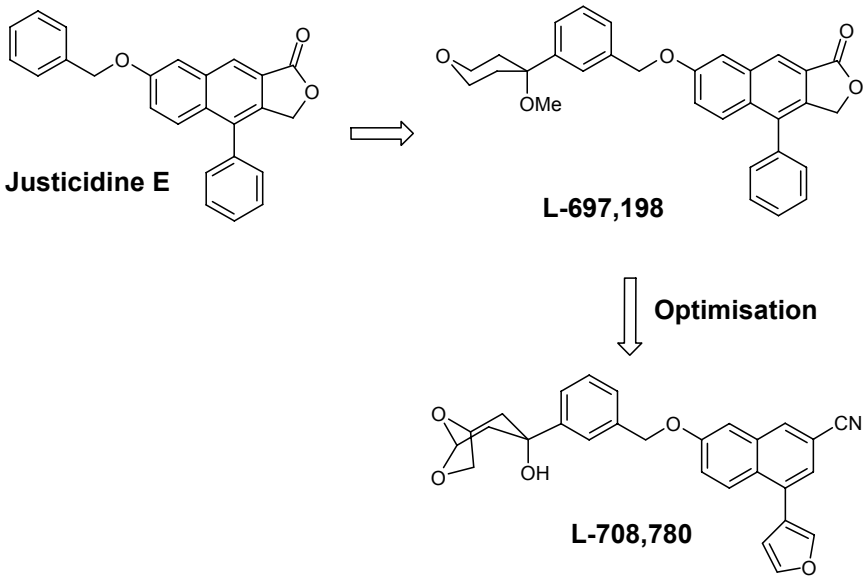


Figure 1. 30 Optimisation d'inhibiteurs compétitifs non redox de la 5-LOX (hybrides entre la justicidine E et le ZD-2138)

L'optimisation des propriétés pharmacocinétiques de ces composés a donné naissance à différentes molécules, dont le L-708,780 (**Figure 1. 30**). [Delorme, 1996] Néanmoins, le développement (clinique) de ces inhibiteurs n'a pas été poursuivi : d'une part, car il persiste des problèmes de métabolisation, de biodisponibilité et d'effets secondaires consécutifs à une forte liaison aux protéines plasmatiques, et d'autre part, car certaines firmes pharmaceutiques ont préféré se tourner vers le développement d'inhibiteurs indirects : les inhibiteurs de la FLAP (*Five-Lipoxygenase Activating Protein*).

3.3.2. Inhibition indirecte : les inhibiteurs de la FLAP

Le premier représentant de cette famille est le MK-886 (**Figure 1. 31**). Bien qu'il soit un puissant inhibiteur de la biosynthèse des LTs dans des cellules intactes, il n'a pas d'effet sur la 5-LOX purifiée. La recherche de sa cible moléculaire a permis de découvrir la **FLAP**. [Miller, 1990]

Le mode d'action proposé pour ce type d'inhibiteur repose sur l'inhibition de l'interaction entre la 5-LOX et la FLAP. [Vickers, 1995] En se liant à la FLAP, l'inhibiteur empêche son interaction avec la 5-LOX, le transfert de l'AA vers cette dernière et donc la biosynthèse des LTs.

Parallèlement à la famille des indoles comme le MK-886, une seconde classe d'inhibiteurs, de type quinoléine, s'est avérée présenter le même mode d'inhibition de la

biosynthèse des LTs par liaison à la FLAP. Un représentant de cette catégorie, le Bay-X-1005 (**Figure 1. 31**), est actuellement en développement clinique dans le traitement de l'asthme. [Young, 1999]

Des molécules hybrides, les quindoles, basées sur les structures d'indoles et de quinoléines pré-citées, ont également vu le jour. Le MK-0591 (**Figure 1. 31**) est un puissant inhibiteur de la biosynthèse des LTs dans une grande variété de cellules intactes. [Brideau, 1992]

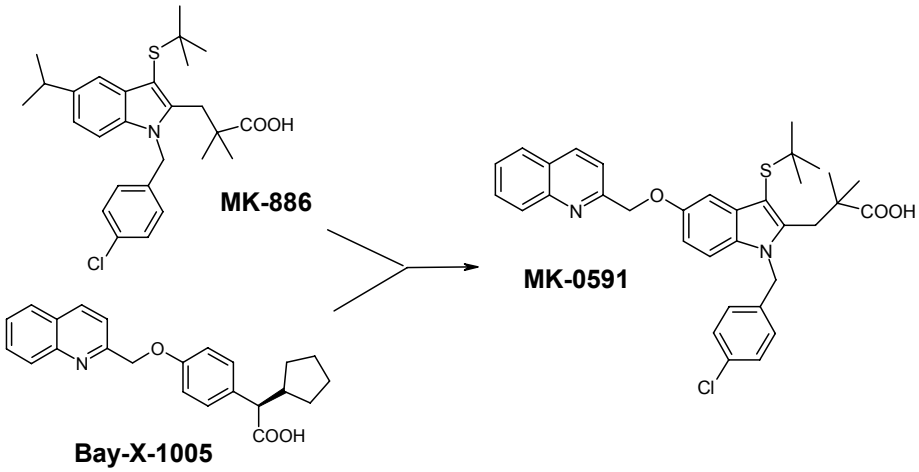


Figure 1. 31 Inhibiteurs de la FLAP

Notons que d'intenses efforts sont menés pour développer des médicaments à partir d'inhibiteurs directs ou indirects de la 5-LOX. Actuellement, un seul de ces composés, le zileuton (Zyflo®), a été mis sur le marché. Des problèmes de toxicité, pharmacocinétique ou tolérance ont souvent empêché la mise sur le marché de composés apparentés. [Young, 1999]

Une autre piste, également étudiée, concerne les **antagonistes des récepteurs aux LTs**. Ils présentent des propriétés intéressantes au niveau pharmacocinétique, toxicité et dans une certaine mesure, au niveau de leur efficacité. Certains antagonistes des récepteurs aux cystéinyl-LTs ont d'ailleurs déjà été commercialisés dans le traitement de l'asthme, comme le zafirlukast (Accolate®, Resma®) et le montélukast (Singulair®) (**Figure 1. 32**). [Diamant, 1998]

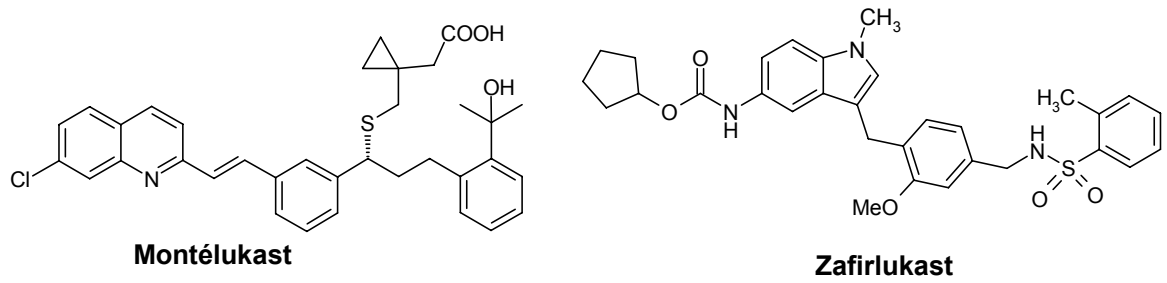


Figure 1. 32 Antagonistes des récepteurs aux LTs actuellement commercialisés

Ces composés, ainsi que les inhibiteurs de la 5-LOX, sont effectifs dans le traitement de l'asthme. Toutefois, ils n'inhibent pas la voie de biosynthèse des prostanoïdes, puissants médiateurs pro-inflammatoires, et s'avèrent donc être insuffisants pour combattre efficacement l'inflammation. Dès lors, de nouvelles stratégies sont envisagées, comme la conception d'inhibiteurs mixtes de la 5-LOX et de la COX-2 [de Leval, 2002], dont l'intérêt thérapeutique est explicité ci-après.

4. Inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2

Au vu des propriétés pro-inflammatoires des prostanoïdes et des leucotriènes, des agents thérapeutiques inhibant la production de ces deux types d'eicosanoïdes pourraient, non seulement, présenter un profil anti-inflammatoire amélioré, mais également provoquer moins d'effets secondaires.

Bien que cela puisse être réalisé par l'administration concomitante de deux composés inhibant chacun sélectivement une des deux cibles, une seule molécule à activité mixte éviterait les complications potentielles liées au dosage et aux interactions médicamenteuses causées par ce genre de multitraitement. [Dyer, 1997]

4.1. Intérêts pharmacologiques et thérapeutiques

Il a été montré que l'inhibition de la voie biosynthétique des COXs entraîne une **régulation positive** du métabolisme de l'AA par la voie de la 5-LOX [Gilroy, 1998], conduisant à des **effets indésirables potentiels**.

En effet, les LTs produits par la 5-LOX, et particulièrement le LTB_4, contribuent au développement et au maintien de l'inflammation, notamment en recrutant des leucocytes sur le site enflammé. [Fiorucci, 2001] Par ailleurs, les cystéinyl-LTs peuvent engendrer des

réactions allergiques et d'hypersensibilité, comme de l'asthme, chez les personnes sensibles. [Drazen, 1999] De plus, les LTs participent au développement des dommages gastro-intestinaux. [Asako, 1992] Le LTC_4, par son action vasoconstrictrice, diminue le flux sanguin et augmente de ce fait la sensibilité de la muqueuse gastrique. Le LTB_4, lui, aggrave les dégâts en stimulant l'infiltration de leucocytes au niveau de la muqueuse. Ceux-ci libèrent, entre autres, des protéases et radicaux libres pouvant causer une nécrose des tissus. [Parente, 2001]

Enfin, les COX-2 et 5-LOX sont impliquées dans le **développement et la progression de plusieurs cancers** chez l'homme. Ces deux enzymes apparaissent représenter un système intégré régulant les propriétés prolifératives et favorisant l'angiogenèse des cellules cancéreuses. [Romano, 2003] Elles sont surexprimées dans un grand nombre de cellules cancéreuses et de tumeurs, notamment au niveau du pancréas, du poumon, du côlon et de la prostate. [Rioux, 1998; Shureiqi, 2001; Steele, 1999; Subbaramaiah, 2003] Leur inhibition bloquent la progression du cycle cellulaire et induit l'apoptose. L'utilisation d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 offre donc de nouvelles perspectives dans le traitement préventif de ces cancers.

4.2. Familles d'inhibiteurs développées

Différentes familles d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 peuvent être recensées dans la littérature. [Charlier, 2003]

4.2.1. Di-tert-butylphénols

La classe des di-*tert*-butylphénols a été largement investiguée pour identifier des inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX. Les composés les plus représentatifs sont illustrés à la **Figure 1. 33**. La structure générale de 2,6-di-*tert*-butyl-1-hydroxy-benzène substitué en position 4 est optimale pour l'activité mixte, les substituants étant des hétérocycles à 5 ou 6 carbones, ou des chaînes alkyles.

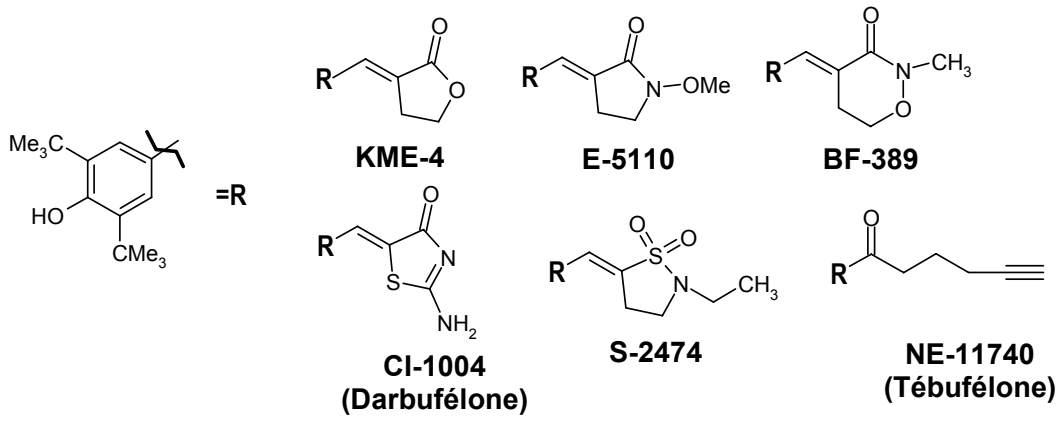


Figure 1. 33 Exemples d'inhibiteurs mixtes de type di-tert-butylphénol

Le groupement phénol confère à ces composés des propriétés anti-oxydantes, jugées responsables de leur activité anti-inflammatoire et de leur faible potentiel ulcérogène. [de Leval, 2002] Leur index thérapeutique, comparant leur efficacité et leur profil de sûreté gastro-intestinale, est uniformément supérieur à celui des AINS classiques. [Dyer, 1997]

Le S-2474, tout comme le darbufélone, est un inhibiteur sélectif 5-LOX/COX-2. Il est actuellement en développement pour le traitement de l'arthrite. [Inagaki, 2000]

Parmi les métabolites du tébufélone, le dérivé dihydro-diméthyl-benzofuranne (DHDMBF, **Figure 1. 34**) s'est avéré particulièrement intéressant. Bien que ce ne soit plus un phénol aux propriétés anti-oxydantes, il présente une activité anti-inflammatoire équivalente au tébufélone dans le modèle de l'œdème à la carragénine chez le rat. Des études complémentaires ont montré qu'il inhibe sélectivement la COX-2 et la 5-LOX et ont conduit à la synthèse de différents analogues, dont le PGV-20229 (**Figure 1. 34**). [Janusz, 1998a; Janusz, 1998b; Janusz, 1998c]

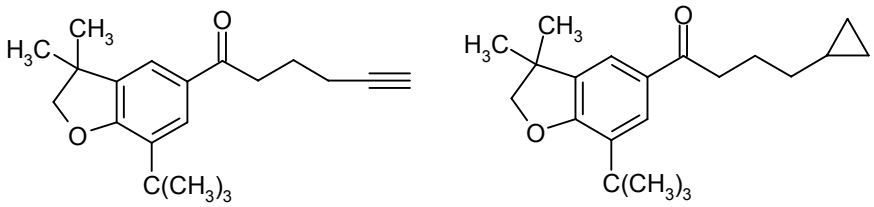
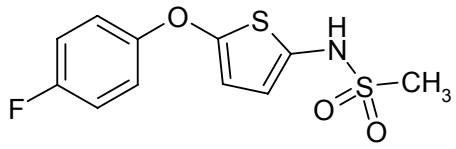


Figure 1. 34 Inhibiteurs dérivés du tébufélone

4.2.2. Dérivés thiophènes

Ils sont représentés par le composé RWJ-63556, inhibiteur sélectif COX-2/5-LOX (**Figure 1. 35**), apparenté au nimésulide, un inhibiteur sélectif COX-2. [Kirchner, 1997]



RWJ-63556

Figure 1. 35 Inhibiteur mixte de type thiophène

4.2.3. Dérivés pyrazoliniques

Les composés les plus documentés de cette classe sont la phénidone et le BW-755C (**Figure 1. 25**). Ces inhibiteurs anti-oxydants de la 5-LOX sont peu sélectifs et s'avèrent inhiber également les COXs. [de Leval, 2002]

4.2.4. AINS modifiés

Certaines modifications structurales apportées à des AINS classiques ou sélectifs de la COX-2 ont donné des composés présentant une activité mixte vis-à-vis des COX et de la 5-LOX. [Dyer, 1997]

Ainsi, la fonction carboxylique de l'indométhacine a été remplacée par une N-hydroxyurée (**Figure 1. 36**). Cela a conduit à des dérivés inhibant d'une part, la 5-LOX et d'autre part, agissant préférentiellement sur la COX-2. [Kolasa, 1997] Différents fénamates, dont l'acide flufénamique, ont également été convertis en inhibiteur mixte 5-LOX/COX, après substitution du groupement carboxylique par une 1,3,4-oxadiazole-2-thione (**Figure 1. 36**). [Boschelli, 1992]

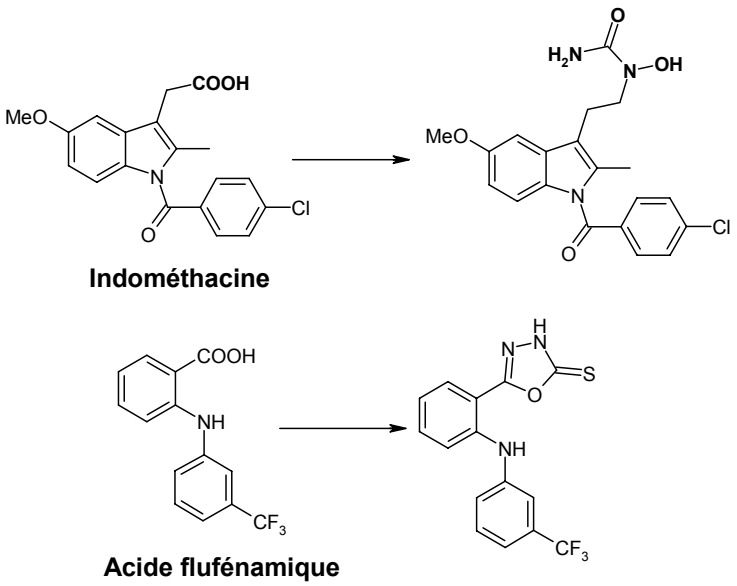


Figure 1. 36 Inhibiteurs mixtes dérivant d'AINS classiques

Des composés, apparentés aux inhibiteurs tricycliques sélectifs COX-2, tel que le célécoxib (cfr **point 2.4.2**), ont également vu le jour. Parmi ceux-ci, la tépoxaline est en développement clinique de phase II, en tant qu'agent anti-inflammatoire et anti-rhumatismal (**Figure 1. 37**). [Fiorucci, 2001]

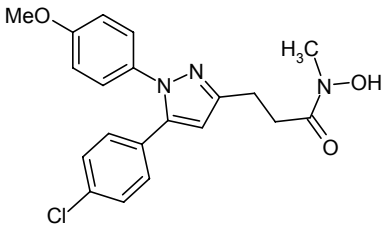


Figure 1. 37 Structure de la tépoxaline

La combinaison de caractéristiques d'inhibiteurs COX-2 et 5-LOX, à savoir la sulfone tricyclique (dérivée du célécoxib) et le groupement 4-méthoxytétrahydropyrane du ZD-2138, a également conduit à un inhibiteur sélectif COX-2/5-LOX, mais, cette fois, ne présentant pas de propriété redox ou chélatrice de fer (**Figure 1. 38**). [Barbey, 2002] L'analogue présentant une sulfonamide à la place de la sulfone présente des propriétés anti-tumorales particulièrement intéressantes. [Pommery, 2004]

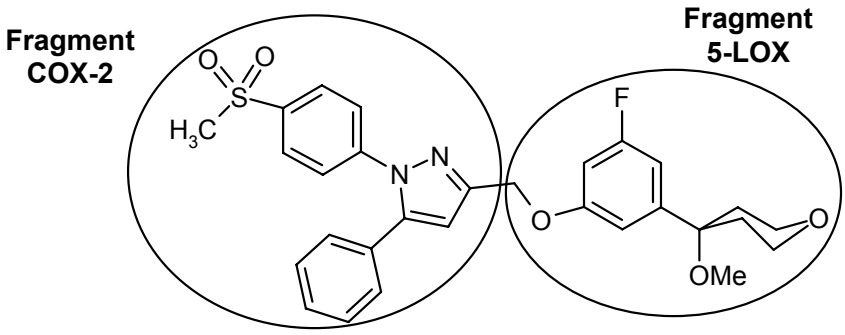
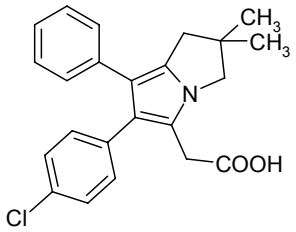


Figure 1. 38 Inhibiteur mixte COX-2/5-LOX issu de l'association de deux fragments caractéristiques d'inhibiteurs COX-2 et 5-LOX, respectivement.

4.2.5. Dérivés dihydropyrrolizines

Plusieurs dérivés de type pyrrolizine présentent une activité mixte. Contrairement à la majorité des inhibiteurs décrits précédemment, ils ne sont ni des antioxydants, ni des chélateurs de fer. [Laufer, 1994] Parmi ceux-ci, le ML-3000 ou licofélone (**Figure 1. 39**) est actuellement en phase III de développement clinique. [Ding, 2003] Il s'avère très efficace dans les modèles d'inflammation aiguë et chronique. Alors qu'il inhibe la 5-LOX et préférentiellement la COX-1, il ne provoque pas de dommages gastro-intestinaux. [Bias, 2004] Le mécanisme de cette action n'est pas encore bien clarifié.



ML-3000
(Licofélone)

Figure 1. 39 Inhibiteur mixte de type dihydropyrrolizine

Bien qu'aucun de ces composés n'ait encore été mis sur le marché, ils pourraient représenter, sur base des résultats sur modèles animaux, une alternative thérapeutique valable aux AINS classiques et inhibiteurs sélectifs de la COX-2 [Fiorucci, 2001], notamment par l'absence totale de toxicité gastro-intestinale. [Celotti, 2001] Les données cliniques futures sur les inhibiteurs mixtes (qui ne sont pas tous sélectifs de la COX-2) pourront également nous renseigner sur l'intérêt d'une inhibition balancée des COX-1 et COX-2, associée à l'inhibition de la voie de la 5-LOX.

CHAPITRE 2.
Acquis

Notre projet ayant pour but d'étudier la 5-LOX humaine et son interaction avec des inhibiteurs non redox, avant de débuter la description des résultats de notre travail proprement dit, nous allons analyser plus en détails les relations structure-activité (RSA) disponibles pour les **inhibiteurs** 5-LOX et mixtes 5-LOX/COX-2 **de type non redox**. Nous présentons également le pharmacophore pour des inhibiteurs sélectifs COX-2 développé précédemment au sein de notre laboratoire.

1. Pharmacophore d'inhibiteurs sélectifs COX-2 62

2. Relations structure-activité des inhibiteurs 5-LOX et mixtes 5-LOX/COX-2 de type non redox 62

2.1. Dérivés thiopyranindoles 63

2.2. Dérivés biaryles 64

2.3. Dérivés imidazoles 66

2.4. Dérivés pyrazoles 67

2.5. Dérivés dihydropyrrolizines 68

1. Pharmacophore d'inhibiteurs sélectifs COX-2

Depuis plusieurs années, notre laboratoire est impliqué dans la **recherche d'inhibiteurs originaux, sélectifs de la COX-2**. [Michaux, 2004a] Ces travaux ont, entre autres, permis de proposer un **pharmacophore** sur base d'inhibiteurs sélectifs COX-2 originaux et de la littérature. Ce modèle à **4 points** comprend deux fonctions hydrophobes, un cycle aromatique et un groupement accepteur de ponts H. Il est présenté à la **Figure 2. 1**.

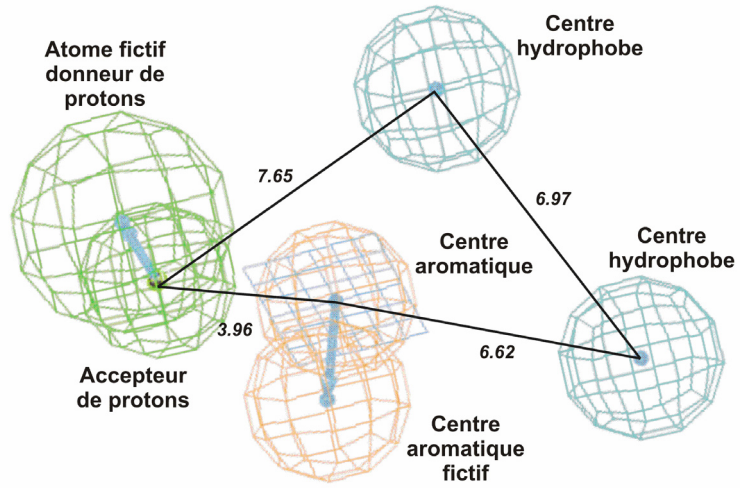


Figure 2. 1 Pharmacophore à 4 points mis en évidence pour des inhibiteurs sélectifs COX-2. Les distances entre les points du pharmacophore sont exprimées en Á avec une tolérance de ± 1 Á. [Michaux, 2004a]

2. Relations structure-activité des inhibiteurs 5-LOX et mixtes 5-LOX/COX-2 de type non redox

Actuellement, peu d'inhibiteurs 5-LOX **non redox**, structuralement différents, ont été décrits dans la littérature. Seules trois grandes familles chimiques peuvent être mises en évidence : (i) les dérivés thiopyranindoles, (ii) biaryles et (iii) imidazoles. Par ailleurs, nous avons également considéré, au cours de ce travail, deux familles d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 présentant un mécanisme d'inhibition de type non redox : les dérivés pyrazoles et dihydropyrrolizines.

2.1. Dérivés thiopyranindoles

La molécule chef de file de cette famille est le composé **L-689,065** (**Figure 2. 2**). [Hutchinson, 1993] Diverses pharmacomodulations autour du noyau indole ont été investiguées, notamment au niveau du groupe phényl-pyridine, du lien pyridine-indole, de la substitution de l'azote de l'indole, du cycle thiopyrane et de la chaîne latérale acide (**Figure 2. 3**). [Hutchinson, 1995; Hutchinson, 1993; Hutchinson, 1994]

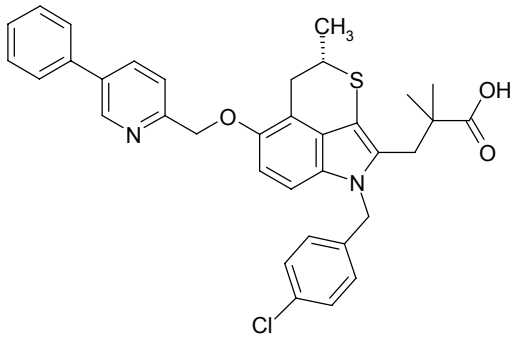


Figure 2. 2 Structure du composé **L-689,065**, chef de file des dérivés thiopyranindoles

Au niveau du groupe phényl-pyridine, la fonction basique, susceptible de former des ponts H au sein du site actif, est indispensable à une bonne activité inhibitrice. Par ailleurs, la substitution du cycle pyridine, par un groupement aromatique, est optimale en position 5. Le lien pyridine-indole joue un rôle important dans le positionnement correct des autres groupements, il n'interagirait pas spécifiquement avec l'enzyme. L'azote indolique tolère une grande variété de substituants, à condition que ceux-ci soient hydrophobes et volumineux. Le cycle thiopyrane, quant à lui, n'accepte qu'un méthyle, en position quatre, obligatoirement en position équatoriale (stéréochimie *S*). Ce cycle, préférable pour une bonne activité inhibitrice, permet une certaine rigidification de cette partie de la molécule. Enfin, la chaîne latérale en C-2 de l'indole, avec une fonction acide en position terminale, est essentielle pour une inhibition effective de la 5-LOX. Diverses variations ont été étudiées : non seulement la longueur de la chaîne est importante, mais également sa conformation. Si elle ne comporte pas d'hétéroatome, la longueur optimale de la chaîne est de quatre atomes de carbone, avec un groupement diméthyle en β de la fonction acide.

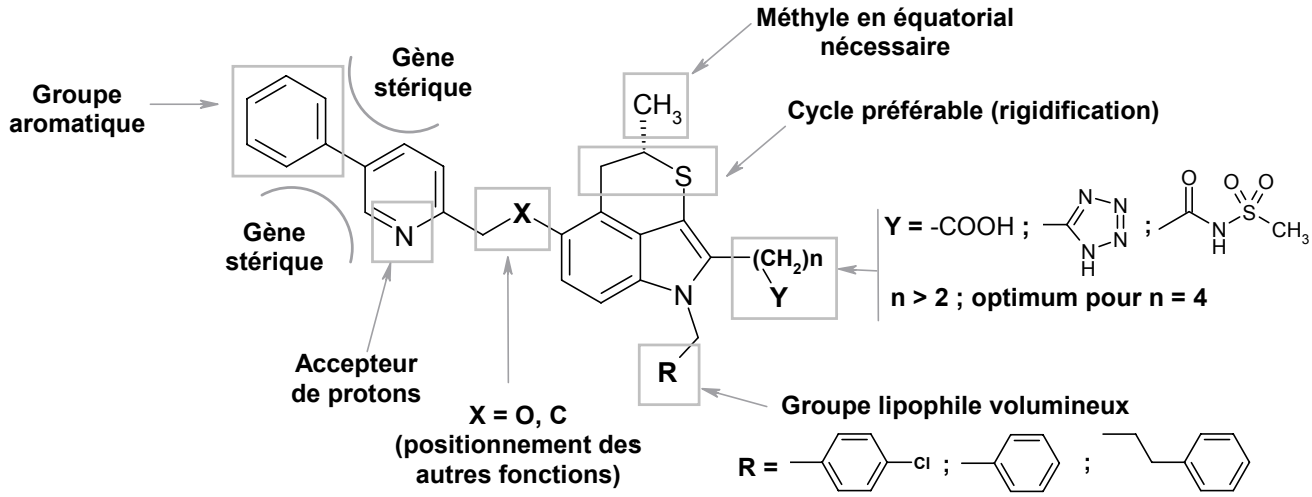


Figure 2. 3 Relations structure-activité des dérivés thiopyranindoles

L'introduction d'hétéroatomes dans la chaîne (O ou S), en conjonction avec des substituants alkyles, a également été investiguée et a conduit au composé **L-699,333** (**Figure 2. 4**). Pour éliminer le centre chiral, le groupement éthyle en α de l'acide carboxylique peut être remplacé par un cycle aromatique, sans modification de l'activité. Celui-ci doit occuper le même site lipophile que l'éthyle. La fonction acide sur ce cycle est optimale en position ortho (**Figure 2. 4**).

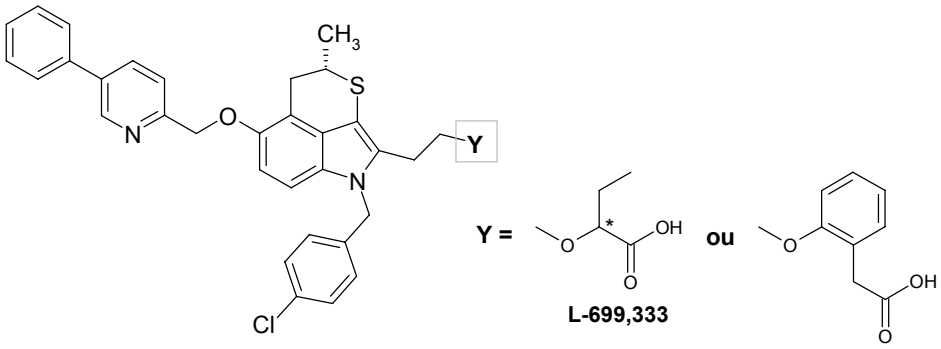


Figure 2. 4 Exemples de variations étudiées au niveau de la chaîne latérale acide

2.2. Dérivés biaryles

Les composés que nous désignons « biaryles » découlent du ZM-211,965, un dérivé arylméthoxythiazole (**Figure 1. 29**). Différentes études visant le remplacement du fragment éthyl-thiazolyle ont permis d'identifier le cycle tétrahydropyrane comme étant optimal pour l'activité inhibitrice. Le composé chef de file est illustré à la **Figure 2. 5**. L'atome d'oxygène

du cycle tétrahydropyrane semble jouer un rôle important dans l'interaction avec l'enzyme car son remplacement par un soufre ou un méthylène conduit à une perte d'activité marquée. [Crawley, 1992]

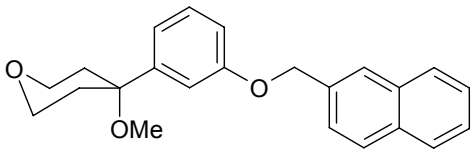


Figure 2. 5 Représentation du chef de file des dérivés biaryles

Diverses pharmacomodulations ont été étudiées autour de cette structure de base. D'une part, le remplacement du naphtyle par différents hétérocycles, dans le but de diminuer la lipophilie des composés et donc d'augmenter leur solubilité, a conduit à l'identification du **ZD-2138** (**Figure 1. 29**). D'autre part, la structure du chef de file a été combinée à celle de la **Justicidine E** (**Figure 1. 30**). Cette approche a mené à des composés hybrides (**Figure 1. 30**). [Ducharme, 1994] Ces dérivés présentant un métabolisme important, de nombreuses variations structurales ont été investiguées pour tenter de remédier à ce problème. Les RSA mises en évidence à partir de ces études sont présentées à la **Figure 2. 6**. [Delorme, 1996; Ducharme, 1994; Hamel, 1997]

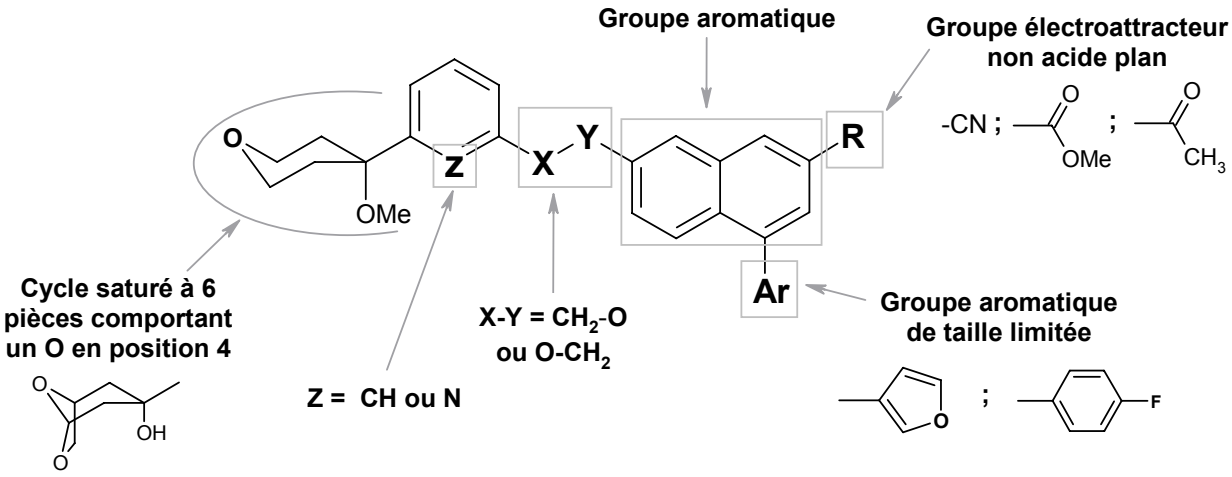


Figure 2. 6 Relations structure-activité des dérivés biaryles

La nature du lien X-Y entre les noyaux naphtyle et phényle influence peu l'activité inhibitrice, contrairement au cas des premiers composés (le lien oxyméthylène donne un dérivé 100 fois plus actif que le lien méthylènoxy). Le groupement lactone, caractéristique de la Justicidine E, peut être efficacement remplacé par un groupe électroattracteur non acide dans le même plan que le noyau aromatique, tel un groupement nitrile ou un ester

méthylique. Un encombrement stérique trop important dans cette région est défavorable. Par ailleurs, le noyau aromatique peut être substitué en position 4 par un cycle aromatique, à 5 ou 6 pièces, pas plus gros qu'un *para*-fluorophényle. Les substitutions en ortho et méta diminuent l'activité inhibitrice. L'intégration d'un azote au niveau du cycle phényle entre le lien X-Y et le tétrahydropyrane améliore la biodisponibilité tout en préservant l'activité. Enfin, le cycle tétrahydropyrane peut être modifié, en cycle dioxabicyclooctanyle par exemple, pour limiter le métabolisme oxydatif. La combinaison des meilleurs remplacements donne le composé **L-739,010** (**Figure 2. 7**).

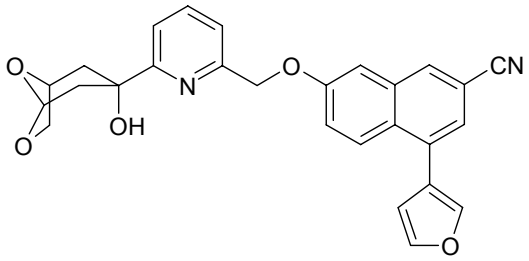


Figure 2. 7 Structure du composé L-739,010

2.3. Dérivés imidazoles

Les dérivés de type imidazole ont été conçus à partir du **ZD-2138**. [Mano, 2003] Ils présentent un squelette imidazolylphényle substitué en para par le fragment fluorophényltétrahydropyrane caractéristique du ZD-2138 (**Figure 2. 8**). La fonction imidazole représente un centre basique ionisable, améliorant la solubilité au pH physiologique et donc l'absorption orale de ces composés.

Les pharmacomodulations investiguées ont porté notamment sur la substitution, d'une part, du noyau imidazole et d'autre part, du cycle tétrahydropyrane (**Figure 2. 8**).

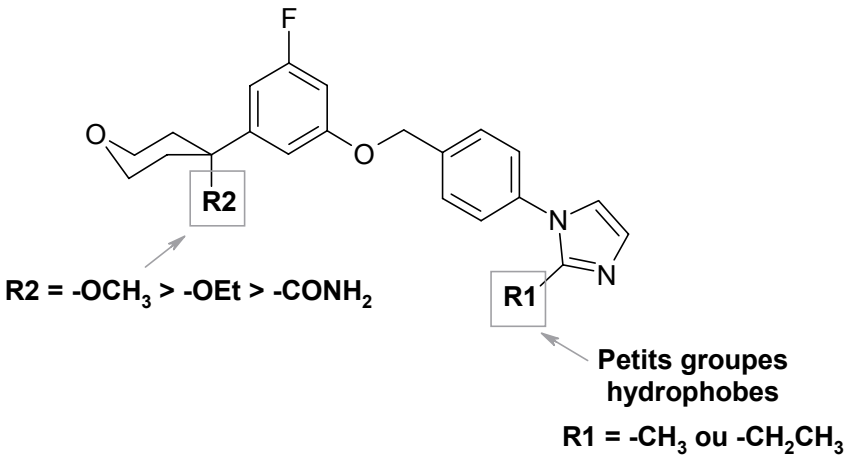


Figure 2. 8 Structure générale des inhibiteurs de type imidazole

La substitution du noyau imidazole (R1) est optimale en position 2, par un petit groupe hydrophobe, tel un méthyle ou un éthyle. La substitution en position 4 du cycle tétrahydropyrane (R2) a principalement été étudiée dans le but de moduler les propriétés pharmacocinétiques des composés. Le groupement méthoxy représente le meilleur substituant. Toutefois, une toxicité oculaire a été observée avec ce dérivé. D'autres études ont alors mis en évidence le substituant carboxamide. [Mano, 2004] Il est un peu moins actif *in vitro* mais présente un profil pharmacocinétique amélioré.

Remarquons que récemment, un inhibiteur de cette catégorie, le **CJ-13,610** (**Figure 2. 9**), est entré en développement clinique. [Fischer, 2004; Mano, 2005]

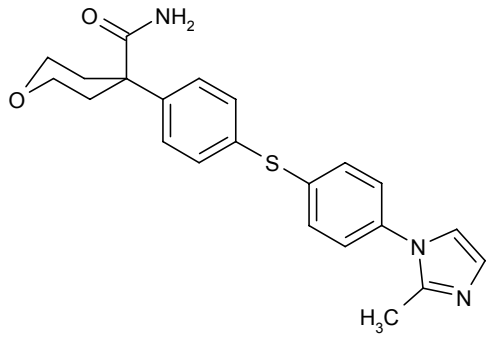


Figure 2. 9 Structure du CJ-13,610, candidat entré en développement clinique

2.4. Dérivés pyrazoles

Les dérivés de type diarylpyrazole ont été conçus par l'équipe du Professeur Hénichart de Lille avec qui nous collaborons. Ils sont issus de la synthèse associative de

fragments caractéristiques d'inhibiteurs sélectifs COX-2 et 5-LOX, respectivement (**Figure 1. 38**). [Barbey, 2002]

Les pharmacomodulations étudiées ont visé le groupement sulfone (caractéristique COX-2), ainsi que le fragment fluorophényltétrahydropyrane (caractéristique 5-LOX) (**Figure 2. 10**). [Pommery, 2004]

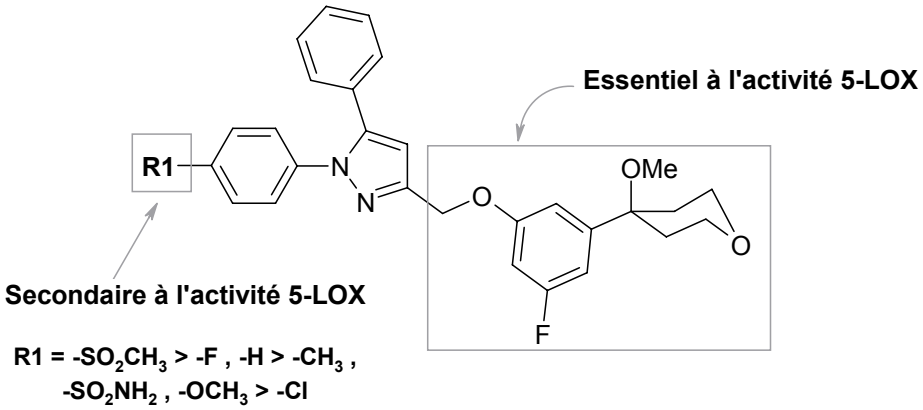


Figure 2. 10 Relations structure-activité mises en évidence pour les composés diarylpyrazoles

Le remplacement de la sulfone par un hydrogène, différents halogènes ou encore un groupement méthoxy n'altère pas de manière significative l'activité inhibitrice 5-LOX. Par contre, le remplacement du fragment caractéristique 5-LOX par différents groupements, tels une phénylmorpholine, un 3-nitrophényle, mène à une perte significative d'activité vis-à-vis de la 5-LOX.

2.5. Dérivés dihydropyrrolizines

Cette classe structurale est représentée par le ML-3000 ou licofélone, l'inhibiteur mixte le plus avancé en développement clinique à ce jour. [Ding, 2003] Peu d'analogues sont présentés dans la littérature et il nous est dès lors difficile de mettre en évidence les requis structuraux pour cette famille. Simplement, un substituant hydrophobe en para sur le 6-phényle est favorable à l'activité inhibitrice 5-LOX (**Figure 2. 11**). [Laufer, 2001]

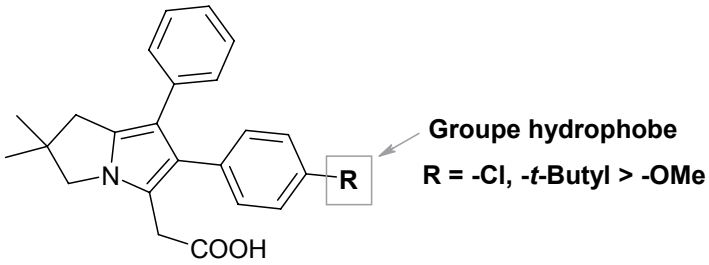


Figure 2. 11 Squelette général des dérivés dihydropyrrolizines

Les relations structure-activité mises en évidence dans ce chapitre nous aideront, dans la suite de ce travail, à identifier les caractéristiques chimiques nécessaires à l'inhibition de la 5-LOX.

CHAPITRE 3.
Objectifs et stratégie

Les recherches menées jusqu'à présent ont montré que l'inhibition simultanée des voies des COX-2 et 5-LOX constitue une approche très intéressante pour conduire à des agents anti-inflammatoires non stéroïdiens plus puissants que les AINS classiques et entraînant moins d'effets secondaires. En bloquant les deux voies majeures de métabolisation de l'acide arachidonique, de tels composés à activité mixte présentent un profil anti-inflammatoire amélioré tout en minimisant la toxicité gastro-intestinale et l'apparition de réactions allergiques secondaires. Par ailleurs, cette démarche présente un intérêt thérapeutique supplémentaire : les deux enzymes étant impliquées dans les processus de prolifération cellulaire, les inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 offrent de nouvelles perspectives dans le traitement préventif de certains cancers.

De plus en plus, le chimiste médicinal adopte une démarche rationnelle, s'appuyant sur des méthodes de modélisation moléculaire, pour concevoir et/ou identifier de manière efficace de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique, évitant de ce fait, de longs et coûteux efforts expérimentaux. Deux approches distinctes peuvent être envisagées : les approches directe et indirecte, selon que l'on connaît ou non la structure 3D de la cible moléculaire. [Wermuth, 1996] L'approche directe se base sur la connaissance de la structure de la cible pour étudier son interaction avec différents ligands (*docking*) et pour concevoir des molécules présentant la meilleure complémentarité stéréoélectronique avec le site actif. L'approche indirecte, par contre, s'appuie principalement sur la comparaison d'un ensemble de ligands, sélectifs de la cible, pour mettre en évidence les requis structuraux et électroniques nécessaires pour une interaction optimale avec celle-ci (pharmacophore).

Notre thèse s'inscrit dans le cadre de la **conception rationnelle d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2**. Elle est menée en collaboration avec l'équipe du Professeur Hénichart à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol de Lille.

Alors que la COX-2 a déjà été l'objet de nombreuses recherches, notamment au sein de notre laboratoire (cfr Chapitre 2), nos connaissances concernant la 5-LOX humaine sont beaucoup plus restreintes. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes donc plus particulièrement intéressés à cette enzyme.

Notre objectif général est de caractériser du point de vue structural la 5-LOX humaine ainsi que son interaction avec des inhibiteurs de type non redox. Cette étude pourra par la suite aider à la conception d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2.

Pour répondre à cet objectif, nous combinerons des approches directes (*docking*) et indirectes (pharmacophore, criblage virtuel) de *drug design.* La stratégie mise en œuvre est présentée à la **Figure 3. 1**.

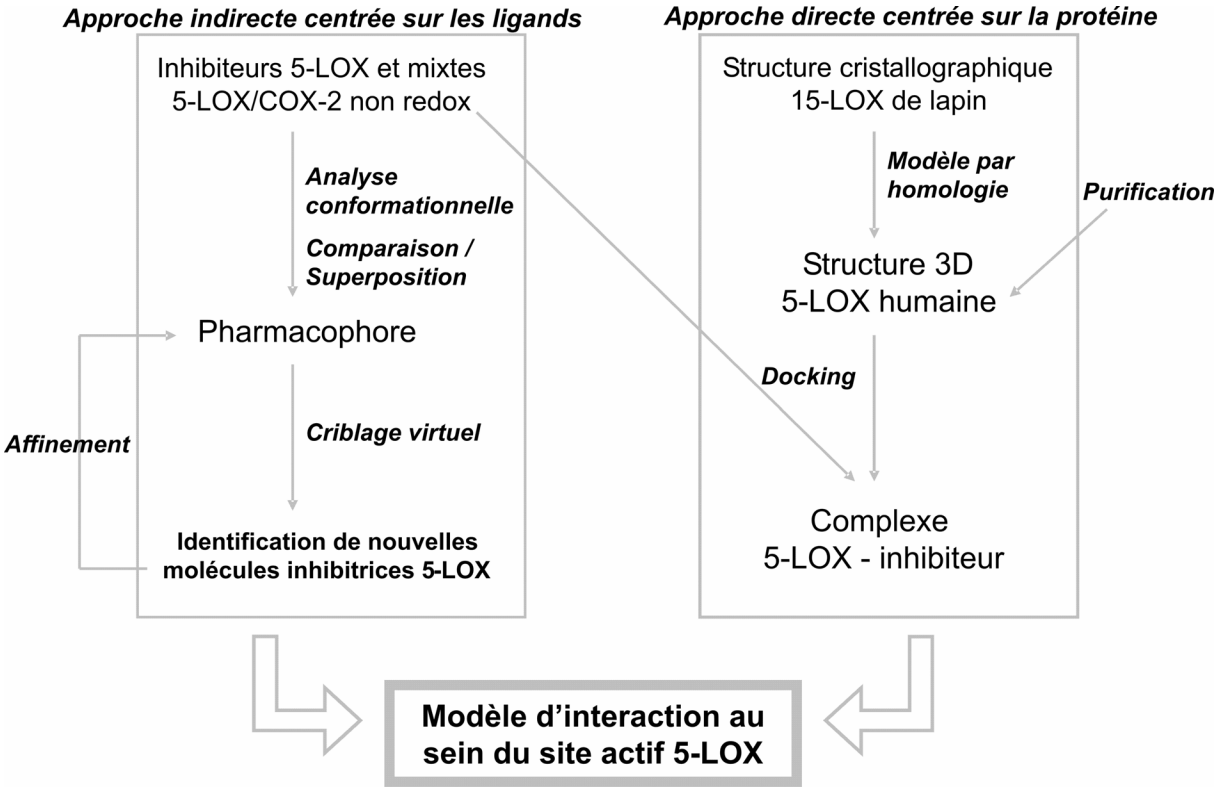


Figure 3. 1 Objectif visé et stratégie développée dans le cadre de notre étude de la 5-LOX humaine et de plusieurs familles d'inhibiteurs de type non redox

Dans un premier temps, nous nous intéresserons à un ensemble d'inhibiteurs 5-LOX de type non redox. Leur comparaison permettra la mise en évidence d'un pharmacophore à cinq points, regroupant les requis stéréoélectroniques pour une interaction optimale des ligands avec l'enzyme. Nous évaluerons la qualité de ce modèle en l'utilisant comme requête pour le criblage de la banque de composés commerciaux *Maybridge*.

… Chapitre 5

Ensuite, nous étudierons la 5-LOX humaine au niveau structural. En effet, sa structure cristallographique n'est pas disponible. Nous tenterons donc, d'une part, de la purifier en vue de réaliser des essais de cristallogenèse. D'autre part, nous la modéliserons par homologie avec une protéine apparentée dont la structure est connue. Nous pourrons alors caractériser le site actif et obtenir des informations structurales sur sa topologie et la nature des interactions pouvant être réalisées dans la cavité enzymatique.

… Chapitre 6

Par après, l'étude du mode de liaison, par *docking*, d'inhibiteurs 5-LOX non redox de la littérature et des composés *Maybridge* sélectionnés nous permettra de mettre en évidence les sites d'interaction essentiels de ces ligands au sein du site actif.

… Chapitre 7

Nous pourrons alors comparer ces points d'ancrage au sein du site de liaison avec les points du pharmacophore et ainsi, affiner notre modèle de pharmacophore. La combinaison du pharmacophore et des informations structurales sur le site actif et l'interaction des inhibiteurs nous conduira à la proposition d'un modèle général d'interaction au sein de la 5-LOX humaine.

… Chapitre 8

CHAPITRE 4.
Matériels et méthodes

Nous présentons dans ce chapitre les méthodes théoriques et expérimentales que nous appliquerons, d'une part, à l'étude des ligands et d'autre part, à l'étude de la protéine et de son interaction avec ces ligands. Pour faciliter la compréhension du lecteur, les techniques expérimentales relatives à la purification de la 5-LOX humaine ainsi que les méthodes théoriques de modélisation par homologie sont explicitées dans le chapitre consacré à l'étude structurale de l'enzyme (cfr Chapitre 6).

1. Détermination de la structure de petites molécules par diffraction de rayons X 76

    1.1 Acquisition des données 76
    1.2. Résolution du problème des phases 77
    1.3. Affinement de la structure approchée 78

2. Banques de données structurales 79

3. Introduction à la mécanique moléculaire 80

4. Exploration de sites d'interaction à l'aide de *GRID* 82

5. Algorithmes de *docking* 82

6. Elaboration de modèles de pharmacophore à l'aide de *Catalyst* 84

1. Détermination de la structure de petites molécules par diffraction de rayons X [Evrard, 2000-2001; Van Meerssche, 1984]

La **diffraction de rayons X (DRX) par les monocristaux** est une propriété importante donnant accès aux **structures moléculaires**. Elle permet d'obtenir une mesure précise des angles et longueurs de liaison. Elle est également la source principale d'informations expérimentales sur les **interactions intra- et** surtout, **intermoléculaires** (ponts hydrogène, interactions $\pi\ldots\pi$, etc.). La DRX joue donc un rôle particulièrement important dans le processus de ***drug design* rationnel**. [Allen, 2005; Wouters, 2001]

Les rayons X sont des radiations électromagnétiques de longueur d'onde de l'ordre de l'angstrœm (Å). Leur interaction avec un milieu matériel peut donner lieu à différents phénomènes physiques : la réfraction, l'absorption, la fluorescence, la diffusion de Compton (inélastique) et la diffusion de Rayleigh (élastique). Cette dernière est à la base de la diffraction des rayons X par les monocristaux. Les électrons, mis en vibration forcée sous l'action du champ électrique associé au rayon X, réémettent un rayonnement de même longueur d'onde, dans toutes les directions de l'espace. Lorsque le milieu traversé est périodique, comme c'est le cas pour les cristaux, ce phénomène continu de diffusion est transformé en un phénomène discontinu de diffraction: le faisceau incident n'est renvoyé que dans un nombre discret de directions privilégiées formant un angle d'incidence θ avec les plans réticulaires (loi de Bragg).

L'analyse de ces directions de diffraction permet de connaître les paramètres réticulaires, la multiplicité de la maille et les éléments de symétrie du cristal. L'analyse des intensités diffractées, par contre, peut conduire à la position des atomes dans la maille.

La détermination d'une structure cristalline se déroule en trois étapes: (i) l'acquisition des données, (ii) la recherche d'une structure proche de la structure réelle, par résolution du problème des phases et, (iii) l'affinement de la structure approchée.

1.1. Acquisition des données

Les intensités diffractées permettent de déterminer la position des atomes dans la maille élémentaire. Elles sont mesurées par un diffractomètre Enraf-Nonius CAD-4 [Enraf-Nonius, 1992] et sont ensuite converties en intensités observées I_o par le programme HELENA [Spek, 1997a] grâce à la relation suivante :

$$I_o = \frac{(NC - 2(BF_{gauche} + BF_{droit})}{1/v}$$

Avec I_o, l'intensité observée, NC, le nombre de coups, BF, le bruit de fond et v, la vitesse d'enregistrement.

Les facteurs de structure observés F_o, sur lesquels s'appuie la détermination des positions atomiques, sont extraits des intensités observées, en tenant compte d'effets géométriques (facteur de Lorentz et de polarisation) et physiques (absorption, extinctions et double réflexion de Renniger).

$$|F_o| = \sqrt{\frac{I_o}{L.P}}$$

Avec L, le facteur de Lorentz et P, le facteur de polarisation.

L'analyse statistique de Wilson permet d'estimer, d'une part, le facteur d'échelle K, qui relie les facteurs de structures observés F_o aux facteurs de structure calculés F_c et, d'autre part, le facteur de température B qui rend compte de l'agitation thermique des atomes autour de leur position d'équilibre.

Ainsi, $|F_c|^2 = K\,|F_o|^2$ et $B = 8\,\pi^2 <\mu^2>$

Avec $<\mu^2>$, l'amplitude quadratique moyenne de la vibration atomique.

1.2. Résolution du problème des phases

Rappelons que l'intensité diffractée est proportionnelle au carré de la norme du facteur de structure. Celui-ci peut être défini par :

$$F(hkl) = V \iiint \rho(x, y, z)\, e^{i2\pi(hx+ky+lz)}\, dx\, dy\, dz$$

Avec V, le volume de la maille,

x, y, z, les coordonnées fractionnaires d'un atome dans la maille,

h, k, l, les coordonnées d'un nœud du réseau réciproque.

Une fois les facteurs de structures F connus, il est possible d'accéder à la densité électronique, caractérisant chaque atome de la maille, par transformée de Fourier :

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl)\, e^{(-i2\pi(hx+ky+lz))}$$

Toutefois, l'expérience, par la mesure des intensités diffractées, ne nous fournit que la norme du facteur de structure. La phase ϕ qui lui est associée reste donc inconnue :

$$F = |F|\, e\, i\phi$$

Pour résoudre ce problème des phases, indispensables pour déterminer les structures cristallines, différentes méthodes ont été élaborées (méthodes directes, méthode de Patterson, etc.). Dans le cadre de cette thèse, nous avons appliqué les méthodes directes à l'aide du programme Sir97 [Altomare, 1999], pour obtenir, une fois la phase déterminée, les premières coordonnées atomiques d'une structure approchant la structure réelle.

1.3. Affinement de la structure approchée

L'affinement de la structure approchée est effectué par séries de Fourier-différence et méthode des moindres carrés (programme SHELXL97). [Sheldrick, 1997] Après plusieurs cycles, on obtient une structure qui rend compte au mieux des observations expérimentales.

L'indice de désaccord R permet de suivre le progrès de l'affinement. Il rend compte de la concordance entre la structure réelle et celle proposée.

$$R = \frac{\Sigma (|F_o| - |F_c|)}{\Sigma |F_o|}$$

Avec $|F_o|$, la norme du facteur de structure observé et $|F_c|$, la norme du facteur de structure calculé.

L'analyse de la géométrie de la molécule ainsi que la visualisation de la structure cristalline peut se faire grâce au programme PLATON. [Spek, 1997b]

2. Banques de données structurales

Les structures obtenues par DRX sont une source d'informations importantes, notamment au niveau des contacts intermoléculaires, pour la conception rationnelle de molécules à intérêt thérapeutiques. Elles seraient restées partiellement inexploitées sans la création de banques de données. Les deux principales sont la ***Cambridge Structural Database*** (CSD)[17] [Allen, 2002] et la ***Protein Databank*** de Brookhaven (PDB)[18] [Berman, 2000], consacrées aux petites molécules et aux macromolécules biologiques, respectivement.

Depuis 1965, la **CSD** répertorie les structures cristallographiques de molécules organiques et métallo-organiques, obtenues par DRX ou par diffraction de neutrons. Actuellement, près de 355000 structures y ont été déposées. [Allen, 2005] Il est possible, à l'aide de différents programmes, de rechercher des molécules, des fragments, ou encore des fragments non liés en interaction (ConQuest), de les visualiser (Mercury) et également d'analyser, de manière statistique, la géométrie des structures retrouvées (Vista). Par ailleurs, le logiciel Mogul permet de rechercher très facilement, pour une molécule donnée, les valeurs préférées des longueurs et angles de liaison et des angles de torsion la constituant, sur base des données contenues dans la CSD. Il pourra aider à identifier des conformations peu probables, obtenues lors d'études de *docking* par exemple. [Bruno, 2004]

La **PDB**, créée en 1971, regroupe les structures de protéines (seules ou en complexe avec d'autres protéines, des acides nucléiques ou des ligands), de peptides, d'acides nucléiques, de virus et de carbohydrates, obtenues par DRX ou résonance magnétique nucléaire. [Berman, 2002]

Isostar est une librairie regroupant les informations structurales sur les interactions intermoléculaires (non liantes) observées dans les banques PDB et CSD. Elle permet de visualiser et analyser (en terme de distance et angle, notamment) la distribution d'un groupe de contact (par exemple, un groupe donneur O-H) autour d'un groupe central spécifique (par exemple, un carboxylate). Actuellement, près de 300 groupes centraux différents et 48 groupes de contact sont disponibles. Cet outil est particulièrement intéressant pour valider des hypothèses de *docking*. [Bruno, 1997]

---

[17] La CSD est un produit du *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) de l'université de Cambridge. http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/

[18] La PDB est accessible gratuitement sur le site web : http://www.rcsb.org/pdb/ (ce site sera remplacé le 1er janvier 2006 par une nouvelle version: http://pdbbeta.rcsb.org).

3. Introduction à la mécanique moléculaire [Leach, 1996]

Avec les méthodes de calcul de mécanique quantique *ab initio,* il est difficile de calculer l'énergie de systèmes moléculaires de grande taille, tels les complexes protéine-ligand (temps de calcul très important). Il est donc préférable pour ces systèmes de recourir à la **mécanique moléculaire**. Cette méthode ignore les mouvements électroniques et détermine l'énergie d'un système sur base des **positions atomiques** uniquement, à l'aide de modèles mathématiques simplifiés décrivant les interactions entre les atomes du système.

Le système est représenté par un ensemble de balles (atomes) et de ressorts (liaisons) avec différentes élasticités (constantes de force). Sa surface d'énergie potentielle est décrite par une équation fonction des coordonnées atomiques et comportant généralement quatre termes :

$$E = \sum_{\text{liaisons}} \frac{k_l}{2}(l - l_0)^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_\theta}{2}(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsions}} \frac{k_\omega}{2}(1 + \cos n\omega) + \sum_{i=1}^{N}\sum_{j=i+1}^{N}(4\varepsilon_{ij}[(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^{12} - (\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}})^{6}] + \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0 r_{ij}})$$

Les trois premiers termes de cette expression caractérisent les interactions entre atomes liés, fonction des modifications de longueurs de liaison (énergie de *stretching*), d'angles de valence (énergie de *bending*) et d'angles dièdres (énergie de torsion). Le dernier terme, quant à lui, décrit les interactions entre particules non liées, de type van der Waals (potentiel 6-12 de Lennard-Jones) et de type électrostatique (potentiel de Coulomb).

Le **champ de forces** désigne les fonctions utilisées pour décrire la surface d'énergie potentielle ainsi que l'ensemble des paramètres (k_l, k_θ, k_ω, σ_{ij}, etc.) caractérisant son expression. Divers champs de forces, paramétrisés à partir de données empiriques, ont été développés dans le but de reproduire au mieux différents systèmes moléculaires : **CVFF** est particulièrement adapté à l'étude des protéines et peptides tandis que **CFF91** est plutôt conseillé pour la modélisation des petites molécules. Plus récent, **ESFF** permet de traiter l'ensemble du tableau périodique et notamment, les complexes de type métallo-organique. Il est également conseillé pour modéliser des molécules chargées.

Au cours de notre travail, nous avons eu recours à la mécanique moléculaire principalement pour **minimiser** les ligands seuls ou en complexe avec la protéine et pour explorer l'espace conformationnel de ligands par **dynamique moléculaire**.

La **minimisation** est une procédure itérative modifiant la géométrie du système de façon à en diminuer l'énergie. Les deux algorithmes de minimisation (*Steepest Descent* et *Conjugate Gradient*), couramment utilisés pour la recherche des minima énergétiques locaux, se basent sur le calcul de la dérivée première de la fonction énergie (calcul du gradient). Un troisième minimiseur (*Newton-Raphson*), plus rarement utilisé[19], tient compte également de la dérivée seconde de l'énergie.

Le minimiseur ***Steepest Descent*** (algorithme de la plus grande descente) se déplace le long d'une ligne imaginaire traversant l'espace géométrique multidimensionnel (*line search*), dans la direction du gradient négatif. Dès que la fonction passe par un minimum, le gradient est réévalué. Le nouveau gradient sera perpendiculaire au précédent et les directions des étapes successives de la minimisation seront donc orthogonales entre elles. Méthode très efficace dans la recherche du minimum énergétique d'un système dont la conformation initiale est assez éloignée de celui-ci, elle présente cependant un comportement oscillant à proximité du minimum localisé. Elle sera donc plutôt utilisée en début de minimisation.

Le minimiseur ***Conjugate Gradient*** (algorithme du gradient conjugué) produit un ensemble de directions qui n'impliquent pas ce comportement oscillant : alors que les gradients sont toujours perpendiculaires entre eux, les directions de recherche du minimum sont conjuguées (les informations des étapes précédentes sont inclues dans les paramètres de l'étape suivante). Cette méthode permet d'atteindre très précisément le minimum local, pour autant que la conformation initiale soit relativement proche de celui-ci. Il est donc préférable de l'utiliser en fin de minimisation.

La **dynamique moléculaire** permet d'explorer l'espace conformationnel d'un système plus ou moins complexe. Cette méthode se base sur l'intégration des équations de mouvement de Newton, pendant une période donnée, pour générer un ensemble de positions atomiques. Une certaine quantité d'énergie cinétique est fournie au système, sous la forme d'une température élevée, et, lui permet de franchir les barrières d'énergie potentielle. [Leach, 1996]

[19] L'algorithme *Newton-Raphson* converge difficilement lorsque la conformation initiale est éloignée de celle d'énergie minimale. Il est intéressant de l'utiliser en fin de minimisation pour la recherche précise du minimum. Cette méthode est très coûteuse en temps de calcul et est donc limitée aux systèmes de petite taille (généralement une centaine d'atomes maximum).

Les simulations par mécanique moléculaire ont été réalisées à l'aide du programme *Discover3* [Accelrys Inc., 1998] du logiciel de modélisation *InsightII* [Accelrys Inc., 2000] implémenté sur une station Silicon Graphics Octane2.

4. Exploration de sites d'interaction à l'aide de *GRID*

Le programme *GRID* [Goodford, 1985] permet de prédire les interactions spécifiques non covalentes entre une molécule de structure 3D connue (la « cible ») et un petit groupe chimique (la « sonde »), dont les propriétés sont définies par l'utilisateur. La cible peut être soit, une petite molécule, soit, une macromolécule (telle des enzymes, acides nucléiques, polysaccharides...). La caractérisation des éventuels sites d'interaction favorable entre la cible et une sonde donnée se déroule en trois étapes. D'abord, une grille 3D est tracée au travers de la cible. Ensuite, en chaque nœud de cette grille, l'énergie d'interaction entre les deux partenaires est calculée. Il est possible, alors, de représenter des contours de niveau énergétique fixé par l'utilisateur. L'énergie d'interaction est évaluée, pour la sonde placée en chaque point de la grille, sur base de fonctions énergétiques caractérisant les interactions électrostatiques, le potentiel de Lennard-Jones et les interactions par ponts hydrogène. L'ensemble des paramètres nécessaires à la définition des sondes et des fonctions d'énergie est repris dans un fichier propre au programme (un peu comme un champ de forces).

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé le programme *GRID* pour explorer le site actif de la 5-LOX humaine à l'aide de sondes représentatives des groupements fonctionnels rencontrés dans les ligands étudiés, dans le but d'aider à l'identification du (des) mode(s) de liaison le(s) plus probable(s).

5. Algorithmes de *docking*

Le *docking* a pour but de prédire la structure d'un complexe formé par deux molécules, comme une protéine et un ligand. Différents algorithmes de *docking* automatisé ont été mis au point pour explorer les modes de liaison possibles de ligands au sein de cibles macromoléculaires. Au cours de ce travail, nous avons utilisé les algorithmes *GOLD* (version 1.1) [Jones, 1995; Jones, 1997] et *Autodock* (version 3.0). [Morris, 1998]

GOLD (*Genetic Optimisation of Ligand Docking*) emploie un algorithme génétique. Il se base sur la théorie de l'évolution darwinienne, considérant que seuls les individus les mieux adaptés à leur environnement survivent.

Au début de la simulation, une population de solutions, appelées chromosomes ou individus et correspondant à diverses configurations du système, est générée aléatoirement. Les différents individus sont évalués par une fonction de score (*fitness*). Les solutions les plus valides sont ensuite traitées par des opérateurs génétiques de *crossover*, mutations et reproduction sélective, pour générer la population suivante. Le *crossover* permet de recombiner deux chromosomes des générations précédentes, tandis que la mutation introduit aléatoirement de nouvelles informations. La reproduction sélective, quant à elle, permet aux solutions les plus probables de passer à la génération suivante. L'utilisation itérative des opérateurs génétiques permet d'optimiser la population d'individus retenus, pour, à terme, obtenir les solutions les plus probables du problème étudié.

GOLD permet le *docking* de ligands flexibles au sein de protéines, partiellement flexibles au voisinage du site de liaison. En effet, les angles de torsion des groupements hydroxyles des résidus Ser, Thr et Tyr, de même que les groupements ammonium des Lys, sont optimisés au cours de la simulation pour favoriser la formation de ponts H avec le ligand. La fonction de score utilisée pour le classement des solutions proposées repose en partie sur les conformations stables et contacts entre atomes non liés observés dans la banque CSD. Elle prend en compte les ponts H, les interactions hydrophobes ainsi qu'un terme relatif à l'énergie interne du ligand.

Autodock se base également sur un algorithme génétique (recherche globale). A la différence de *GOLD*, il inclut, en plus, une recherche locale permettant d'optimiser les solutions. Ce type d'algorithme hybride est appelé algorithme génétique Lamarckien.[20]

La fonction de score d'*Autodock* comprend un terme de van der Waals (potentiel 12-6), un terme directionnel pour les ponts H (potentiel 12-10), un terme électrostatique de Coulomb, un terme entropique défavorable relié à la restriction des degrés de liberté conformationnelle du ligand, ainsi qu'un terme de désolvatation. Les coefficients des termes de la fonction de score ont été déterminés à partir d'un ensemble de 30 structures cristallographiques de complexes protéine-ligand, pour lesquels la constante d'inhibition (K_i) est connue.

[20] Le minimiseur local modifie le phénotype d'un individu. Cette adaptation est enregistrée dans son génotype et pourra donc être transmise à ses descendants. Le nom « algorithme génétique Lamarckien » fait référence à la notion (controversée) de Jean-Baptiste de Lamarck qui postule que l'adaptation d'un individu à son environnement peut être héritée de ses ancêtres.

6. Génération de modèles de pharmacophore à l'aide de *Catalyst*

Catalyst [Accelrys Inc., 2002] est un logiciel qui permet d'élaborer des modèles de pharmacophore en comparant un ensemble de ligands, d'une part, sur base des conformations qui leur sont accessibles et, d'autre part, sur base des caractéristiques chimiques qu'elles partagent. [Kurogi, 2001]

Lorsque l'activité biologique des composés est prise en compte (module *HypoGen*), des hypothèses de pharmacophore **quantitatives** sont générées. Ces modèles permettent de prédire l'activité d'autres composés, n'appartenant pas à l'ensemble de départ.

Lorsque la gamme d'activité biologique n'est pas suffisamment large (< 4 log) ou que les données sont issues de tests différents, il est préférable de générer des hypothèses de pharmacophore **qualitatives** (module *HipHop*) qui représentent l'arrangement 3D des caractéristiques chimiques communes à un ensemble de composés structuralement différents. Plus de détails concernant la méthodologie suivie par *HipHop* sont donnés au Chapitre 5.

CHAPITRE 5.
Pharmacophore d'inhibiteurs 5-LOX non redox

L'établissement d'un modèle de pharmacophore est une des premières démarches les plus importantes, en l'absence de structure 3D de la cible macromoléculaire, pour appréhender l'interaction de celle-ci avec un ligand. Il correspond à l'ensemble des propriétés stéréoélectroniques d'une molécule, spécifiquement reconnues par un site récepteur et, responsables de l'activité biologique de cette molécule. [Guner, 2000] Le pharmacophore peut être utilisé comme filtre *in silico* (tout comme le site actif d'une cible) pour cribler une banque de composés et ainsi identifier des molécules susceptibles d'interagir favorablement avec la cible. [Langer, 2001; Schneider, 2002b]

Dans ce chapitre, nous présentons l'élaboration d'un **modèle de pharmacophore pour des inhibiteurs 5-LOX de type non redox** ainsi que son utilisation en tant que filtre pour rechercher des molécules potentiellement inhibitrices de la 5-LOX dans une banque de composés commerciaux.

1. Stratégie générale 86
2. Sélection des composés 86
3. Analyse conformationnelle 89
    - 3.1. Stratégie 90
    - 3.2. Résultats et discussion 90
    - 3.3. Conclusion 95
4. Génération du pharmacophore 96
    - 4.1. Stratégie 96
    - 4.2. Résultats et discussion 97
    - 4.3. Conclusion 102
5. Evaluation du modèle de pharmacophore 102
    - 5.1. Criblage virtuel de la banque *Maybridge* 102
    - 5.2. Evaluation pharmacologique des composés sélectionnés 105
    - 5.3. Conclusion 106
6. Ajustement des paramètres contrôlant la génération des hypothèses 107
7. Conclusion 111

1. Stratégie générale

Parmi les trois classes d'inhibiteurs 5-LOX connus (redox, chélateurs et non redox), nous nous sommes intéressés uniquement aux **inhibiteurs de type non redox**. Ces composés, qui se lient spécifiquement au site actif de l'enzyme, sont dépourvus de propriétés anti-oxydantes ou chélatrices pouvant interférer avec d'autres systèmes redox du corps humain. Ils sont donc généralement plus puissants et plus sélectifs que les inhibiteurs redox et les agents chélateurs et ils présentent potentiellement moins d'effets secondaires. [Julemont, 2003]

Dans un premier temps, nous avons sélectionné des composés appartenant à des classes chimiques distinctes en favorisant la **plus grande variété structurale possible**. Nous avons ensuite caractérisé leur flexibilité en explorant leur espace conformationnel par dynamique moléculaire. Enfin, nous avons comparé, à l'aide du programme *Catalyst*, les inhibiteurs entre eux, sur base des conformations qui leur sont accessibles et des caractéristiques chimiques qu'ils partagent. Nous avons ainsi mis en évidence un **modèle de pharmacophore à 5 points**.

Ce modèle, en conjonction avec d'autres filtres *in silico*, a été utilisé pour rechercher, au sein d'une banque de composés commerciaux, de nouvelles molécules potentiellement inhibitrices de la 5-LOX.

2. Sélection des composés

A l'heure actuelle, peu d'inhibiteurs 5-LOX non redox, structuralement différents, sont décrits dans la littérature. Comme nous l'avons vu précédemment, les trois grandes familles chimiques pouvant être mises en évidence sont les dérivés de type (i) thiopyranindole, (ii) biaryle et (iii) imidazole. Afin d'augmenter la variété structurale pour l'élaboration du modèle de pharmacophore 5-LOX, nous avons également considéré deux familles d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX présentant un mode d'action non redox identique. Ce sont les dérivés de type dihydropyrrolizine, parmi lesquels on retrouve le licofélone, et les dérivés de type pyrazole conçus par l'équipe du Professeur Hénichart (cfr Chapitre 2, **point 2.4**).

Nous avons choisi des composés, parmi les plus actifs, représentatifs de chaque famille structurale et de façon à caractériser au mieux les fonctions indispensables à l'activité inhibitrice 5-LOX. Au total, **seize inhibiteurs différents** ont été retenus. Ils sont présentés à la **Figure 5. 1**.

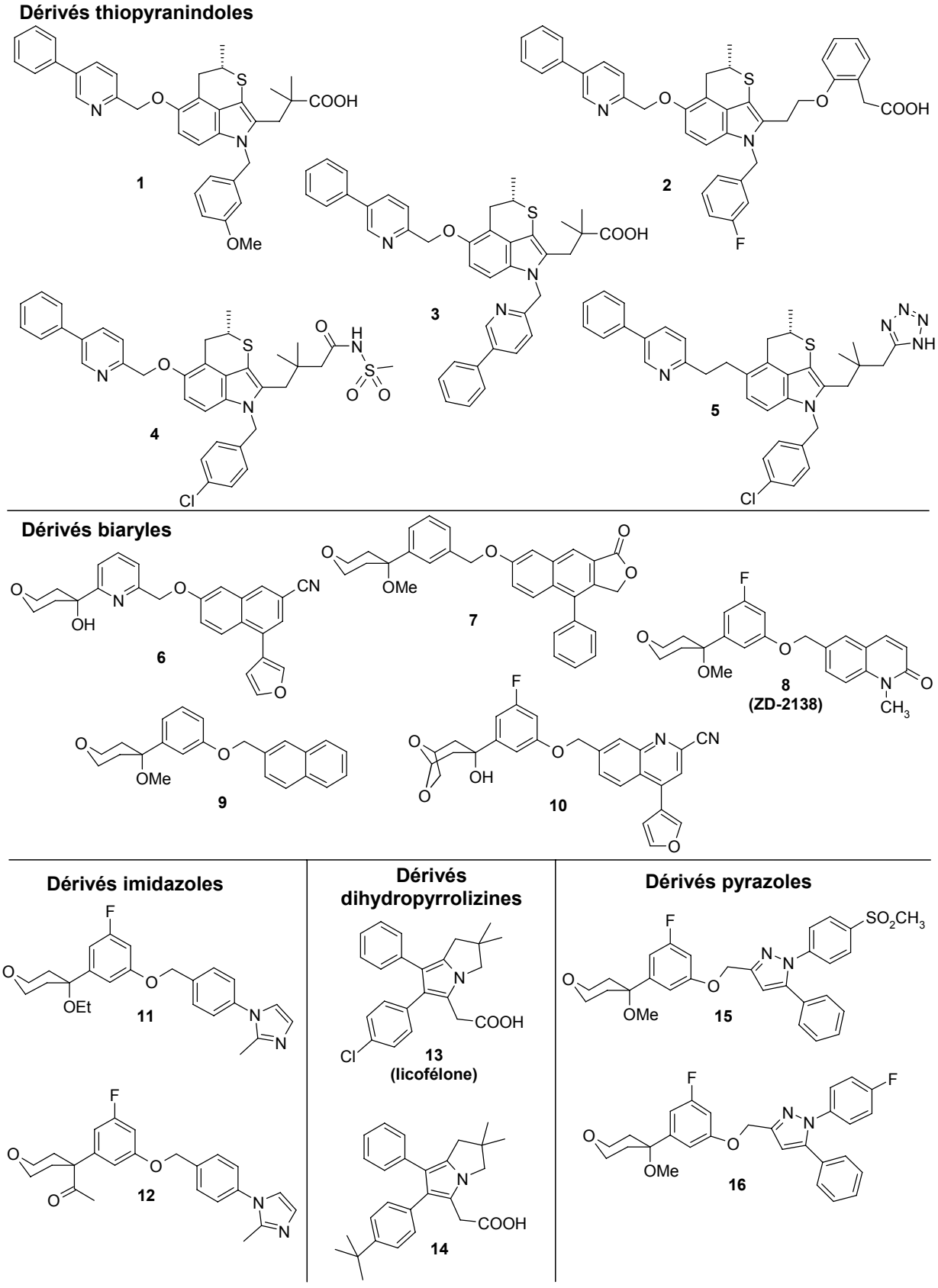


Figure 5. 1 Structure chimique des inhibiteurs 5-LOX non redox (**1-12**) et mixtes 5-LOX/COX-2 (**13-16**) sélectionnés pour l'élaboration du pharmacophore 5-LOX

Comme nous l'avons déjà expliqué précédemment, aucune information précise quant à l'orientation adoptée par ces inhibiteurs au sein du site actif de la 5-LOX n'est disponible dans la littérature. Toutefois, ils présentent tous un mode d'action similaire, de type non redox. Ils entrent en compétition avec l'AA pour se lier au site actif de l'enzyme.

Le **Tableau 5. 1** reprend les données d'activité disponibles pour les différents composés.

Tableau 5. 1 Données d'activité disponibles pour les composés sélectionnés pour l'élaboration du pharmacophore (**Figure 5. 1**)

Composé	Test enzymatique IC50 (nM)	Test cellulaire IC50 (nM)	Test sur sang total humain IC50 (nM)	Référence
1	40[a]	28[c]	-	[Hutchinson, 1993]
2	23[b]	-	-	[Hutchinson, 1995]
3	30[a]	16[c]	-	[Hutchinson, 1993]
4	36[a]	11[c]	-	[Hutchinson, 1993]
5	16[a]	3[c]	-	[Hutchinson, 1993]
6	15[b]	0.6[c]	30	[Hamel, 1997]
7	14[b]	1.5[c]	50	[Ducharme, 1994]
8	330[b]	10[c]	80	[Ducharme, 1994]
9	10[b]	1.2[c]	60	[Ducharme, 1994]
10	27[b]	2.3[c]	36	[Dube, 1998]
11	-	-	80	[Mano, 2004]
12	-	-	130	[Mano, 2004]
13	-	180[d]	-	[Laufer, 1994]
14	-	180[d]	-	[Laufer, 1994]
15	-	3[e]	300	[Barbey, 2002; Pommery, 2004]
16	-	-	480	[Pommery, 2004]

[a] 5-LOX de rat; [b] 5-LOX humaine; [c] HPMNL = leucocytes polymorphonucléaires humains; [d] BPMNL = leucocytes polymorphonucléaires bovins; [e] cellules de type granulocyte.

Les tests d'activité réalisés sur ces composés présentent des **niveaux de complexité différents**. En effet, le test sur enzyme isolée s'intéresse uniquement à l'interaction enzyme-inhibiteur. Celui-ci est directement mis en présence de l'enzyme et, entre en compétition avec le substrat pour se lier au site actif. La production de 5-HPETE, qui résulte de la réaction de lipoxygénation de l'AA (cfr Chapitre 1, **point 3.2.1**), est suivie par spectrophotométrie. Ces données d'activité rendent très bien compte de l'affinité d'un inhibiteur pour une enzyme donnée et, sont particulièrement intéressantes pour étayer des études théoriques du mode d'interaction protéine-ligand (*docking*). L'inconvénient majeur de ce type de test est que l'enzyme, qui n'est pas dans son environnement naturel, peut ne pas présenter une activité enzymatique optimale. Les 5-LOX d'origine humaine et de rat partagent un haut pourcentage d'identité de séquence en acides aminés (supérieur à 95 %). On peut donc s'attendre à observer des tendances similaires au sein des deux espèces. Dans les tests d'activité sur leucocytes polymorphonucléaires (cellules isolées) et sur sang total, l'enzyme se trouve dans son milieu naturel et est activée par un ionophore calcique. La mesure du taux de LTB_4 produit (ou parfois de 5-HETE), généralement par *radioimmunoassay*, permet d'évaluer l'activité de la 5-LOX et donc, le pouvoir inhibiteur du composé étudié. Ces modèles ne reflètent, toutefois, pas tout-à-fait l'interaction enzyme-ligand. D'une part, ils se basent sur le dosage du LTB_4, médiateur dont la biosynthèse implique également une enzyme autre que la 5-LOX, la LTA_4 hydrolase (cfr chapitre 1, **point 3.2.1**). D'autre part, ils supposent le passage de membranes par la molécule d'intérêt avant de pouvoir atteindre sa cible, et en plus, pour les tests sur sang total, la liaison aux protéines plasmatiques du sang et une possible métabolisation. Ces phénomènes peuvent interférer avec l'action directe du composé sur l'enzyme et donc, conduire à une sous-estimation de sa puissance.

Pour avoir une idée claire de l'affinité des inhibiteurs pour la 5-LOX, nous avons donc favorisé les données expérimentales issues des tests sur enzyme isolée. Celles-ci ne sont, cependant, pas toujours disponibles dans la littérature ; les tests sur sang total sont plus souvent réalisés car ils sont plus proches du modèle humain et de la future utilisation du composé.

3. Analyse conformationnelle

La dynamique moléculaire permet d'obtenir des informations sur les propriétés conformationnelles d'un système moléculaire. En fournissant de l'énergie cinétique au système, sous la forme d'une température élevée, il est possible de franchir des barrières énergétiques, de sortir de minima locaux, et ainsi, d'explorer la surface d'énergie potentielle.

On obtient donc un échantillonnage des conformations de basse énergie que le système peut adopter, parmi lesquelles peut se trouver la **conformation bioactive**.

3.1. Stratégie

D'abord, les inhibiteurs ont été construits à l'aide du module *BUILDER* dans *InsightII* et leur géométrie a été optimisée par mécanique moléculaire à l'aide du champ de forces *CFF91* (*Discover3*). Pour les composés **4** et **5**, toutefois, nous avons utilisé le champ de forces *ESFF*, adapté à la modélisation des molécules chargées. En effet, ces inhibiteurs comportent, respectivement, un groupement sulfonamide et un tétrazole, déprotonnés au pH physiologique, qui ne peuvent être correctement modélisés par *CFF91*.

Ensuite, l'espace conformationnelle des inhibiteurs a été étudié par **dynamique moléculaire suivie d'un recuit simulé** (*simulated annealing*). Dans un premier temps, nous avons minimisé le système à l'aide des algorithmes *Steepest Descent* et *Conjugate Gradient* (convergence de 1000.0 et 10.0 kcal.mol^{-1}. Á$^{-1}$, respectivement). La température du système a, ensuite, été élevée à 1000 K pendant 10000 fs.

A intervalle de temps régulier (1 fs), des conformations du système ont été sélectionnées ; au total, 250 conformères[21] ont été retenus pour chacun des inhibiteurs. Ces conformations ont, par après, été progressivement « refroidies » jusqu'à 300 K et minimisées à l'aide des algorithmes *Steepest Descent*, *Conjugate Gradient* et *Newton-Raphson* (convergence de 10.0, 0.01 et 0.01 kcal.mol^{-1}.Å^{-1}, respectivement). Ces **conformères de basse énergie** ont finalement été rassemblés **en familles** (*clusters*) sur base d'un RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 0.5 Å calculé sur les atomes lourds.

Enfin, les conformations étant générées de manière théorique, nous avons évalué leur qualité, en comparant certains paramètres géométriques à ceux déterminés expérimentalement par DRX pour des structures analogues.

3.2. Résultats et discussion

La génération de 250 conformères par inhibiteur nous a permis de couvrir au mieux leur espace conformationnel. Le nombre de familles obtenues ainsi que la différence d'énergie maximale entre deux conformations sont présentés dans le **Tableau 5. 2**.

[21] Nous avons d'abord testé 100 conformères par molécule étudiée. Toutefois, pour certaines présentant un grand nombre de liaisons rotatoires (particulièrement les dérivés thiopyranindoles), le rassemblement en familles donnait près de 100 familles ! L'espace conformationnel n'était donc pas suffisamment couvert. Nous avons donc augmenté le nombre de conformères générés à 250, hormis pour les dérivés dihydropyrrolizines, plus petits et rigides.

Tableau 5. 2 Nombre de familles obtenues pour chacun des composés étudiés lors de l'analyse conformationnelle et ΔE maximum entre les conformations de plus basse et de plus haute énergie

Composé	Nombre de familles	ΔE (kcal.mol^{-1})
1	220	12.9
2	220	13.1
3	225	11.7
4	245	13.3
5	246	11.0
6	122	12.9
7	135	13.1
8	91	7.8
9	142	7.1
10	142	7.6
11	137	11.3
12	174	10.7
13	40	1.9
14	63	1.3
15	213	10.5
16	187	10.3

A titre d'illustration, la **Figure 5. 2** présente la superposition de plusieurs conformations de basse énergie adoptées par les composés **6, 13** (le licofélone) et **15**.[22] Les conformères ont été superposés sur base du cycle naphtalène, du pyrrole et du noyau imidazole, respectivement.

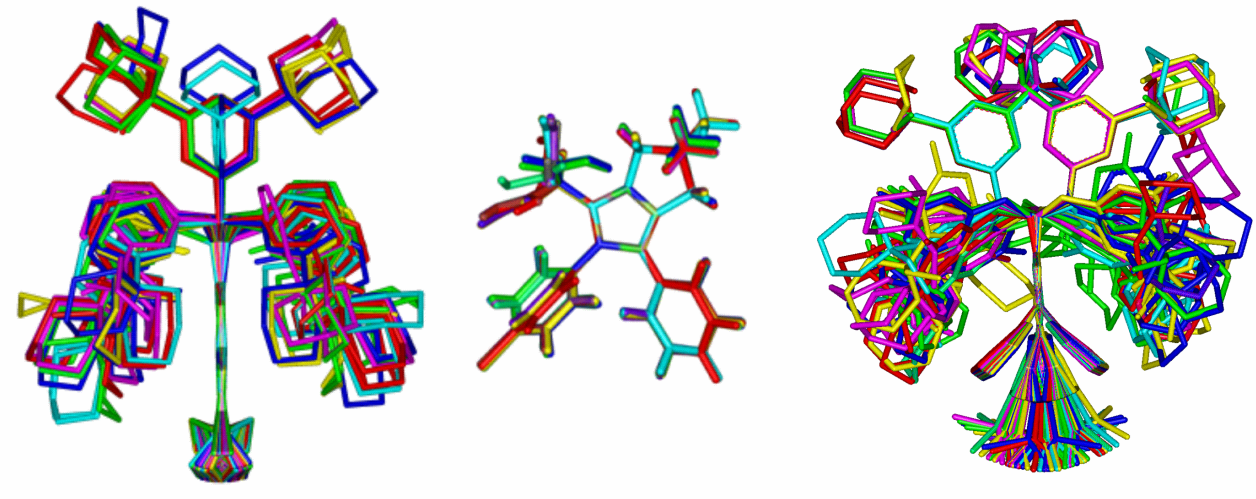


Figure 5. 2 Conformations adoptées par les composés **6** (gauche), **13** (milieu) et **15** (droite)

[22] La structure des composés étudiés est rappelée dans le **volet B** à la fin du manuscrit.

Plusieurs observations, quant à la géométrie des conformations adoptées par les inhibiteurs, peuvent être mises en évidence et comparées à des données expérimentales obtenues par DRX pour des structures analogues.

Pour les dérivés thiopyranindoles, les conformations obtenues sont soit « étendues », soit « repliées ». En effet, l'angle de torsion, caractérisant le lien méthylène-oxy (–CH_2-O–) entre les groupements indole et phényl-pyridine du composé **2**, par exemple, prend des valeurs de ±(170.0 à 172.3)° et de ±(53.9 à 125.4)°. Par ailleurs, les cycles phényle et pyridine ne sont pas tout à fait coplanaires ; ils présentent un angle de torsion de ±(22.8° à 28.3°). Ces valeurs ont pu être comparées à celles observées dans la structure cristallographique d'un analogue de type thiopyranindole [Hutchinson, 1995], déposée dans la banque CSD (**Figure 5. 3**). L'unité asymétrique comporte deux molécules. Toutes deux adoptent une conformation étendue, caractérisée par des angles de torsion T_1 (pont –CH_2-O–) de -170.6° et 171.1°, et T_2 (groupement phényl-pyridine) de -20.8° et 23.2°, respectivement. Ces valeurs expérimentales valident notre étude théorique.

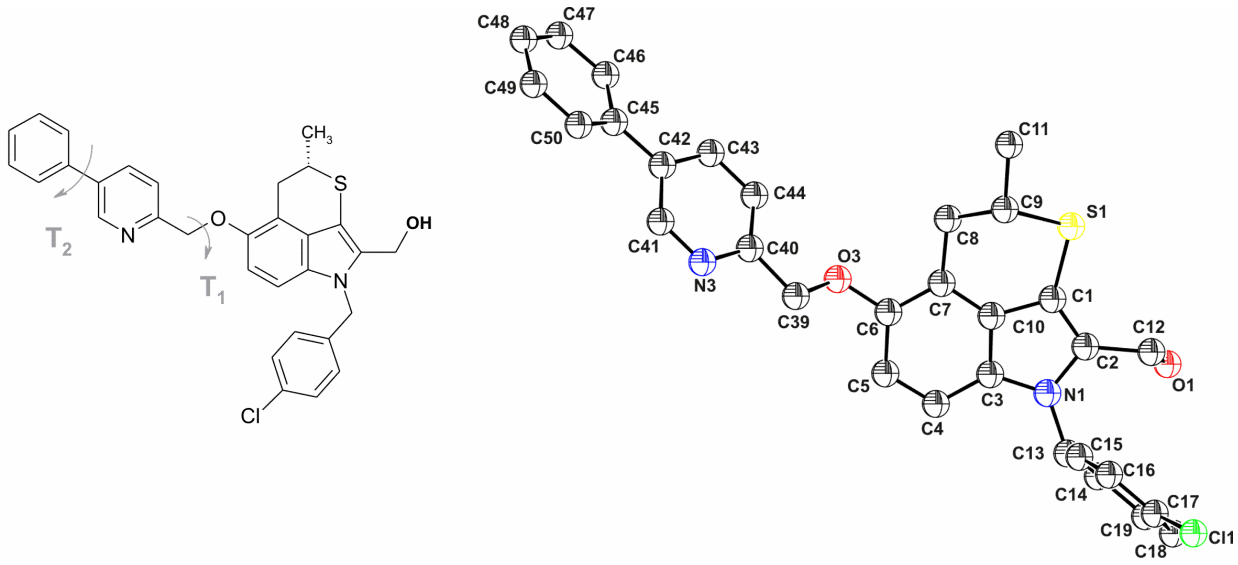


Figure 5. 3 Conformation cristalline du dérivé thiopyranindole avec les ellipsoïdes de vibration (50 % de probabilité de présence) (code CSD ZILSOC). Une seule des deux molécules de l'unité asymétrique est illustrée et, pour plus de clarté, les hydrogènes ne sont pas représentés.

Pour les dérivés biaryles, l'orientation du fragment « aryl-tétrahydropyrane » par rapport au noyau biaryle est déterminée par l'angle de torsion T_1 qu'adopte le lien –CH_2-O– (composés **6** et **7**) ou –O-CH_2- (composés **8**, **9** et **10**). Parmi les conformations générées, deux groupes d'orientations préférentielles sont observés, caractérisées par des valeurs de ±(64.0 à 102.9)° et ±(176.9 à 177.4)° pour le composé **6** et, de ±(59.00 à 78.2)° et ±(176.4 à 179.8)° pour le composé **10**. On remarque que la nature du lien –O-CH_2– ou –CH_2-O–

influence peu l'angle de torsion. Pour valider les conformations obtenues pour cette famille d'inhibiteurs, nous avons recherché, dans la banque de données CSD, des composés comportant le fragment I (**Figure 5. 4**). Au total, 92 molécules présentent ce groupement général et la distribution des valeurs adoptées par l'angle de torsion T_1 est représentée sous forme d'histogramme (**Figure 5. 4**). Nous pouvons constater que les deux orientations préférentielles que nous avons mises en évidence dans le cas des inhibiteurs biaryles concordent avec les valeurs couramment rencontrées pour l'angle de torsion T_1.

Par ailleurs, le cycle (furane ou phényle), porté par le noyau biaryle, n'est pas coplanaire avec ce dernier. L'angle de torsion entre ces groupements est de ±(33.6 à 36.3)° et ±(137.8 à 143.7)° pour le composé **6**, et de ±(61.3 à 75.2)° et ±(103.8 à 120.7)° pour le composé **7**. Cette déviation hors du plan résulte d'une gêne stérique importante entre les hydrogènes portés par les cycles. Nous avons recherché, dans la banque CSD, des composés comportant un fragment similaire (à savoir un noyau biaryle substitué par un cycle phényle ou un hétérocycle aromatique à cinq pièces). Seules deux molécules, présentant un substituant de type phényle sur le noyau biaryle, ont été retrouvées (**Figure 5. 5**). Les valeurs observées pour l'angle de torsion T_2, respectivement de 73.8 et 117.8°, valident nos observations.

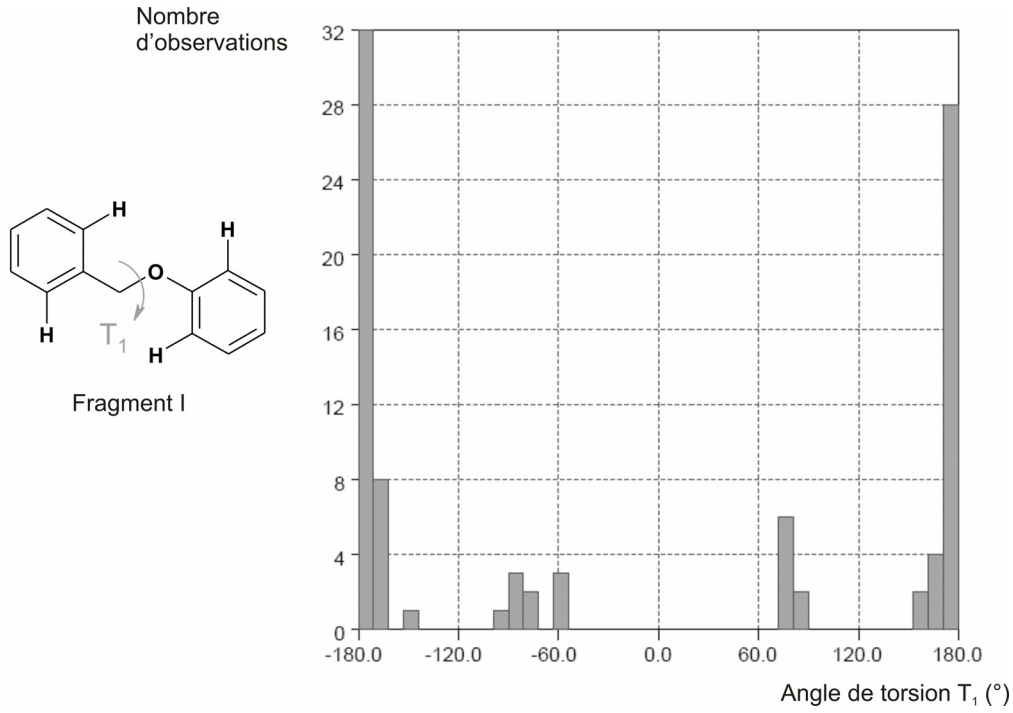
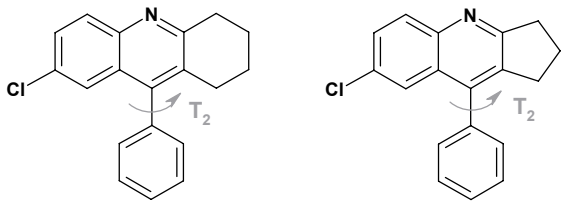


Figure 5. 4 Structure du fragment I et distribution, sous forme d'histogramme, des valeurs prises par l'angle de torsion T_1 (92 observations au total dans la banque CSD)



LICBII **TIBLEV**

T_2 = 73.8° **T_2 = 117.8°**

Figure 5. 5 Structure des deux composés présentant un noyau biaryle substitué par un cycle phényle, retrouvés dans la banque CSD

Pour les dérivés de type pyrazole, les trois cycles phényle, phénylsulfone et pyrazole ne sont pas coplanaires ; ils présentent des angles de torsion T_1 de ±(9.8 à 32.9)° et ±(170.9 à 174.2)° et T_2 de ±(58.3 à 60.3)° pour le composé **15** par exemple. Par ailleurs, le fragment fluorophényl-tétrahydropyrane adopte deux orientations préférentielles, tout comme dans les composés biaryles, avec un angle de torsion T_3 de ±(67.5 à 74.2)° et ±(178.7 à 179.7)°. Nous avons pu comparer ces valeurs à celles observées dans la structure d'un analogue des composés **15** et **16** que nous avons obtenue par DRX (**Figure 5. 6**). Ce dérivé comporte un cycle morpholine à la place du tétrahydropyrane. Les détails expérimentaux concernant la cristallisation et la résolution de la structure sont présentés en annexe. Les deux molécules dans l'unité asymétrique présentent des angles de torsion T_1 de -35.6 et 48.9°, T_2 de -56.0 et 35.8° et T_3 de 172.3 et 179.5°. Ces valeurs sont proches de celles déterminées théoriquement.

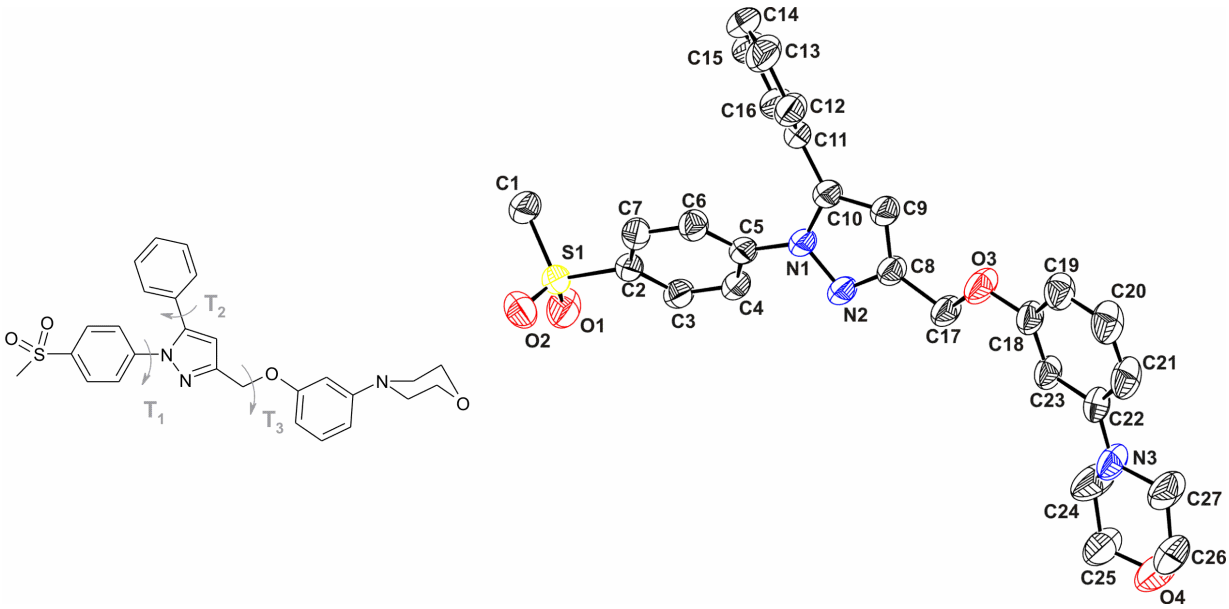


Figure 5. 6 Conformation cristalline de l'aliox23 avec les ellipsoïdes de vibration (probabilité de présence de 50 %). Une seule des deux molécules de l'unité asymétrique est illustrée et, pour plus de clarté, les hydrogènes ne sont pas représentés.

Dans les dérivés dihydropyrrolizines, beaucoup plus rigides que les autres inhibiteurs étudiés, les deux cycles phényles portés par l'hétérocycle central ne se positionnent pas dans le même plan, en raison de l'encombrement stérique. Ils adoptent des angles de torsion, respectivement de ±(46.0 à 49.3)° et ±(120.7 à 126.5)°, et, ±(51.3 à 56.5)° et ±(130.0 à 132.6)° (composé **13**). La recherche dans la banque CSD de composés présentant un fragment tricyclique similaire (28 au total) a permis de mettre en évidence les valeurs couramment rencontrées pour ces torsions (**Figure 5. 7**) et ainsi, de valider les conformations obtenues par mécanique moléculaire.

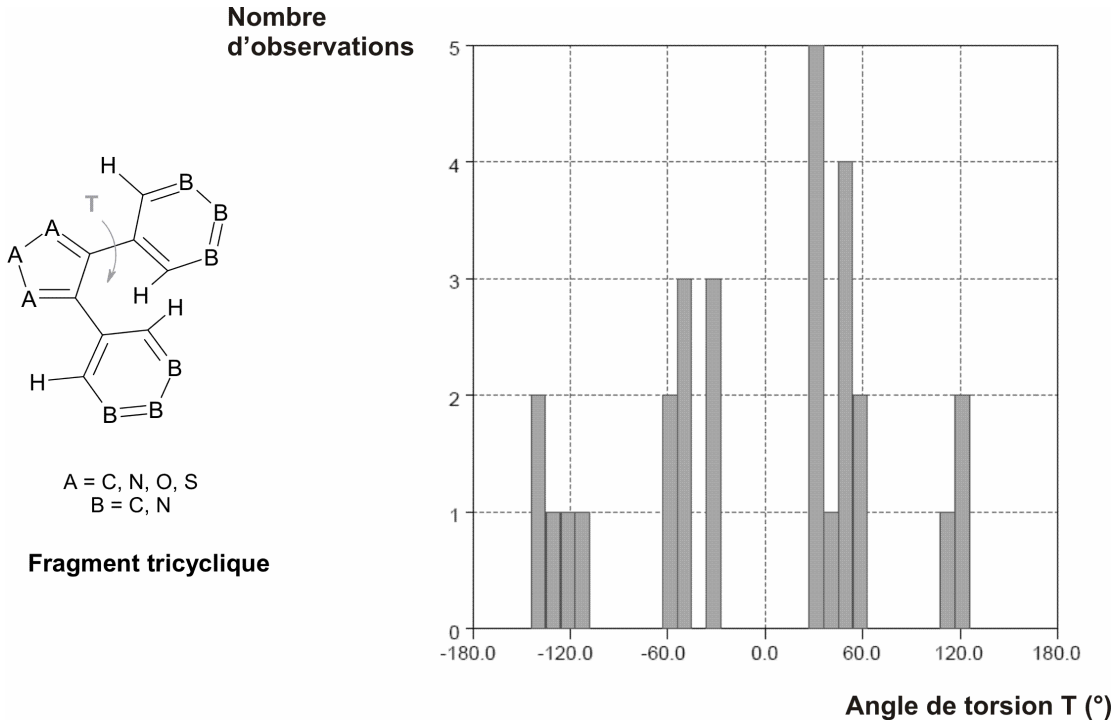


Figure 5. 7 Structure du fragment tricyclique et distribution, sous forme d'histogramme, des valeurs prises par l'angle de torsion T (28 observations au total dans la banque CSD)

3.3. Conclusion

L'analyse, par dynamique moléculaire, de la flexibilité des inhibiteurs 5-LOX non redox sélectionnés nous a permis d'obtenir une **grande variété de conformations stables**, en accord avec les données expérimentales disponibles pour des structures analogues. Ces espaces conformationnels vont donc pouvoir nous servir de **point de départ** pour la **génération d'hypothèses de pharmacophore**.

4. Génération du pharmacophore

Vu la gamme étroite d'activité inhibitrice 5-LOX des composés à notre disposition, en plus du fait que ces activités ont été mesurées suivant différents protocoles (**Tableau 5. 1**), il ne nous était pas possible de générer un modèle de pharmacophore prédictif, basé sur les activités biologiques des composés.

Cependant, les molécules sélectionnées représentent un ensemble d'inhibiteurs puissants, agissant sur la même cible avec un mode d'action similaire (non redox). Nous avons donc choisi d'élaborer un **modèle de pharmacophore**, basé sur les **caractéristiques communes** à ces composés, **sans** tenir compte de leurs différences d'**activité biologique**. Pour cela, nous avons fait appel à la **méthode *HipHop*** du programme *Catalyst*.

4.1. Stratégie

Les modèles conformationnels des 16 inhibiteurs ont été importés dans *Catalyst* (version 4.9) [Accelrys Inc., 2002] et soumis à l'algorithme ***HipHop***.

Lors de la génération des hypothèses de pharmacophore, les molécules ne sont plus considérées comme un ensemble d'atomes mais plutôt comme un ensemble de propriétés chimiques, représentatives des interactions rencontrées dans les complexes enzyme-ligand (accepteur et donneur de ponts H, groupe hydrophobe, etc.). Chaque caractéristique est représentée par une sphère de tolérance qui rend compte de la région de l'espace qu'elle peut occuper.

Les inhibiteurs que nous avons étudiés partagent quatre caractéristiques chimiques générales, à savoir un accepteur de protons (**A**), un groupement hydrophobe (**H**), un groupement hydrophobe aromatique (**Z**) et un cycle aromatique (**R**).

L'accepteur de ponts H (**A**) et le cycle aromatique (**R**) incluent un vecteur et une sphère supplémentaire, définissant la direction et le site de l'interaction. Le groupement hydrophobe aromatique (**Z**) représente le centre de masse des groupes hydrophobes aromatiques. Au contraire du cycle aromatique (**R**), **Z** ne prend pas en compte l'orientation de l'aromatique.

Les composés **7** et **11** ont été sélectionnés comme molécules de référence. Ils sont parmi les dérivés les moins flexibles, tout en ayant une taille suffisante pour représenter l'ensemble des fonctions chimiques nécessaires à l'activité. Toutes leurs caractéristiques chimiques ont donc été prises en compte pour construire les hypothèses (paramètre *Principal* = 2) et chacun des points des pharmacophores générés correspond à une

caractéristique chimique de la molécule (paramètre *MaxOmitFeat* = 0). Pour les autres, par contre, il était autorisé qu'une (ou plusieurs) des caractéristiques chimiques ne soient pas prises en compte par l'hypothèse (paramètre *Principal* = 1) ou qu'un (ou plusieurs) des points du pharmacophore ne se superpose pas aux caractéristiques de la molécule (paramètre *MaxOmitFeat* = 1). Les autres principaux paramètres utilisés lors de la génération des hypothèses sont présentés en annexe. Dans un premier temps, nous avons utilisé les valeurs par défaut.

Les hypothèses de pharmacophore sont produites en comparant l'ensemble des conformations accessibles et des caractéristiques chimiques partagées par les inhibiteurs. Elles sont classées sur base d'une **fonction de score** (***rank***) dépendant de la qualité de la superposition des molécules de départ avec les différents points de l'hypothèse. Cette fonction de score est décrite par la relation suivante :

$$Rank = M\sum_{x} q(x) log_2\left(\frac{q(x)}{p(x)}\right)$$

Où M représente le nombre de molécules de départ ; x, la valeur de la superposition d'une molécule dans l'hypothèse (*fit*) ; q(x), la fraction de molécules présentant un *fit* « x » et p(x), la probabilité qu'une molécule arbitraire ait le *fit* « x ».

Le ***fit*** d'un composé pour une hypothèse rend compte de la qualité de sa superposition aux K points du pharmacophore. Il vaut *K*+1 si la molécule se superpose aux *K* points ; un nombre *i* ($1 \leq i \leq K$) si la molécule ne se superpose pas à tous les points ; 0 si la molécule ne se superpose à aucun des *K* éléments.

4.2. Résultats et discussion

Dix hypothèses de pharmacophore à 5 points ont été générées. Les caractéristiques moléculaires ainsi que la fonction de score qui leur sont associées sont présentées dans le **Tableau 5. 3**.

Tableau 5. 3 Caractéristiques moléculaires et fonction de score des 10 hypothèses de pharmacophore

Hypothèses	Caractéristiques moléculaires	Fonction de score
1	RHHHA	167.3
2	ZHHHA	160.0
3	RHHHA	159.3
4	RZHHA	159.3
5	ZHHHA	158.0
6	RHHHA	157.3
7	RHHHA	155.0
8	ZHHHA	155.0
9	ZHHHA	154.4
10	RZHHA	153.8

Ces hypothèses peuvent être réparties en trois groupes distincts : **RHHHA** (hypothèses 1, 3, 6 et 7), **ZHHHA** (hypothèses 2, 5, 8 et 9) et **RZHHA** (hypothèses 4 et 10). Elles diffèrent principalement dans la position des fonctions hydrophobes et la direction du vecteur de l'accepteur de protons.

Nous avons déterminé laquelle de ces hypothèses pouvait expliquer au mieux les tendances observées dans les RSA. Pour cela, nous avons superposé un inhibiteur de chacune des classes structurales aux différentes hypothèses.

L'alignement des composés avec les hypothèses 2 à 10 n'a pas donné de bons résultats. En effet, les points de ces pharmacophores sont généralement regroupés sur une zone de l'espace très petite. Cet agencement ne permet pas de rendre compte des groupements nécessaires à l'activité ; certains composés, les plus flexibles, adoptent des conformations fort repliées sur elles-mêmes, peu réalistes, pour se superposer au maximum de points.

Par contre, la **première hypothèse de pharmacophore**, avec la fonction de score la plus élevée, est en accord avec les données expérimentales. Elle comporte un cycle aromatique (**R**), trois groupes hydrophobes (**H**) et un accepteur de protons (**A**) (**Figure 5. 8**).

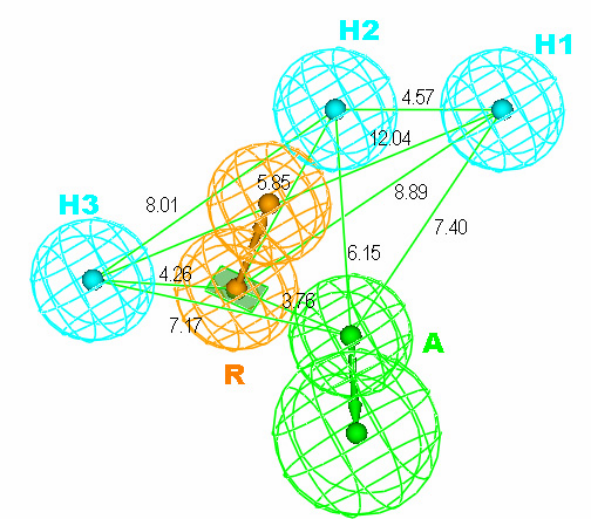


Figure 5. 8 Représentation de l'hypothèse de pharmacophore 5-LOX sélectionnée comprenant un cycle aromatique **R** (en orange), trois groupements hydrophobes **H** (en cyan) et un accepteur de protons **A** (en vert). Les distances sont exprimées en Å, avec une tolérance de ± 1.0 Å.

La superposition des 16 inhibiteurs avec les éléments du pharmacophore est présentée à la **Figure 5. 9**. Pour plus de facilité, les données de RSA sont rappelées dans le **volet A**, à la fin du manuscrit.

On peut constater que le cycle aromatique (**R**) se superpose généralement au noyau central des inhibiteurs, à savoir, le cycle indole (composés **1-5**), naphtalène ou quinoléine (composés **6-10**), phényle (composés **11-12**), dihydropyrrolizine (composés **13-14**) ou pyrazole (composés **15-16**).

Les groupements hydrophobes (**H**) correspondent à diverses fonctions chimiques, telles qu'un méthyle, un cycle phényle, furane ou tétrahydropyrane, ou encore un halogène. Ils soulignent l'importance (i) du méthyle en position équatoriale, des groupements hydrophobes volumineux et du groupe phényl-pyridine pour les dérivés thiopyranindoles ; (ii) du furane ou phényle et du cycle tétrahydropyrane pour les composés biaryles ; (iii) du méthyle sur le noyau imidazole des composés **11** et **12** ; (iv) des substituants lipophiles volumineux pour les dérivés dihydropyrrolizines et (v) l'importance du cycle tétrahydropyrane pour les composés de type pyrazole.

L'accepteur de ponts H (**A**) peut être l'oxygène d'un groupement acide carboxylique, sulfonylurée ou encore éther, ou bien l'azote d'un groupement nitrile, tétrazole ou pyridine. L'importance de ces fonctions, groupement acide dans le cas des dérivés thiopyranindoles ou groupement électroattracteur dans le cas des composés biaryles, a été montrée dans les études de RSA.

L'hypothèse de pharmacophore permet donc de rendre compte en partie des données de RSA disponibles. Toutefois, il présente également certaines **faiblesses**.

Notamment, dans le cas des dérivés thiopyranindoles, la fonction accepteur de protons de la pyridine, indispensable à une bonne activité inhibitrice, n'est pas prise en compte. De même, l'atome d'oxygène du cycle tétrahydropyrane des dérivés biaryles, imidazoles ou encore pyrazoles, n'est pas reconnu comme un accepteur de protons par l'hypothèse de pharmacophore (le groupement est plutôt représenté par un point **H**). Cette fonction, pouvant réaliser des ponts hydrogène avec l'enzyme, est pourtant importante pour l'activité des composés.

Par ailleurs, pour des composés analogues, appartenant à la même famille chimique, l'alignement avec l'hypothèse de pharmacophore peut être fort différent. Ainsi, dans le cas des dérivés thiopyranindoles, le composé **1** n'adopte pas le même mode de superposition avec le pharmacophore que les composés **2-5**. Dans le premier cas, c'est l'importance du groupement lipophile volumineux (méthoxyphényle) qui est soulignée tandis que pour les autres, c'est le groupe phényle-pyridine qui est important. De même, dans le cas des dérivés biaryles, l'accepteur de protons **A** se superpose soit au groupement électroattracteur plan, soit à l'oxygène de type éther.

Bien que les alignements différents obtenus pour certaines familles puissent être le signe de modes de liaison multiples à l'enzyme, les faiblesses mises en évidence ici illustrent les limites de cette approche indirecte de *drug design*. La suite de notre travail sera donc consacrée à évaluer l'utilité de ce modèle et à tenter de l'améliorer.

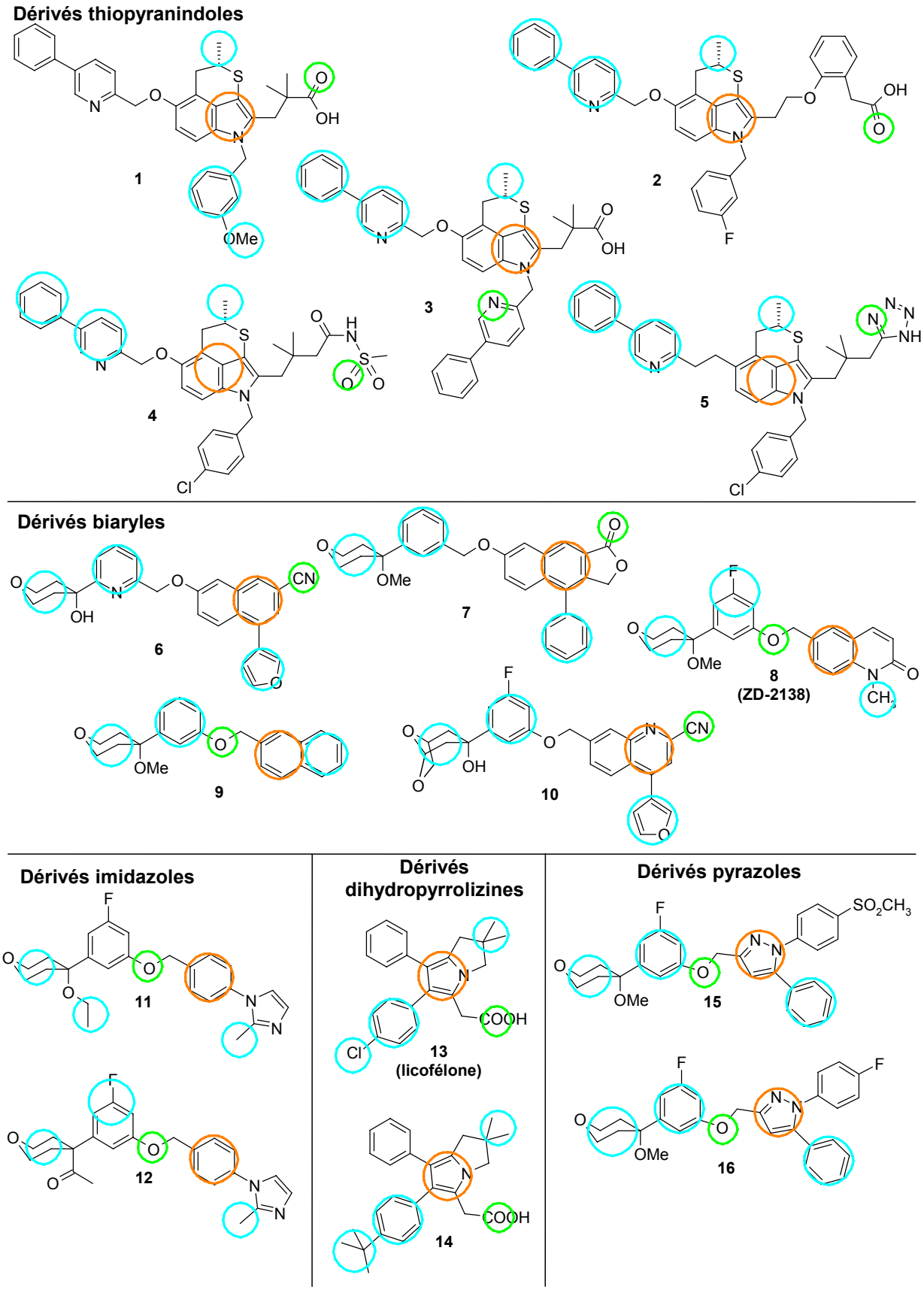


Figure 5. 9 Superposition des éléments de l'hypothèse de pharmacophore sélectionnée (**RHHHA**) aux 16 inhibiteurs de départ. Le code de couleur utilisé est le suivant : accepteur de protons **A** en vert, groupement hydrophobe **H** en cyan et cycle aromatique **R** en orange.

4.3. Conclusion

La comparaison, à l'aide de *Catalyst* (module *HipHop*), de **16 inhibiteurs 5-LOX non redox**, appartenant à cinq familles structurales différentes, nous a permis de mettre en évidence un **premier pharmacophore à 5 points**, comprenant un cycle aromatique (**R**), trois groupements hydrophobes (**H**) et un accepteur de protons (**A**). Ce modèle permet d'expliquer, en partie, les données de RSA disponibles pour les différents inhibiteurs utilisés pour le développer. Il présente également certaines faiblesses et il nous est donc apparu important de vérifier sa pertinence à l'aide de molécules n'appartenant pas à l'ensemble de départ.

5. Evaluation du modèle de pharmacophore

Nous avons évalué la qualité du pharmacophore mis en évidence en l'utilisant comme requête pour cribler la banque *Maybridge*[23]. Celle-ci regroupait un peu plus de 53400 composés commerciaux au moment de notre étude. Quelques molécules, répondant au modèle, et donc potentiellement inhibitrices de la 5-LOX, ont été sélectionnées et leur activité vis-à-vis de l'enzyme évaluée.

5.1. Criblage virtuel de la banque Maybridge

Il est possible, à l'aide de *Catalyst*, d'effectuer un criblage virtuel dans une banque de composés à l'aide d'une hypothèse de pharmacophore. Chaque molécule de la banque se trouve sous la forme de différents conformères de basse énergie, générés par *Catalyst* au préalable.

L'hypothèse de pharmacophore 5-LOX retenue a donc été utilisée comme filtre *in silico* pour cribler la banque *Maybridge*. Chaque molécule de la banque a été comparée au pharmacophore (*Fast Flexible Search*). Les 300 premières se superposant à tous les points du pharmacophore ont été retenues (remarquons que ce ne sont pas forcément les 300 meilleures de la banque).

Ce nombre de composés étant trop important que pour envisager leur achat et leur évaluation pharmacologique dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons pris en compte

[23] www.maybridge.com
A l'heure actuelle (2005), *Maybridge* compte près de 58000 composés.

d'autres critères de sélection pour en réduire le nombre. La stratégie que nous avons adoptée est présentée à la **Figure 5. 10**.

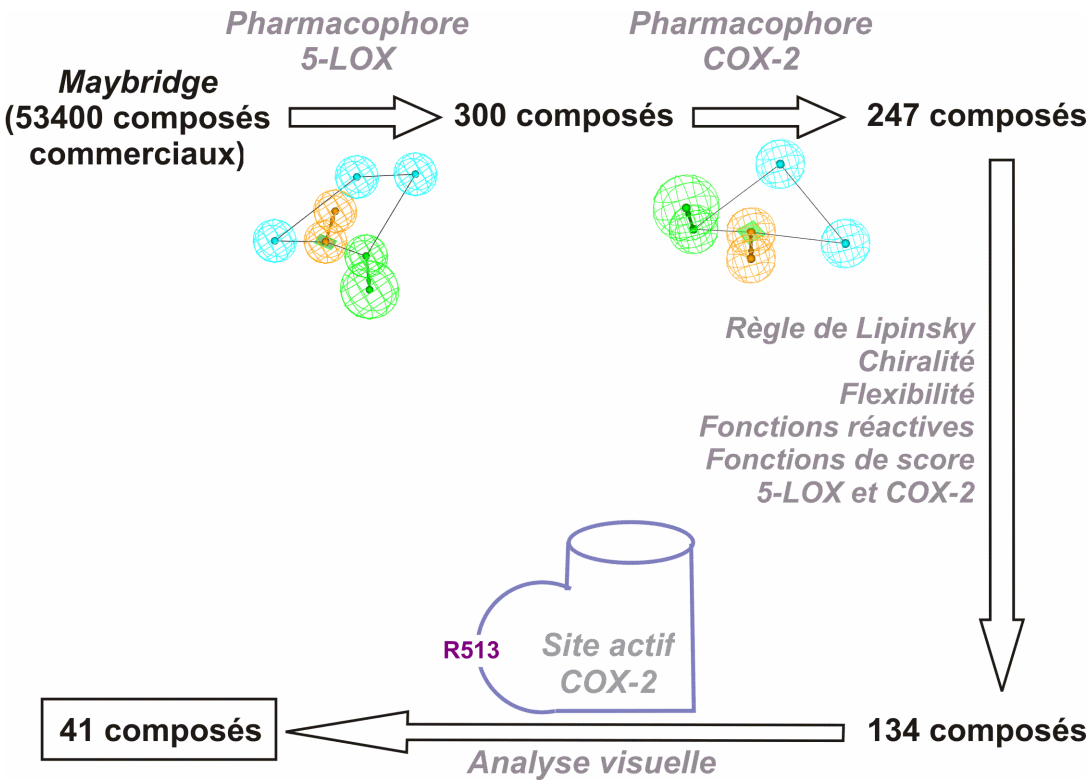


Figure 5. 10 Stratégie mise en œuvre lors du criblage virtuel de la banque *Maybridge*

D'une part, notre objectif à terme est d'aider à l'identification d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2. Nous avons dès lors exploité le **pharmacophore d'inhibiteurs COX-2** mis en évidence précédemment (cfr Chapitre 2, **point 1**) pour ne retenir que les molécules répondant aux deux modèles. D'autre part, dans une démarche de criblage virtuel, il est important de prendre en compte le plus tôt possible les propriétés physico-chimiques des composés qui affecteront leur comportement au sein de l'organisme. Nous avons donc appliqué la **règle de Lipinski** qui rend compte des propriétés favorables pour une bonne absorption intestinale. [Lipinski, 2001] Seuls les composés présentant un poids moléculaire inférieur à 500, un nombre de donneur de ponts H inférieur à 5 et un nombre d'accepteurs de ponts H inférieur à 10 ont été retenus.[24] Les **composés fort flexibles** ont été éliminés

[24] La règle de Lipinski spécifie également que la lipophilie (représentée par le logP) doit être inférieure à 5. Le ClogP a donc été calculé mais en dernier lieu, sur le plus petit nombre de composés.

(nombre de liaisons rotatoires supérieur à 7), de même que les **molécules chirales**[25] et celles présentant des **fonctions chimiques réactives** (pont disulfure et cétone α-β insaturée). [Rishton, 1997] Le ***fit***, fonction de score caractérisant la qualité de la superposition des composés aux pharmacophores 5-LOX et COX-2, nous a également permis d'en écarter certains. Nous n'avons retenu que ceux présentant un *fit* supérieur à 2.0 pour le pharmacophore 5-LOX et supérieur à 1.0 pour le pharmacophore COX-2. Enfin, nous avons analysé visuellement chaque molécule sur base de sa bonne **complémentarité** avec le **site actif COX-2**. Les composés présentant une fonction accepteur de protons peu encombrée nous ont semblé les plus intéressants, ce groupement devant se loger au sein de la poche de sélectivité, limitée stériquement. Au final, une **quarantaine de molécules** ont été retenues.

Parmi celles-ci, nous en avons, dans un premier temps et de manière arbitraire, choisi **cinq** pour les tester vis-à-vis de la 5-LOX. Ces molécules ainsi que les éléments des pharmacophores 5-LOX et COX-2 sont présentés aux **Figure 5. 11** et **Figure 5. 12**.

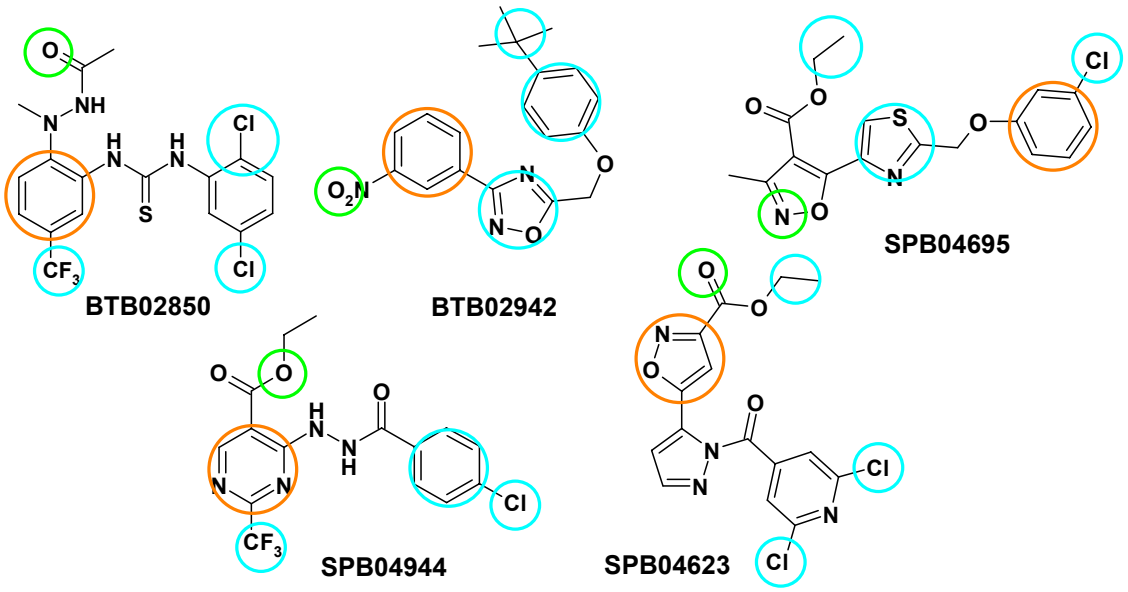


Figure 5. 11 Représentation des cinq composés sélectionnés lors du criblage virtuel, avec les points du pharmacophore **5-LOX**. Le code de couleur utilisé est le suivant : accepteur de protons **A** en vert, groupement hydrophobe **H** en cyan et cycle aromatique **R** en orange.

[25] Les composés chiraux sont exclus car ils sont le plus souvent fournis sous forme de mélange racémique, ce qui engendre des complications pour l'évaluation biologique (liées à la séparation des isomères).

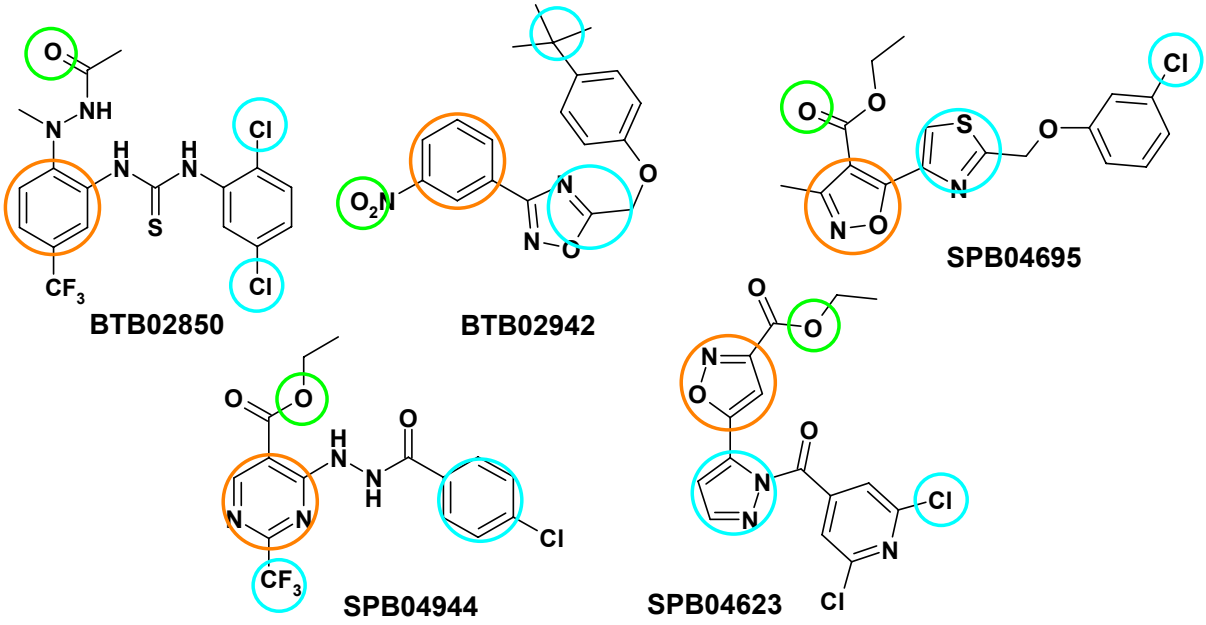


Figure 5. 12 Représentation des cinq composés sélectionnés lors du criblage virtuel, avec les points du pharmacophore **COX-2**. Le code de couleur utilisé est le suivant : accepteur de protons **A** en vert, groupement hydrophobe **H** en cyan et cycle aromatique **R** en orange.

5.2. Evaluation pharmacologique des composés sélectionnés

L'activité inhibitrice 5-LOX des cinq composés *Maybridge* retenus a été évaluée à l'aide d'un **test sur sang total**. Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (Lille) par le Dr Pommery.

Le **principe du test** est le suivant : 1 ml de sang humain total est prélevé en dépression sous héparine dans un tube en verre. L'échantillon est préincubé en présence de la molécule testée, pendant 15 minutes sous agitation à 37°C. La 5-LOX est ensuite stimulée par ionophore calcique (A23187) à 4.10^{-5} M pendant 30 minutes sous agitation à 37°C. Les eicosanoïdes formés par l'enzyme, **LTB_4** et **5*S*-HETE**, sont extraits à l'aide d'acétate d'éthyle (3 ml), en présence d'un standard interne[26]. L'échantillon est centrifugé et la phase organique surnageante récupérée. Après évaporation à sec sous courant d'azote à 40°C, l'extrait sec est remis en solution dans 40 µl de la phase mobile HPLC, centrifugé, et la phase surnageante est récupérée. Elle est ensuite analysée par HPLC couplée à un détecteur UV (le LTB_4 absorbe à 274 nm tandis que le 5*S*-HETE absorbe à 230 nm).

[26] Il est vérifié au préalable que le standard interne n'interfère pas avec l'inhibiteur testé lors de la séparation par chromatographie.

Le pouvoir inhibiteur des cinq composés *Maybridge* sélectionnés a d'abord été évalué à une concentration de 10^{-4} M (**Tableau 5. 4**).

Tableau 5. 4 Pourcentage d'inhibition de la 5-LOX par les composés *Maybridge*, à une concentration de 10^{-4} M

Composé	Pourcentage d'inhibition à 10^{-4} M
BTB02850	100
BTB02942	0
SPB04623	0
SPB04695 *	0
SPB04944	0

* Composé non solubilisable à 10^{-4} M, testé à 2.10^{-5} M

Alors que les autres molécules sont complètement inactives à cette concentration, nous pouvons constater que seul le **BTB02850** présente une activité inhibitrice de 100 % à 10^{-4} M. Son pouvoir inhibiteur a donc été investigué à d'autres concentrations et il présente une **IC_{50} de 6.19 µM**. L'IC_{50} du **zileuton**, inhibiteur 5-LOX commercialisé, utilisé comme référence lors du test, est de **0.73 µM**.

5.3. Conclusion

Le **criblage virtuel** de la banque *Maybridge* à l'aide du pharmacophore 5-LOX à 5 points, en conjonction avec différents autres filtres *in silico* (dont le pharmacophore COX-2), nous a permis de sélectionner **cinq composés répondant au modèle**.

Leur pouvoir inhibiteur a été évalué vis-à-vis de la 5-LOX dans un test sur sang total et **seul un composé**, le BTB02850, est **actif**. Ce premier résultat est **encourageant** car cet inhibiteur présente une activité relativement proche de celle du zileuton (facteur 10), utilisé comme référence lors du test. Il sera intéressant par la suite de tester son pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la COX-2 et ainsi, d'évaluer son potentiel en tant qu'inhibiteur mixte.

Toutefois, seule une molécule sur les cinq retenues est active sur la 5-LOX. Ce résultat nous montre donc aussi la nécessité d'**affiner le modèle de pharmacophore** avant d'aller plus loin dans l'identification de composés mixtes 5-LOX/COX-2.

6. Ajustement des paramètres contrôlant la génération des hypothèses

La première série d'hypothèses a été générée sur base des **paramètres par défaut** du programme *Catalyst* (cfr Annexes). Bien que le modèle à 5 points retenu soit déjà intéressant et nous ait permis d'identifier un composé actif vis-à-vis de la 5-LOX, il est important de tenter de l'améliorer.

D'une part, l'hypothèse est peu sélective. En effet, nous avons effectué une recherche dans la banque *Maybridge*[27] à l'aide du pharmacophore, sans fixer de limite quant au nombre de molécules sélectionnées. 12919 hits, soit près de 25 % de la banque, répondent au modèle. Nous avons donc choisi de **diminuer la tolérance** accordée aux points du pharmacophore, de 1 Å à **0.8 Å**.

D'autre part, les composés de type dihydropyrrolizine (**13** et **14**) sont plus petits que les autres inhibiteurs. Dès lors, pour ne pas biaiser la génération des hypothèses en forçant la superposition de ces dérivés aux autres, nous avons modifié le **paramètre *Misses***. Celui-ci contrôle le nombre de molécules qui peuvent ne pas se superposer à tous les points d'une hypothèse. Nous l'avons fixé à **2** au lieu de 1.

Dix nouvelles hypothèses de pharmacophore à 5 points ont été générées sur base de ces paramètres modifiés.[28] Leurs caractéristiques moléculaires et la fonction de score qui leur est associée sont présentées dans le **Tableau 5. 5**.

Tableau 5. 5 Caractéristiques moléculaires et fonction de score de la nouvelle génération d'hypothèses

Hypothèses	Caractéristiques moléculaires	Fonction de score
1	RHHAA	163.1
2	RZHAA	162.9
3	RHHAA	158.3
4	ZHHAA	157.9
5	ZHHAA	157.5
6	RHHAA	156.8
7	RHHAA	156.0
8	RHHAA	155.8
9	RHHAA	155.3
10	RZHAA	155.3

[27] Un premier filtre a été appliqué à la banque *Maybridge* de manière à ne garder que les composés présentant un poids moléculaire compris entre 150 et 500. Dans la suite de ce travail, nous utiliserons toujours cette banque filtrée au niveau du poids moléculaire, qui compte 50638 composés au lieu des 53404 de départ.

[28] L'ensemble des paramètres contrôlant la génération des hypothèses est repris en annexe.

Nous pouvons constater que ces modèles comportent tous un accepteur de ponts H (**A**) supplémentaire et un groupe hydrophobe (**H**) de moins, comparativement à la première série d'hypothèses (**Tableau 5. 5** et **Tableau 5. 3**). Ils peuvent, à nouveau, être répartis en trois groupes distincts : **RHHAA** (hypothèses 1, 3, 6, 7, 8 et 9), **ZHHAA** (hypothèses 4 et 5) et **RZHAA** (hypothèses 2 et 10).

Sur base de la superposition d'inhibiteurs représentatifs de chaque classe structurale avec chacun des modèles, nous avons sélectionné la **sixième hypothèse** (**Figure 5. 13**). Elle comporte un cycle aromatique (**R**), deux groupements hydrophobes (**H**) et deux accepteurs de protons (**A**).

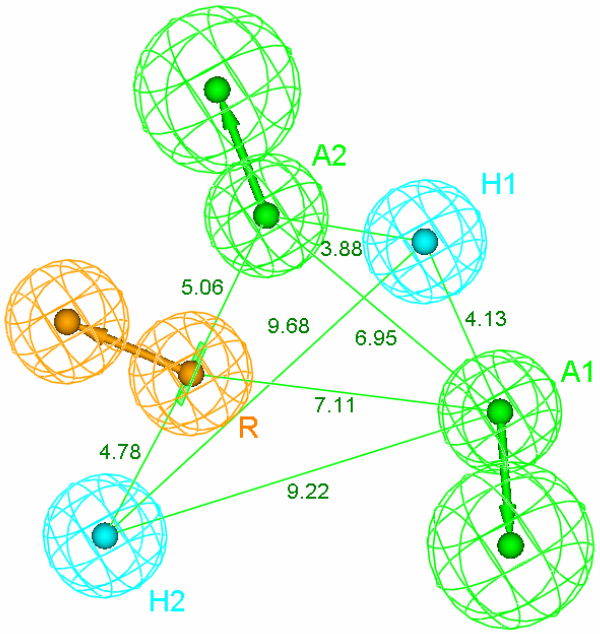


Figure 5. 13 Hypothèse de pharmacophore pour des inhibiteurs 5-LOX non redox retenue. Elle comprend deux accepteurs de protons **A** (en vert), deux groupes hydrophobes **H** (en cyan) et un cycle aromatique **R** (en orange). Les distances entre les différentes fonctions sont exprimées en Å, avec une tolérance de ± 0.8 Å.

L'alignement des points du pharmacophore avec les différents inhibiteurs (**Figure 5. 14**) est quelque peu différent de celui obtenu avec l'hypothèse sélectionnée lors de la première génération (**Figure 5. 9**). Toutefois, ce modèle permet également d'expliquer en grande partie les données de RSA disponibles.[29]

Notamment, un des deux accepteurs de protons (**A**) correspond à l'oxygène du cycle tétrahydropyrane, particulièrement important pour l'affinité de plusieurs des familles étudiées

[29] Les données de RSA sont rappelées dans le **volet A** à la fin du manuscrit.

(biaryles, pyrazoles et imidazoles). Il souligne également l'importance de la fonction acide des dérivés thiopyranindoles. Les groupements hydrophobes (**H**) se superposent au groupement méthyle en équatorial et au groupement hydrophobe volumineux des dérivés thiopyranindoles, au cycle aromatique de taille limitée des composés biaryles ou encore au méthyle en position 2 des dérivés imidazoles. Le cycle aromatique (**R**), tout comme dans l'hypothèse de première génération, correspond au noyau aromatique central (naphtalène, indole, dihydropyrrolizine, etc.) des inhibiteurs.

Le second accepteur de protons (**A**), quant à lui, correspond principalement, dans chacune des familles étudiées, à un atome d'oxygène de type éther. L'importance de cette fonction n'a pas été investiguée expérimentalement pour chaque classe structurale. Cependant, pour les dérivés thiopyranindoles et biaryles, elle ne semble pas directement impliquée dans l'interaction avec l'enzyme mais jouerait plutôt un rôle dans le positionnement correct des autres groupements.

Remarquons que les dérivés dihydropyrrolizines, plus petits que les autres inhibiteurs, ne comportent qu'un seul accepteur de protons. Ils sont autorisés à ne pas se superposer à tous les points de l'hypothèse (cela a été pris en compte lors de la génération des hypothèses grâce au paramètre *Misses* = 2).

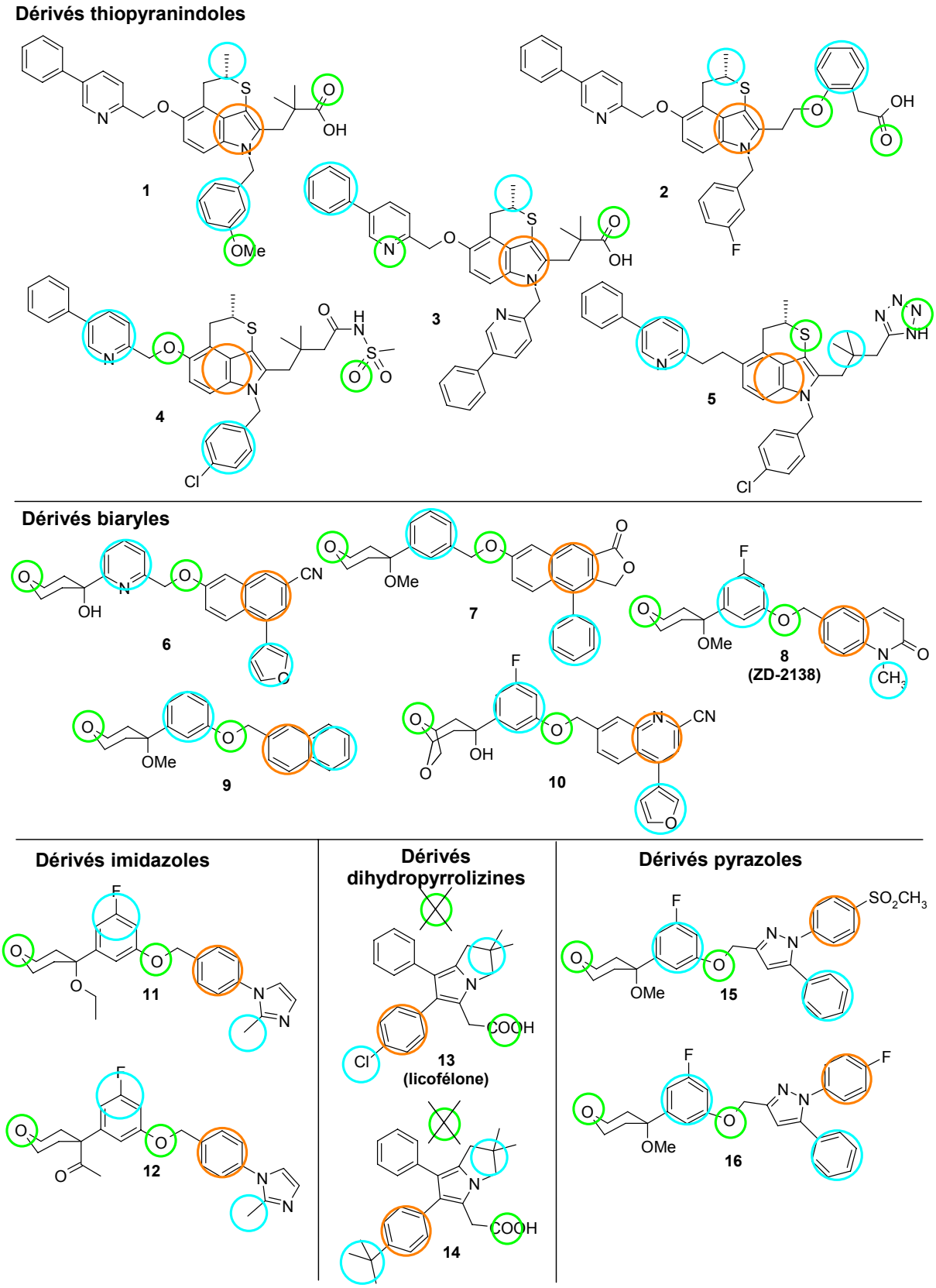


Figure 5. 14 Superposition des éléments de l'hypothèse n°6 (**RHHAA**) aux 16 inhibiteurs de départ. Le code de couleur utilisé est le suivant : accepteur de protons **A** en vert, cycle aromatique **R** en orange et groupe hydrophobe **H** en cyan.

Dans le but d'évaluer ce modèle, nous l'avons utilisé pour cribler la banque de *Maybridge* (*Fast Flexible Search*, sans limite quant au nombre de molécules retenues). Un total de 4955 molécules, soit un peu moins de 10 % de la banque, répond à l'hypothèse de pharmacophore (contre 25 % pour le premier modèle). Parmi ces *hits*, on retrouve trois des composés sélectionnés précédemment, à savoir le composé actif **BTB02850** et deux inactifs, les **BTB02942** et **SPB04623** (**Figure 5. 15**).

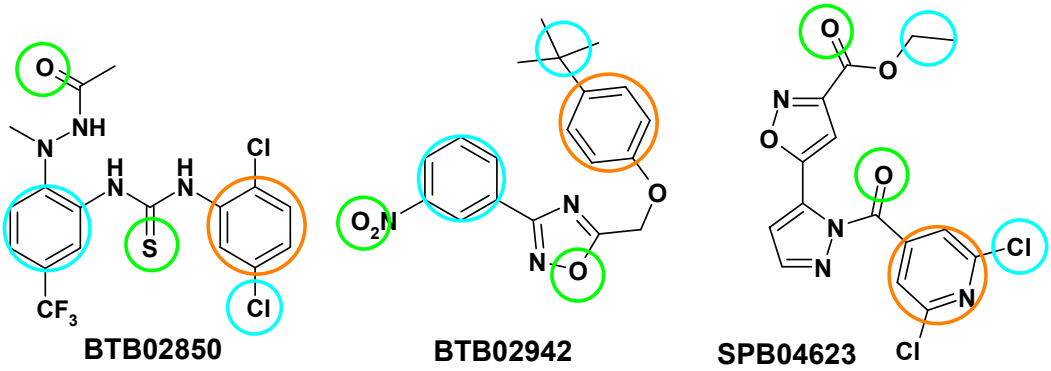


Figure 5. 15 Représentation des 3 composés de Maybridge répondant au nouveau modèle de pharmacophore (**RHHAA**). Le code de couleur utilisé est le suivant : accepteur de protons **A** en vert, cycle aromatique **R** en orange et groupe hydrophobe **H** en cyan.

Le modèle de pharmacophore que nous avons retenu, en étant plus contraignant, est plus sélectif et permet de retenir **moins de composés inactifs**, comparativement à la première hypothèse mise en évidence. Il est évident que c'est une **tendance** qui se dégage de cette étude (étant réalisée sur un très petit nombre de composés, elle n'a pas de valeur statistique). Pour la vérifier, il faudrait sélectionner de nouveaux composés et les tester vis-à-vis de la 5-LOX. Ceci n'a pu être réalisé dans le cadre de notre thèse mais, offre une perspective intéressante à notre approche de conception rationnelle.

7. Conclusion

Dans le but d'améliorer le modèle de pharmacophore obtenu suite à la comparaison des 16 inhibiteurs 5-LOX non redox sélectionnés, nous avons **ajusté deux des paramètres** contrôlant la génération des hypothèses dans *Catalyst*. D'une part, la tolérance accordée aux points du pharmacophore a été diminuée pour augmenter la sélectivité de l'hypothèse et d'autre part, nous avons fixé à 2 le nombre de composés pouvant ne pas se superposer à tous les points des modèles générés, de manière à prendre en compte la taille plus petite des dérivés dihydropyrrolizines, comparativement aux autres inhibiteurs.

Ainsi, un **second pharmacophore à 5 points** a été mis en évidence, comportant, cette fois, un cycle aromatique (**R**), deux groupements hydrophobes (**H**) et deux accepteurs de protons (**A**). Ce modèle rend compte en grande partie des tendances observées expérimentalement, même si, au regard des données de RSA disponibles, il apparaît que l'importance accordée au second accepteur de protons (**A**) doit être modérée.

Cette hypothèse, en étant plus contraignante, est **plus sélective**. Elle permet de retrouver trois des cinq composés *Maybridge* sélectionnés précédemment, dont le composé actif **BTB02850**.

Suivant l'utilisation faite des paramètres contrôlant la génération des hypothèses dans *Catalyst*, nous avons obtenu deux modèles de pharmacophore vraisemblables mais différents. Pour pouvoir affiner cette démarche, il nous semble indispensable d'introduire des données extérieures, sur la protéine et son site d'interaction avec des ligands.

Nous avons donc décidé de nous intéresser à la structure de la 5-LOX et à son interaction avec différents inhibiteurs. L'intégration de ces données structurales à notre modèle de pharmacophore devrait permettre son affinement.

CHAPITRE 6.
Etude structurale de la 5-LOX humaine

Une des étapes clés dans la conception et l'optimisation de molécules à intérêt thérapeutique est la compréhension du processus de reconnaissance moléculaire de ces ligands avec leur cible. Alors que les études de relations structure-activité (qualitatives et quantitatives) permettent de mettre en évidence les requis stéréoélectroniques des ligands nécessaires pour une bonne interaction avec leur cible, seule la structure 3D de la protéine et des complexes enzyme-ligands donnent accès aux interactions mises en jeu.

Dans ce chapitre, nous présentons notre tentative de **purification de la 5-LOX humaine** en vue de sa cristallisation. En parallèle à ces travaux expérimentaux de biochimie, nous avons également élaboré un **modèle 3D de la 5-LOX humaine par homologie**.

1. Tentative de purification de la 5-LOX humaine 114

    1.1. Stratégie 114
    1.2. Techniques expérimentales 115
        - Chromatographie d'affinité 115
        - Evaluation spectrophotométrique de l'activité enzymatique 5-LOX 116
        - Gels SDS-PAGE 118
    1.3. Résultats et discussion 119
    1.4. Conclusion 129

2. Modèle par homologie de la 5-LOX humaine 130

    2.1. Introduction 130
    2.2. Sélection du *template* 131
    2.3. Alignement des séquences 132
    2.4. Construction du modèle par *HOMOLOGY* 136
        2.4.1. Construction des régions structurellement conservées 136
        2.4.2. Construction des régions structurellement variables 136
        2.4.3. Affinement du modèle 140
    2.5. Evaluation du modèle 142
    2.6. Conclusion 145

3. Caractérisation du site actif de la 5-LOX modélisée 145

4. Etude du mode d'interaction de l'acide arachidonique 148

1. Tentative de purification de la 5-LOX humaine

Alors que la cristallisation des LOXs végétales a déjà conduit à de nombreuses structures (17 au total dans la PDB), la cristallisation des LOXs animales n'est pas aisée. Actuellement, seule la structure 3D de la 15-LOX de lapin a pu être résolue par DRX.

Dès lors, il nous est apparu intéressant d'essayer de cristalliser la 5-LOX humaine. Ce travail est vaste et notre but n'était pas de nous lancer dans tout le processus de surexpression et de purification de la protéine ; nous ne disposions pas du plasmide codant pour la protéine, ni d'un système d'expression adéquat. Par contre, l'enzyme est disponible commercialement, à des prix relativement abordables. Ainsi, nous avons acheté de la 5-LOX humaine auprès de la firme SPI-BIO[30] (France). Ses caractéristiques principales sont reprises dans la fiche signalétique présentée en annexe. Le degré de pureté de la protéine (fraction surnageante après une ultracentrifugation à 16000 g) n'étant pas suffisant pour envisager directement de la cristallogenèse, nous avons d'abord entrepris de la purifier.

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut de Recherches Microbiologiques Wiame (campus du CERIA, Anderlecht), avec la collaboration précieuse de Mme Yamina Oudjama.

1.1. Stratégie

La 5-LOX que nous avons obtenue auprès de SPI-BIO présente une **queue poly-histidine** (*His-tag*) N-terminale. Par ailleurs, comme cela a été montré dans le chapitre d'introduction (cfr Chapitre 1, **point 3.2.4**), la 5-LOX requiert la présence de différents co-facteurs, principalement du **Ca^{2+}** et de l'**ATP**, pour une activité enzymatique optimale. Nous avons donc tiré profit de ces caractéristiques structurales et biochimiques pour tenter de purifier l'enzyme de l'extrait brut fourni, et ce, par **chromatographie d'affinité.**

Dans notre cas, nous avons testé **différentes colonnes d'affinité** : colonne au Ni^{2+}, au Ca^{2+} et à l'ATP. La séparation des constituants du mélange a été suivie à l'aide d'un détecteur UV-visible placé en sortie de colonne. L'absorbance, mesurée à 260 et 280 nm, nous a renseigné sur le contenu en acides nucléiques et/ou en protéines de chaque fraction recueillie par le collecteur. Nous avons ensuite tenté de localiser notre enzyme, dans les fractions présentant un contenu protéique, en évaluant, d'une part, l'**activité enzymatique 5-**

[30] www.spibio.com

LOX, et d'autre part, en réalisant des **gels d'électrophorèse en condition dénaturante (SDS-PAGE)**.

Ne disposant pas d'un protocole établi pour la purification de la 5-LOX, nous avons procédé par essais et erreurs, adaptant, au fur et à mesure des résultats, notre démarche pour atteindre le plus haut degré de pureté possible de la protéine.

1.2. Techniques expérimentales

- **Chromatographie d'affinité** [Cuatrecasas, 2004]

La chromatographie d'affinité est sans doute une des techniques les plus répandues pour la purification des protéines. Elle repose sur l'interaction « biospécifique » et réversible entre deux partenaires particuliers (anticorps-antigène, enzyme-substrat, récepteur-ligand, etc.). Très souvent, l'anticorps, le substrat ou le ligand est fixé sur une matrice solide remplissant une colonne chromatographique. La séparation des constituants se déroule principalement en trois étapes (**Figure 6. 1**). Une fois le mélange chargé sur la colonne, la (macro)molécule à purifier s'adsorbe spécifiquement sur la résine ; elle s'y lie de manière réversible (**étape de fixation**). Ensuite, en continuant à faire passer du tampon dans la colonne, tous les contaminants du mélange sont élués et éliminés (**étape de lavage**). Enfin, la (macro)molécule retenue est décrochée de la colonne (**étape d'élution**).

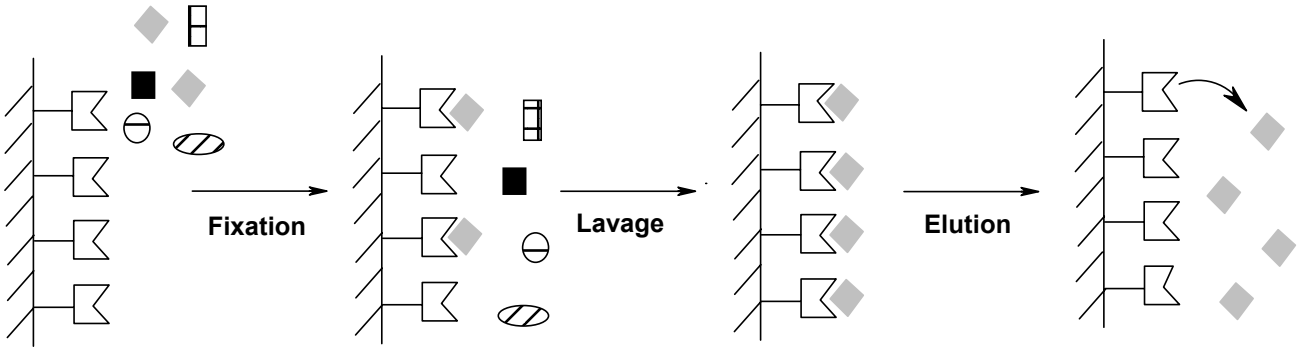


Figure 6. 1 Principales étapes de la chromatographie d'affinité

Cette technique de purification peut être utilisée pour tous les systèmes comportant deux partenaires (ou plus) en interaction. Ainsi, la **chromatographie d'affinité pour un métal** (IMAC – *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) fait appel à l'immobilisation, sur une résine, d'un cation métallique pouvant établir des liens de coordination avec certains

polypeptides. Le nickel (Ni^{2+}), par exemple, retiendra spécifiquement les protéines présentant un segment riche en résidus histidine, tel une étiquette de six histidines (H_6).

Au cours de notre travail sur la 5-LOX humaine, nous avons, la plupart du temps, effectué la purification par FPLC (*Fast Performance Liquid Chromatography*). Ce type de chromatographie permet la séparation des molécules d'un mélange au moyen d'un flux de solvant constant (phase mobile) dont la vitesse est contrôlée par des pompes. La séparation des constituants du mélange se fait selon leur capacité à adhérer et/ou diffuser dans la matrice (phase stationnaire).

- **Evaluation spectrophotométrique de l'activité enzymatique 5-LOX**

Afin de repérer les fractions contenant la protéine d'intérêt, nous avons évalué l'activité enzymatique 5-LOX des différents échantillons, à l'aide d'un test spectrophotométrique décrit dans la littérature. [Denis, 1991; Riendeau, 1989]

Dans ce test, l'enzyme est incubée avec son substrat, l'AA, en présence de Ca^{2+}, d'ATP et de phosphatidylcholine (PC).[31] La **production de 5*S*-HPETE** qui en résulte est suivie grâce à la variation d'absorbance à la longueur d'onde de **234 nm** (λ d'absorbance du diène conjugué) (**Figure 6. 2**).

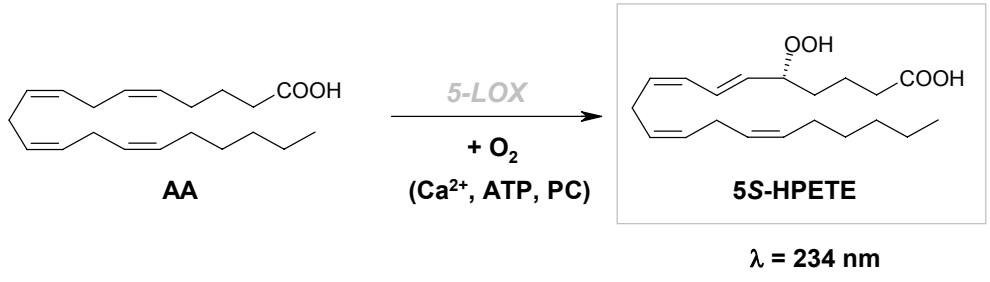


Figure 6. 2 Réaction enzymatique catalysée par la 5-LOX suivie par spectrométrie UV

Le mélange réactionnel consiste en un tampon phosphate (0.05 M, pH 7.4) comprenant du $CaCl_2$ (0.4 mM), de l'ATP (0.2 mM), de la PC (24 µg/ml), de l'AA (20 µM) et un aliquot d'enzyme (variable) dans un volume final de 1.0 ml. La réaction se déroule dans une cuvette de 1.5 ml et est initiée par l'ajout de l'enzyme. La cuvette est mélangée (trois retournements avec un parafilm pour obstruer la cuvette) avant que la variation

[31] La PC a pour fonction de stabiliser l'enzyme en solution. Par ailleurs, elle permet une plus grande concentration de l'AA en solution en limitant son adsorption sur les parois de la cuvette.

d'absorbance à 234 nm ne soit mesurée en fonction du temps à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 20. Pour chaque test, nous avons d'abord effectué un « blanc » (mélange réactionnel sans enzyme).

Comme nous ne connaissons pas la quantité (en mg) de 5-LOX dans l'extrait qui nous a été fourni, nous n'avons pu déterminer l'**activité spécifique** de l'enzyme (activité enzymatique par mg de protéine). Par contre, nous avons identifié les fractions contenant de la 5-LOX en mesurant l'**activité enzymatique** (quantité de produit 5*S*-HPETE formé par minute) dans la cuvette. Elle est donnée par la relation (1) :

$$\textit{Activité enzymatique} = \frac{dA}{min} \cdot \frac{v}{\varepsilon . d} \qquad (1)$$

avec v, le volume de la cuvette (1.0 ml),

ε, le coefficient d'extinction molaire du 5(S)-HPETE à 234 nm (23000 $M^{-1}cm^{-1}$),

d, le chemin parcouru par le rayonnement à travers l'échantillon (1 cm),

dA/min, la pente initiale (exprimée en min^{-1}).

La réaction catalysée par la 5-LOX (**Figure 6. 3**) est une **réaction de premier ordre** et peut être caractérisée par l'équation (2) [Riendeau, 1989]:

$$V = V_0 e^{-k_{obs} t} \qquad (2)$$

avec V, la vitesse au temps t,

V_0, la vitesse au temps t_0 (vitesse initiale),

k_{obs}, la constante de vitesse de premier ordre pour l'inactivation de l'enzyme.

Etant donné que la vitesse correspond à la variation d'absorbance par rapport au temps (V = dA/dt), l'intégration de l'équation (2) donne :

$$A = \frac{V_0}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs} t}) + A_0 \qquad (3)$$

avec A, l'absorbance au temps t et A_0, l'absorbance au temps t_0.

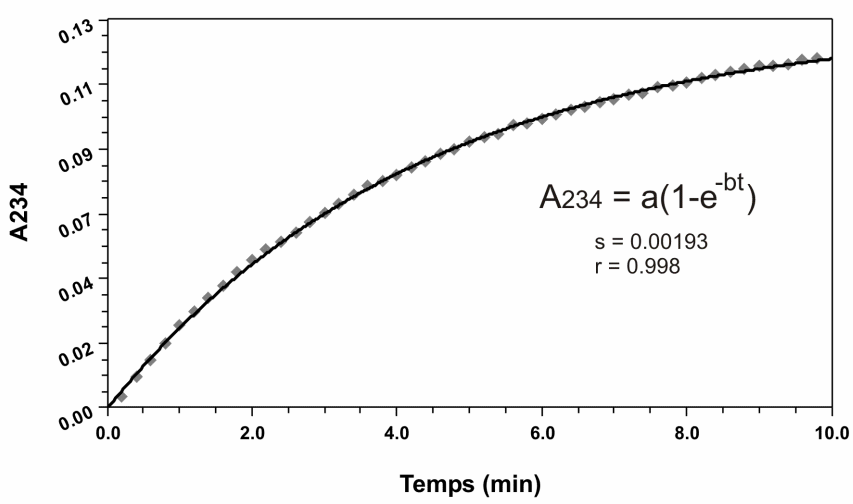


Figure 6. 3 Variation de l'absorbance à 234 nm en fonction du temps lors de la réaction catalysée par la 5-LOX. Les points expérimentaux sont représentés en gris tandis que la courbe obtenue par régression non linéaire est représentée en noire. L'équation de la courbe est donnée et, S et r correspondent à l'erreur standard et au coefficient de corrélation, respectivement.

L'analyse des données obtenues, par **régression non linéaire** à l'aide du logiciel *CurveExpert* [Hyams, 2001], permet de retrouver l'équation (3) proposée pour la courbe et ainsi, permet d'accéder aux valeurs des vitesse initiale (V_0) et constante de vitesse (k_{obs}). Elles valent, respectivement, 0.0308 min^{-1} et 0.233 min^{-1}, dans l'exemple présenté ici.

- **Gels SDS-PAGE**

Afin de repérer notre cible dans les différentes fractions obtenues, nous avons réalisé des **gels d'électrophorèse en condition dénaturante** ou **SDS-PAGE** (pour *Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)*. Cette technique d'électrophorèse permet la **séparation des protéines selon leur poids moléculaire**, dans une matrice appropriée soumise à un courant électrique continu. Plus la molécule est grosse, plus elle se déplacera lentement. Plus elle est petite, plus elle ira vite.

D'abord, les protéines sont dénaturées (bain à 70 °C pendant 5 minutes) et chargées négativement à l'aide du détergent anionique SDS. Celui-ci enveloppe leur chaîne et leur confère ainsi une charge négative proportionnelle à leur longueur. Un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT), est également ajouté à chaque échantillon pour rompre les ponts disulfures. Les protéines, ainsi dépliées et uniformément chargées en fonction de leur masse, peuvent ensuite être séparées par électrophorèse. Un courant électrique continu de 200 Volts est appliqué au gel et la vitesse de migration des protéines, uniformément chargées, dans le gel est proportionnelle à leur masse. Une fois séparées, les protéines

sont révélées directement sur le gel par coloration au bleu de Coomassie (sensibilité à partir de 100 ng) ou au nitrate d'argent (sensibilité de 1 à 10 ng).

Les gels utilisés dans ce travail (NuPAGE 10% Bis-Tris avec MOPS, Invitrogen) comportent deux parties : le *stacking gel* dans lequel les échantillons (15 µl maximum) sont déposés et le *resolving gel* où s'effectue la migration des protéines.

1.3. Résultats et discussion

Dans un premier temps, nous avons tenté de purifier la 5-LOX au moyen d'une **colonne au Ni^{2+}** (résine *chelating sepharose*). L'enzyme est fournie dans une solution contenant de l'EGTA (5 mM). Cet agent pouvant chélater le Ni^{2+}, nous avons d'abord dialysé l'échantillon pour l'éliminer (tampon Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, renouvelé trois fois, sous agitation en chambre froide). L'activité 5-LOX mesurée après la dialyse est de 2.3 10^{-4} µmole.min^{-1}. Un aliquot de l'extrait (2.5 ml) a ensuite été chargé sur la colonne chromatographique (FPLC). Dans un premier temps, un tampon de lavage (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM) est passé sur la colonne pour éliminer au maximum les contaminants tandis que la protéine doit être retenue spécifiquement grâce à sa queue d'histidines. Par après, la protéine, si elle s'est accrochée, est décrochée de la colonne (étape d'élution) à l'aide d'imidazole, qui entre en compétition avec l'histidine pour coordonner le nickel (gradient de concentration en imidazole de 5 à 500 mM, tampon Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, NaCl 100 mM).

Tout au long de la séparation, l'absorbance est mesurée à 260 et 280 nm (représentée en rouge et en bleu, respectivement, sur le chromatogramme). Cela permet de rendre compte de la composition en acides nucléiques (l'ARN et l'ADN absorbent entre 250 et 260 nm) et/ou en protéines (les résidus aromatiques Phe, Tyr et principalement le Trp, absorbent à 280 nm).

Le chromatogramme obtenu est présenté à la **Figure 6. 4**. Nous pouvons observer un premier pic au niveau de la zone de lavage, comportant des acides nucléiques en majorité mais également de la (des) protéine(s). Un second pic, beaucoup moins important, est également présent, au début de l'élution de la colonne avec l'imidazole.

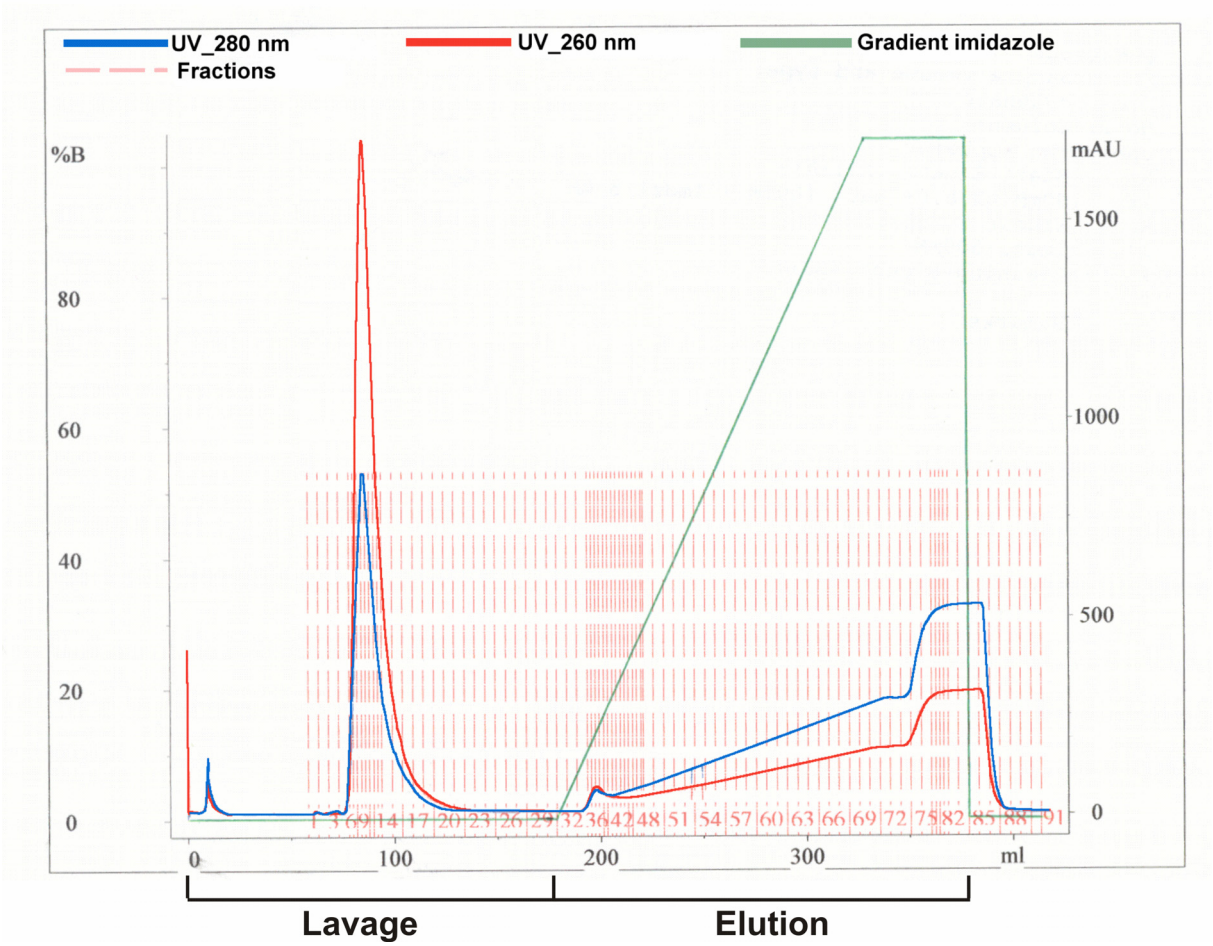


Figure 6. 4 Chromatogramme obtenu pour la purification de la 5-LOX humaine à l'aide d'une colonne au Ni^{2+}

L'activité enzymatique des fractions correspondant aux deux pics (fractions 9 et 35) a été évaluée par spectrométrie UV. Une faible activité est observée pour la fraction 9, uniquement (0.5 10^{-4} µmole.min^{-1}). **L'enzyme ne s'est donc pas accrochée spécifiquement à la colonne**.

Nous avons alors réalisé une nouvelle étape de purification au moyen d'**une colonne au Ni^{2+}**, en **changeant les conditions d'élution**. Le NaCl a été supprimé de tous les tampons. Les fractions 6 à 14, correspondant au premier pic, ont été rassemblées et dialysées durant une nuit pour éliminer le sel. Les nouvelles conditions comprenaient le tampon de lavage Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 et le tampon d'élution Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, gradient de concentration en imidazole de 5 à 500 mM.

Le chromatogramme obtenu est présenté à la **Figure 6. 5**. Nous pouvons remarquer qu'il présente un profil identique au précédent, avec un premier pic lors de l'étape de lavage et un second pic, moins important, au début du gradient en imidazole.

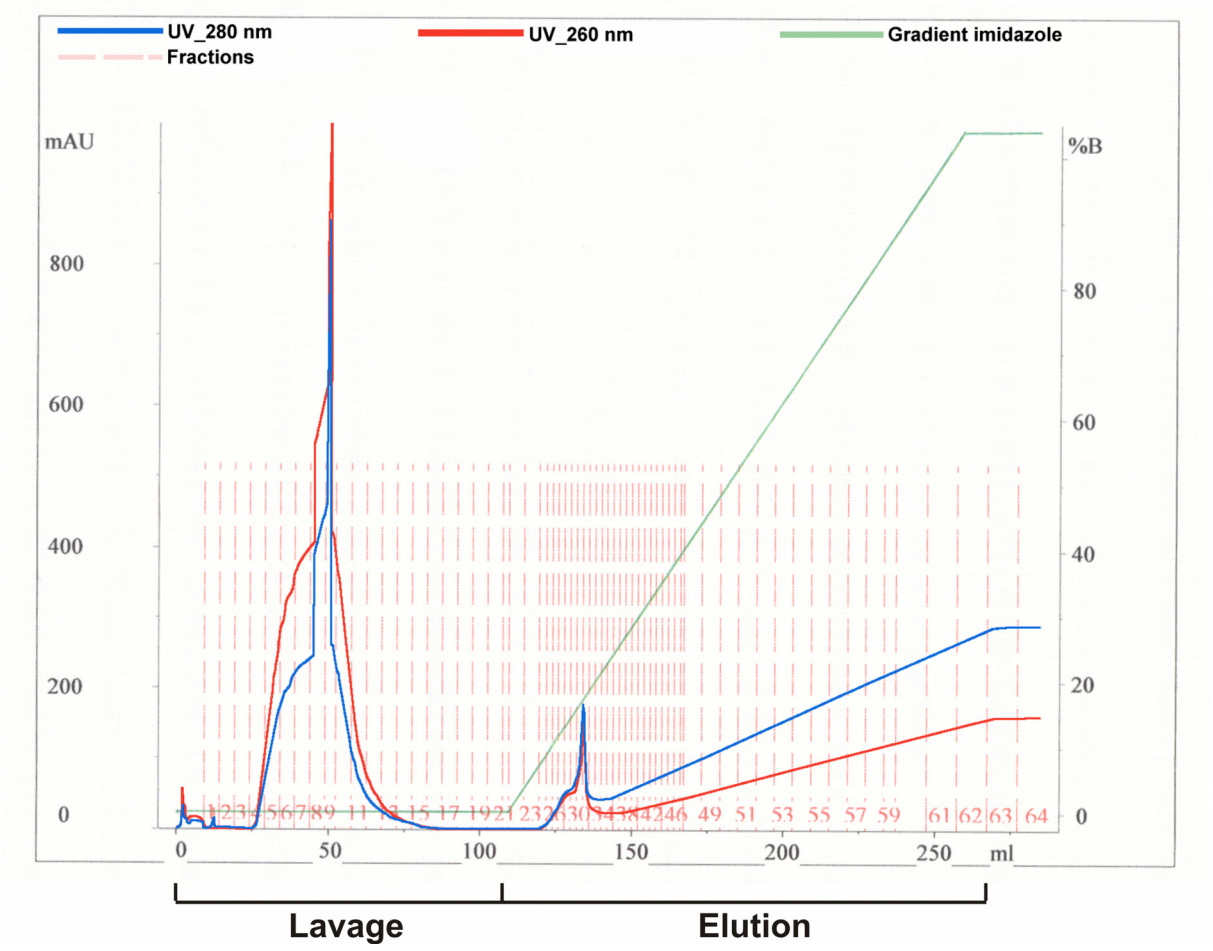


Figure 6. 5 Chromatogramme obtenu pour la purification de la 5-LOX humaine à l'aide d'une colonne au Ni^{2+} (nouvelles conditions)

L'activité enzymatique des fractions 8 et 30 a été mesurée par spectrométrie UV. A nouveau, nous pouvons conclure que **l'enzyme ne s'est pas accrochée spécifiquement à la colonne** car seul le tube 8 (correspondant à l'étape de lavage) présente une activité enzymatique (1.6 10^{-4} µmole.min^{-1}). Les fractions 4 à 13 ont donc été rassemblées et conservées à 4°C.

Ces premiers résultats sont peu concluants et remettent en cause l'accessibilité (voir même la présence ?) de la queue poly-histidines greffée sur la protéine. En effet, elle ne semble pas suffisamment accessible que pour permettre l'adsorption spécifique de l'enzyme sur la colonne au Ni^{2+}. Cela peut être dû au reploiement de la protéine, assez grosse (873 résidus), cachant la « petite » étiquette N-terminale de 6 histidines, ou encore, au nombre important de contaminants, entravant la reconnaissance entre les noyaux imidazoles et le Ni^{2+}.

Dans un deuxième temps, nous avons envisagé de tirer profit de l'affinité de la 5-LOX pour le Ca^{2+} (nécessaire à son activation) pour tenter de la purifier. Nous avons donc conditionné une **colonne avec du Ca^{2+}**. De la résine *chelating sepharose* a été déposée dans une colonne chromatographique et a ensuite été saturée avec une solution au $CaCl_2$ (tampon Tris 20 mM, $CaCl_2$ 500 mM). L'excédant de calcium a été éliminé en lavant la colonne avec une solution de tampon Tris-HCl (20 mM, pH 7.5). La moitié des fractions 4 à 13 (provenant de la seconde colonne au Ni^{2+}) a été chargée sur la colonne (FPLC). Une première étape de lavage a été réalisée à l'aide du tampon Tris-HCl (20 mM, pH 7.5) permettant à la 5-LOX de s'adsorber spécifiquement sur la résine tandis que les impuretés sont normalement éluées. Ensuite, nous avons appliqué un gradient de concentration en calcium (5 à 500 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.5). Le Ca^{2+} libre entre en compétition avec le Ca^{2+} de la colonne pour se lier à l'enzyme et permet ainsi son élution. La colonne a ensuite été totalement nettoyée (élimination du Ca^{2+}) à l'aide d'EDTA (100 mM). Cet agent chélate le calcium et permet ainsi de décrocher tout ce qui peut encore y être accroché.

Le chromatogramme obtenu est présenté à la **Figure 6. 6**. Nous pouvons, à nouveau, observer un pic important dans la zone de lavage et un plus petit au début du gradient en calcium.

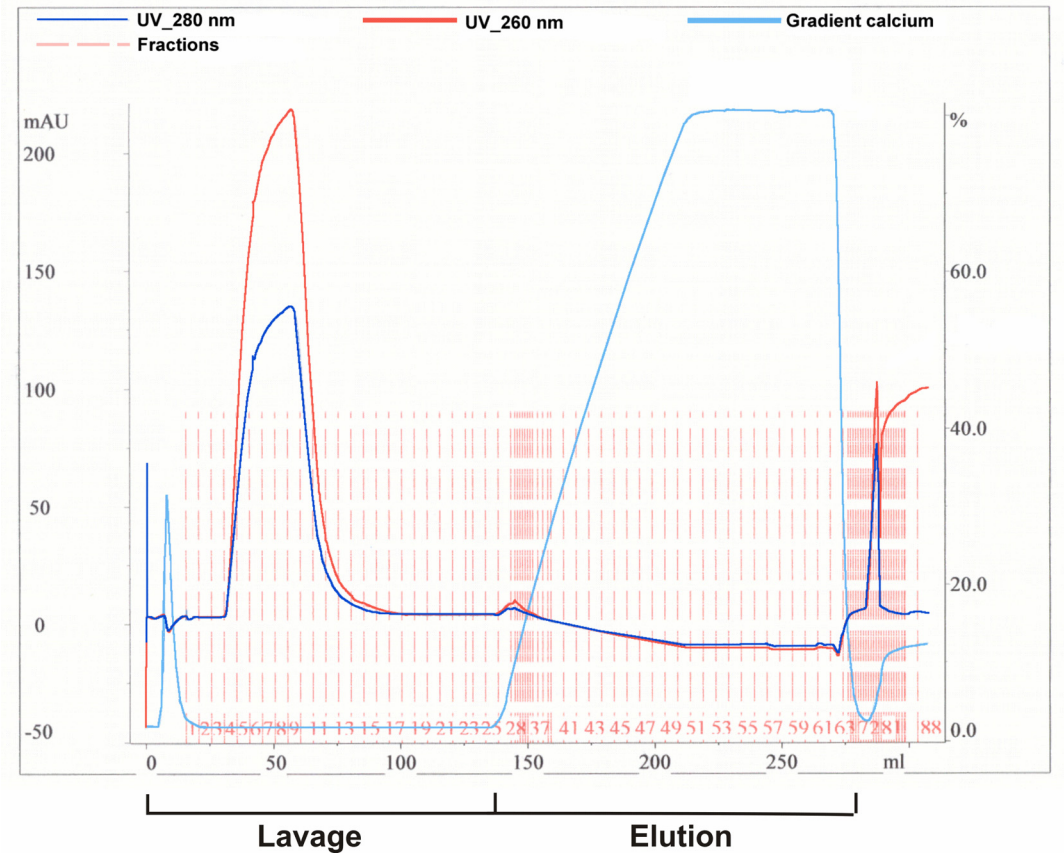
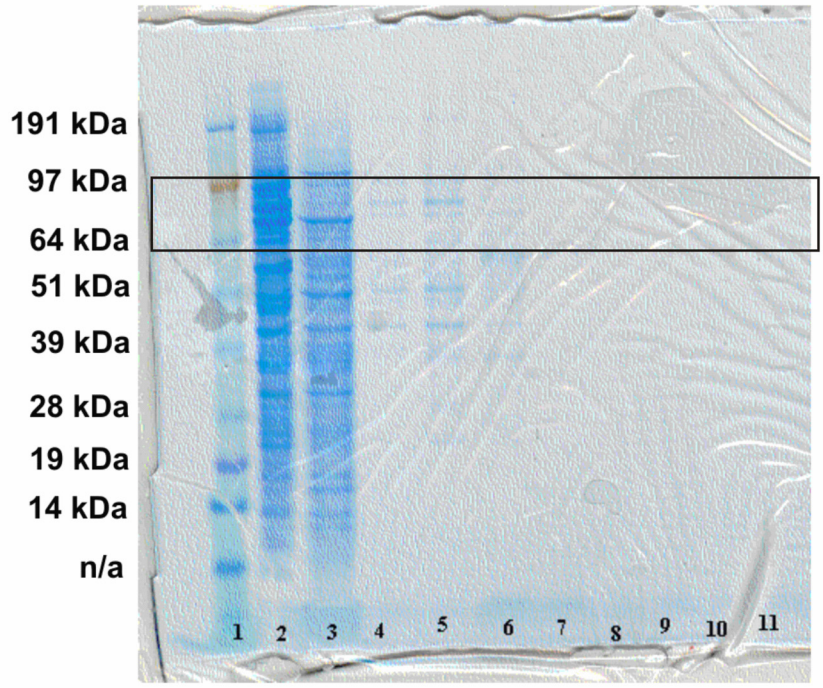


Figure 6. 6 Chromatogramme obtenu pour la purification de la 5-LOX humaine à l'aide d'une colonne au Ca^{2+}

L'activité enzymatique des fractions correspondantes (tubes 9 et 28) a été mesurée par spectrométrie UV. Cette fois, une faible activité est observée pour les deux tubes (0.6 et 0.5 10^{-4} µmole.min^{-1}, respectivement). **L'enzyme se serait donc en partie accrochée à la colonne.**

Nous avons réalisé un gel SDS-PAGE, coloré au bleu de Coomassie. Il est présenté à la **Figure 6. 7**.



Contenu des puits :

1) Marqueurs de poids moléculaire
2) Extrait brut (après la première dialyse)
3) Culot remis en suspension (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5)
4) Tube 27 (2ème colonne au Ni^{2+})
5) Tube 30 (2ème colonne au Ni^{2+})
6) Tube 9 (colonne au Ca^{2+})
7) Tube 26 (colonne au Ca^{2+})
8) Tube 27
9) Tube 28
10) Tube 29
11) Tube 75

Figure 6. 7 Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie après purification à l'aide de la colonne au Ca^{2+}

La **5-LOX** a un poids moléculaire de **78 kDa**. Elle doit donc apparaître entre les marqueurs de poids moléculaire 64 et 97 kDa. Malheureusement, il est difficile de tirer des conclusions à partir de ce gel. En effet, les pistes 7 à 11 ne révèlent rien au bleu de Coomassie tandis que les bandes visibles dans les puits 4 à 6 sont assez faibles.

Dans l'extrait brut (puits 2), on peut distinguer deux bandes principales entre les marqueurs précités. Dans le puits 3, la bande « inférieure » est plus marquée tandis que dans les puits 4 et 5 (fractions issues de la deuxième colonne au Ni^{2+}), c'est la bande « supérieure » la plus marquée. Il est difficile à l'heure actuelle de savoir à laquelle de ces deux bandes correspond la 5-LOX. Dans les puits issus de la colonne au Ca^{2+}, aucune bande n'est révélée au bleu de Coomassie. On ne peut donc pas vérifier ici si nous avons bien réussi à isoler l'enzyme. Une coloration au nitrate d'argent aurait été intéressante (la quantité de protéines déposée étant relativement faible suite aux dilutions successives) mais n'a pu être réalisée ici.

Dans un troisième temps, nous avons tenté de purifier l'enzyme à l'aide d'une **colonne ATP-agarose**. En effet, l'affinité de la 5-LOX pour l'ATP a déjà été mise à profit précédemment. [Denis, 1991]

Après avoir mis en solution l'ATP-agarose dans de l'eau distillée et avoir éliminé le lactose (stabilisant), le gel a été coulé dans la colonne et lavé au tampon phosphate 50 mM, pH 7.5. Un aliquot d'enzyme fraîche (500 µl) a ensuite été déposé sur la colonne (FPLC). Une première étape de lavage a été réalisée à l'aide du tampon phosphate (50 mM, pH 7.5). Pour s'assurer de décrocher tout contaminant, une seconde étape de lavage a été effectuée à l'aide du même tampon mais enrichi en NaCl (500 mM). Le sel, en augmentant la force ionique du milieu, permet d'éliminer les interactions hydrophobes non spécifiques entre les protéines contaminantes et la colonne. Enfin, une solution d'ATP (20 mM, tampon phosphate 50 mM, pH 7.5) a été passée sur la colonne pour décrocher l'enzyme d'intérêt.

Le chromatogramme obtenu est présenté à la **Figure 6. 8**. Trois pics peuvent être observés dans les zones de lavage. Dans la zone d'élution à l'ATP, on ne peut discerner d'éventuels pics car l'ATP absorbe également à ces longueurs d'onde.

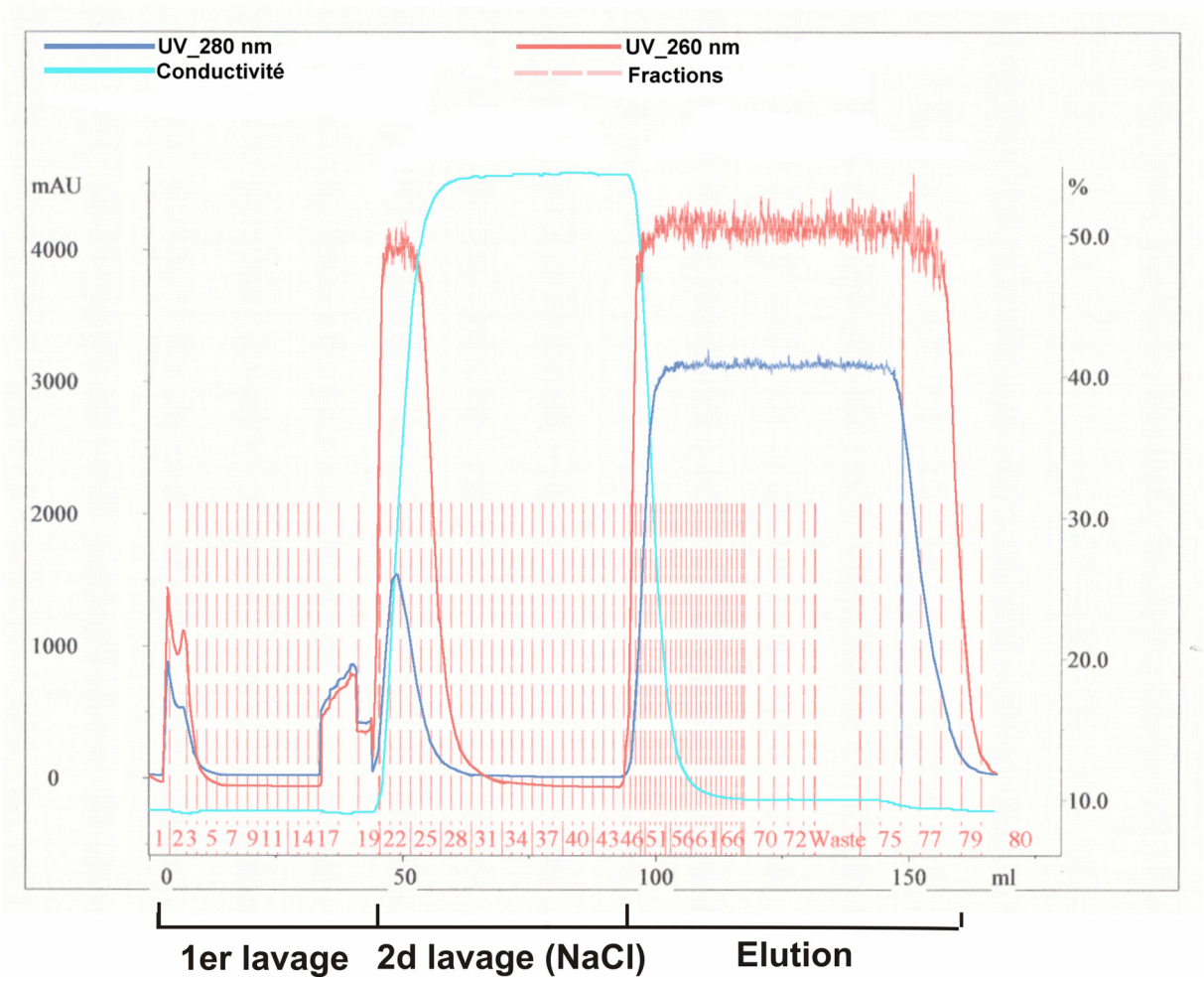
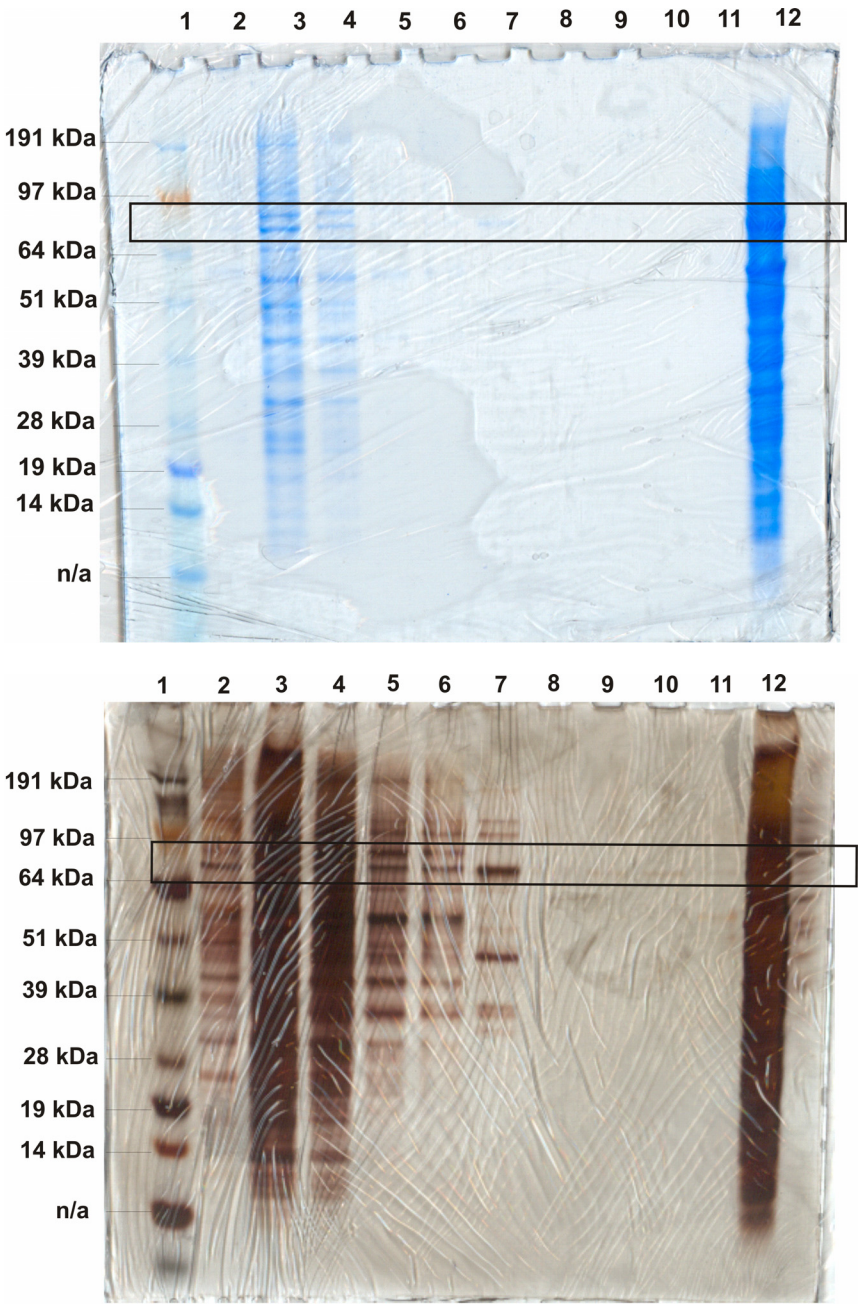


Figure 6. 8 Chromatogramme obtenu pour la purification de la 5-LOX humaine à l'aide d'une colonne ATP-agarose

L'activité enzymatique de différentes fractions (tubes 2, 3, 22, 48 et 50) a été mesurée par spectrométrie UV. Aucune activité n'a été détectée et nous n'avons donc pas pu localiser l'enzyme. Afin de déterminer quel tube contenait des protéines, nous avons réalisé un **dosage Folin** (dosage colorimétrique de la quantité de protéines). Les fractions présentant un contenu protéique ont ensuite été déposées sur un **gel SDS-PAGE**. Les résultats de l'électrophorèse sont présentés à la **Figure 6. 9**. La coloration au bleu de Coomassie ne révélant que quelques pistes, nous avons également réalisé une coloration plus sensible grâce au nitrate d'argent.



Contenu des puits :

1) Marqueurs de poids moléculaire
2) Tube **1**
3) Tube **2**
4) Tube **3**
5) Tube **4**
6) Tube **20**
7) Tube **22**
8) Tube **24**
9) Tube **48**
10) Tube **49**
11) Tube **51**
12) Extrait brut

Figure 6. 9 Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (au-dessus) et au nitrate d'argent (en-dessous) après purification à l'aide de la colonne à l'ATP-agarose

On peut remarquer que bien qu'elle soit présente dans tous les puits et surtout dans le puits 7, **l'enzyme s'est faiblement accrochée à la colonne et a été éluée par l'ATP**. L'absence d'activité enzymatique est sans doute due à la dilution.

Dans le but d'**augmenter la quantité d'enzyme s'accrochant à la colonne**, nous avons reproduit les conditions expérimentales décrites par Denis [Denis, 1991], en travaillant

à **4°C** (chambre froide) et à **très faible débit** (sous l'action de la pression atmosphérique uniquement). Par ailleurs, de l'EDTA (1 mM) a été ajouté aux tampons de lavage et d'élution utilisés pour la colonne ATP-agarose précédente. Un aliquot d'enzyme fraîche (1 ml) a été chargé sur la colonne et nous avons récolté des fractions de 50 gouttes. La colonne n'étant pas couplée à un détecteur UV dans la chambre froide, la densité optique a été mesurée « manuellement » à 260 et 280 nm, un tube sur deux. Le chromatogramme ainsi obtenu est présenté à la **Figure 6. 10**.

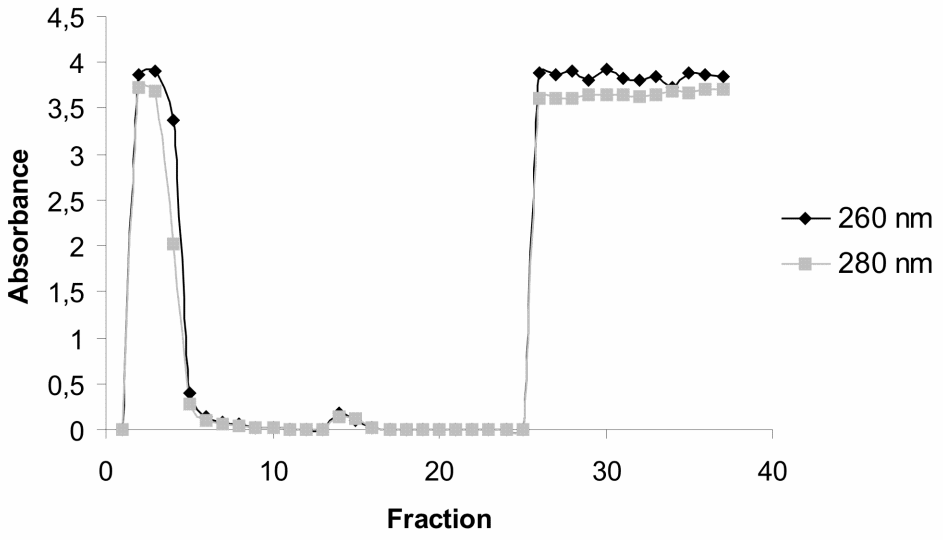
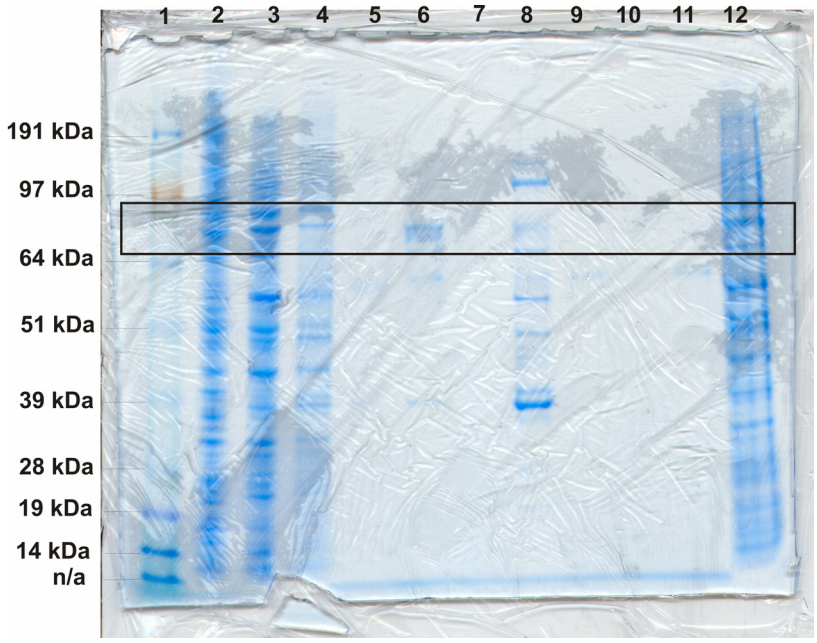


Figure 6. 10 Chromatogramme obtenu après purification de la 5-LOx humaine à l'aide d'une colonne ATP-agarose à 4°C et faible débit

(la première zone de lavage s'étend de la fraction 1 à 10 ; la seconde zone de lavage, au NaCl, s'étend de la fraction 11 à 20 et à partir de la fraction 21 commence la zone d'élution à l'ATP)

L'activité enzymatique des fractions correspondant aux pics (tubes 3, 27 et 51) a été dosée par spectrométrie UV. Aucune activité n'a pu être mesurée. Cela pouvant résulter d'un effet de dilution, nous avons concentré le tube 51 par ultrafiltration (filtration sous pression d'azote, filtre avec un *cut off* de 30 kDa). Lors du dosage enzymatique de cette **fraction concentrée**, nous avons pu observé une **nette croissance de l'absorbance, démontrant la présence de l'enzyme** ($1.7\ 10^{-4}$ µmole.min^{-1}). Par après, nous avons réalisé un gel SDS-PAGE (**Figure 6. 11**).



Contenu des puits :

1) Marqueurs de poids moléculaire
2) Tube **3**
3) Tube **5**
4) Tube **7**
5) Tube **9**
6) Fraction ATP concentrée (tube 51)
7) Sortie *diaflow*[32] ATP
8) Fractions NaCl (tubes 26-32) concentrées
9) Sortie *diaflow* NaCl (1)
10) Sortie *diaflow* NaCl (2)
11) Tube **52**
12) Extrait brut

Figure 6. 11 Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie

Nous pouvons constater que dans la piste n°6 correspondant à la fraction ATP concentrée, on retrouve la 5-LOX ainsi que trois contaminants. La piste n°8 correspondant aux fractions NaCl concentrées, par contre, présente un plus grand nombre de protéines. L'étape de lavage au NaCl a donc permis d'éliminer une grande partie des contaminants.

*La chromatographie d'affinité avec une **colonne ATP-agarose à 4°C et faible débit** permettrait donc de diminuer fortement la quantité d'impuretés et pourrait constituer une **première étape dans la purification** de notre enzyme.*

Afin d'éliminer les contaminants restant dans la fraction ATP concentrée, nous avons envisagé à nouveau une **colonne d'affinité au Ni^{2+}**. En effet, l'enzyme étant, cette fois, en présence de moins d'impuretés, elle pourrait s'accrocher plus facilement à la colonne.

[32] La sortie *diaflow* correspond ce qui est passé à travers le filtre lors de l'ultrafiltration.

L'affinité de l'enzyme a donc été testée sur une petite colonne de résine (*chelating sepharose*) saturée en Ni^{2+}. La chromatographie a été réalisée à **4°C** et à **très faible débit**. La fraction ATP concentrée, préalablement dialysée (pour éliminer l'EDTA) a été déposée dans son entièreté. Un premier lavage a été réalisé avec du tampon phosphate (50 mM, pH 7.4) avant de décrocher la protéine à l'aide d'imidazole (500 mM, tampon phosphate, 50 mM, pH 7.4). La colonne n'étant, à nouveau, pas couplée à un détecteur UV, la densité optique a été mesurée « manuellement » à 280 nm, un tube sur deux. Le chromatogramme ainsi obtenu est présenté à la **Figure 6. 12**.

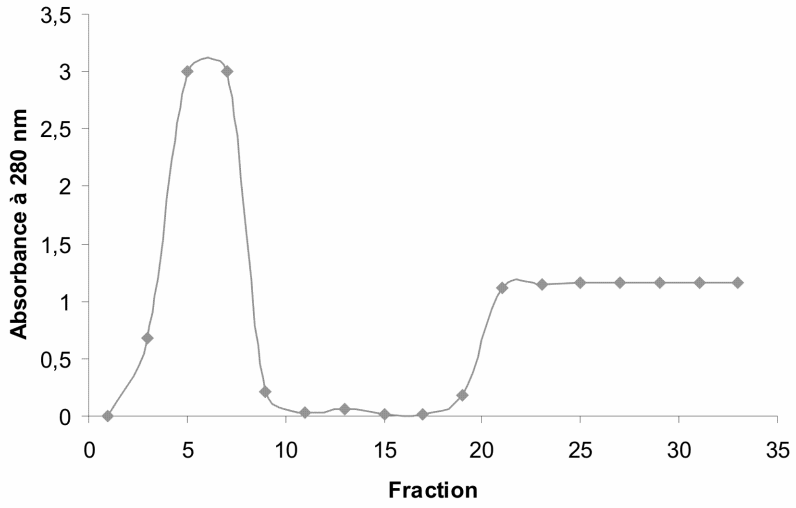


Figure 6. 12 Chromatogramme obtenu après purification de la 5-LOX humaine à l'aide d'une colonne au Ni^{2+}

L'activité enzymatique a ensuite été mesurée par spectrométrie UV pour les tubes présentant une densité optique importante (tubes 5, 7, 19 et 21). Seul le tube 21, correspondant à l'élution de la colonne avec l'imidazole, présente une faible activité enzymatique (0.2 10^{-4} µmole.min^{-1}). **L'enzyme s'est donc accrochée à la colonne au Ni^{2+}**.

Un gel SDS-PAGE a ensuite été réalisé pour déterminer le niveau de pureté de cette nouvelle fraction. Malheureusement, la coloration au bleu de Coomassie n'a rien révélé de même que la coloration au nitrate d'argent.

1.4. Conclusion

Au terme de cette partie expérimentale, différentes conditions et colonnes d'affinité ont été utilisées pour tenter de purifier la 5-LOX humaine. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une colonne d'affinité à l'ATP, en reproduisant les conditions décrites dans la

littérature. [Denis, 1991] L'enzyme obtenue est active mais malheureusement, il reste toujours trois contaminants et la quantité de protéine n'est pas suffisante pour envisager des essais de cristallogenèse.

Il était important d'essayer de purifier cette 5-LOX d'origine commerciale. Cela aurait pu ouvrir la voie vers des essais de cristallogenèse. Avant d'investiguer plus loin la purification de la 5-LOX, il serait toutefois important de maîtriser le système d'expression de la protéine pour en obtenir de plus grandes quantités.

Ces études ne nous ayant pas permis d'obtenir de la protéine suffisamment pure pour envisager la cristallogenèse et tenter d'élucider la structure 3D de la **5-LOX humaine** par DRX, nous avons entrepris de **modéliser l'enzyme par homologie**.

2. Modèle par homologie de la 5-LOX humaine

2.1. Introduction [Chivian, 2003; Godzik, 2003; Krieger, 2003]

Avec le développement de la génomique et de la protéomique, un nombre grandissant de séquences protéiques est identifié. Et, bien que de plus en plus de structures 3D de protéines soient élucidées, il n'est pas possible de déterminer toutes les structures expérimentalement. Dès lors, d'importantes recherches sont menées, dans le but de **prédire la structure 3D de protéines à partir de leur séquence en acides aminés**. [Xu, 2000]

Les méthodes disponibles aujourd'hui pour la prédiction de structures peuvent être divisées en trois grandes classes, selon leur niveau d'utilisation des informations structurales disponibles : (i) la modélisation par homologie, (ii) la reconnaissance de reploiement (*fold recognition* ou *threading*) et (iii) la modélisation *ab initio*.

Ainsi, la **modélisation *ab initio*** permet de prédire la structure 3D d'une protéine à partir de sa seule séquence, en recherchant l'optimum d'une fonction énergétique décrivant les propriétés physico-chimiques ou statistiques des acides aminés. La **reconnaissance de *fold***, par contre, se base sur la possibilité de similarité structurale entre des protéines, même en l'absence d'homologie évidente entre leur séquence. Elle identifie le reploiement que pourrait adopter une séquence cible à partir des *folds* déterminés expérimentalement et propose un alignement entre la séquence d'intérêt et le *fold* retenu. Enfin, la **modélisation par homologie** permet de prédire la conformation 3D d'une protéine cible (*target*) sur base

de l'alignement de sa séquence avec la séquence d'une (ou plusieurs) protéine de référence (*template*) dont la structure 3D est connue. Elle requiert une identité[33] entre les séquences supérieure à 30 %.

Cette dernière méthode donne, actuellement, les meilleurs résultats. Elle est basée sur deux observations majeures :

- La structure d'une protéine est déterminée par sa séquence en acides aminés uniquement.
- Au cours de l'évolution, la structure d'une protéine est mieux conservée que sa séquence. C'est-à-dire que, les changements qui s'opèrent au cours de l'évolution affectent principalement la séquence en acides aminés (substitution, addition et/ou délétion) tandis que la structure 3D, de même que la fonction de la protéine, est généralement bien conservée. Ainsi, des séquences homologues distantes adoptent des reploiements similaires.

La modélisation par homologie comporte généralement quatre étapes principales : (1) la sélection du (des) *template(s)*, (2) l'alignement des séquences en acides aminés, (3) la construction proprement dite du modèle et son optimisation et enfin, (4) l'évaluation de la qualité de la structure résultante. [Leach, 1996]

Dans cette démarche, il est important de prendre en compte toutes les données expérimentales disponibles sur les protéines apparentées à celle que l'on veut modéliser (mécanisme catalytique, relations structure-activité, données de mutagenèse dirigée, …). [Wermuth, 1996]

2.2. Sélection du template

Actuellement, trois isoformes de LOX différentes ont été cristallisées (cfr Chapitre 1.). Dans le but d'identifier celle présentant le pourcentage d'identité de séquence le plus élevé avec la 5-LOX humaine, nous avons utilisé l'algorithme *BLAST*[34] (*Basic Local Alignement Search Tool*), et plus précisément *BLASTp* dédié aux protéines. [Altschul, 1997] Il permet d'effectuer des recherches de similarité dans différentes banques de données en utilisant

[33] L'**identité** correspond aux acides aminés invariants entre deux séquences. La **similarité ou homologie**, par contre, rend compte de la ressemblance entre des séquences protéiques. Elle comprend les acides aminés identiques (identités) et les résidus homologues (résultant d'une substitution conservatrice, c'est-à-dire préservant les propriétés physico-chimiques du résidu originel).

[34] L'algorithme *BLAST* est disponible gratuitement sur le site web : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

des alignements locaux pairés des séquences. Nous avons utilisé la matrice de substitution BLOSUM62. [Henikoff, 1992]

Différents nombres sont attribués à chaque alignement, permettant d'en évaluer la qualité. En termes simples, le score correspond au nombre total de « bons appariements » pénalisé par le nombre de « mésappariements », ceux-ci pouvant correspondre soit à la substitution d'un résidu par un autre (mutation), soit à l'introduction d'un *gap*[35]. La valeur E correspond à la probabilité d'observer au hasard ce score à travers la banque considérée. Plus cette valeur est faible, plus l'alignement est significatif.

Les résultats de cette recherche de similarité pour la séquence de la 5-LOX humaine dans la banque PDB sont présentés dans le **Tableau 6. 1**.

Tableau 6. 1 Recherche de similarité pour la 5-LOX humaine dans la PDB, à l'aide de l'algorithme *BLAST*.

Protéines	Pourcentage d'identité (%)	Score (bits)	Valeur E
15-LOX de lapin	38.7	481	10^{-136}
LOX-3 de soja	30.8	187	10^{-47}
LOX-1 de soja	27.0	154	7.10^{-38}

Nous pouvons remarquer que la **15-LOX de lapin** présente les meilleurs résultats : le pourcentage d'identité de séquence et le score les plus élevés, ainsi que la valeur E la plus faible, sont l'assurance d'un alignement significatif. Nous avons donc sélectionné cette protéine comme **référence** pour l'élaboration de notre modèle 3D de la 5-LOX humaine.

2.3. Alignement des séquences

L'objectif de cette étape est de positionner les séquences d'acides aminés de telle sorte que les éléments communs aux deux protéines, comme les éléments de structure secondaire ou les résidus catalytiques, se correspondent. [Leach, 1996] Cette phase est généralement considérée comme étant la plus critique pour la qualité du modèle. [Martin, 1997]

[35] Le *gap* permet d'optimiser l'alignement entre deux séquences. Il matérialise une insertion ou une délétion dans la séquence.

Dès lors, dans le but d'améliorer cette étape essentielle, nous avons eu recours au logiciel ***ESyPred3D***, conçu au sein de l'Unité de Recherche en Biologie Moléculaire (FUNDP) du professeur Depiereux[36]. [Lambert, 2002]

EsyPred3D tire profit d'une nouvelle stratégie d'alignement de séquences. Il confronte les résultats de différents algorithmes d'alignement multiple (*PSI-BLAST, ClustalW, Dialign2, Match-Box, Multalin, PRRP*) pour en dégager un **alignement consensus** entre la séquence cible et celle du *template*. Sur base de cet alignement, il produit également un modèle 3D de la protéine cible (à l'aide de la routine *MODELLER*).

Nous avons donc appliqué cette méthode à la séquence de la 5-LOX humaine. L'alignement consensus obtenu est présenté à la **Figure 6. 13**.

La comparaison de nombreuses séquences en acides aminés de LOXs, ainsi que différentes études de mutagenèse dirigée et l'analyse des structures cristallographiques, a permis de mettre en évidence des résidus hautement conservés parmi toutes les LOXs et d'autres jouant un rôle important, notamment, dans la chélation de l'atome de fer non hémique, la stabilité de la protéine et la spécificité de position de l'oxygénation (positionnement du substrat) (cfr Chapitre 1, **point 3.2.4**). La confrontation de ces données expérimentales avec l'alignement proposé permet d'en évaluer la qualité : tous ces résidus sont correctement alignés.

Nous avons colorés (en orange) les endroits correspondants aux « cassures » dans la séquence de la 15-LOX de lapin. En effet, la résolution de la structure par DRX (2.4 Å) n'a pas permis d'obtenir des coordonnées pour ces régions (résidus 177-188 ; 210-211 ; 601-602). [Gillmor, 1997]

[36] Le programme *ESyPred3D* est disponible sur le site web : http://www.fundp.ac.be/urbm/bioinfo/esypred/.

```
15LOX:   2 GVYRVCVSTGASIYAGSKNKVELWLVGQHGEVELGSCLRP-----TRNKEEE   48
5LOX :   1 PSYTVTVATGSQWFAGTDDYIYLSLVGSAGCSEKHLLDKPFYNDFERGAVDS   52

15LOX:  49 FKVNVSKYLGSLLFVRLRKKHFLKEDAWFCNWISVQALGAAEDKYWFPCYRW  100
5LOX :  53 YDVTVDEELGEIQLVRIEKRKYWLNDDWYLKYITLKTPH--GDYIEFPCYRW  102

15LOX: 101 VVGDGVQSLPVGTGCTTVGDPQGLFQKHREQELEERRKLYQWGSWKEGLILN  152
5LOX : 103 ITGDVEVVLRDGRAKLARDDQIHILKQHRRKELETRQKQYRWMEWNPGFPLS  154

15LOX: 153 VAGSKLTDLPVDERFLEDKKIDFEASLAWGLAELALKNSLNIL-APWKTLDD  203
5LOX : 155 IDAKCHKDLPRDIQFDSEKGVDFVLNYSKAMENLFINRFMHMFQSSWNDFAD  206

15LOX: 204 FNRIFWCGRSKLARRVRDSWQEDSLFGYQFLNGANPMLLRRSVQLPARLVFP  205
5LOX : 207 FEKIFVKISNTISERVMNHWQEDLMFGYQFLNGCNPVLIRRCTELPEKLPVT  258

15LOX: 256 PGMEEL----QAQLEKELKAGTLFEADFALLDNIKANVILY-CQQYLAAPLV  302
5LOX : 259 TEMVECSLERQLSLEQEVQQGNIFIVDFELLDGIDANKTDPCTLQFLAAPIC  310

15LOX: 303 MLKLQPDGKLMPMVIQLHLPKIGSSPPPLFLPTDPPMVWLLAKCWVRSSDFQ  354
5LOX : 311 LLYKNLANKIVPIAIQLN--QIPGDENPIFLPSDAKYDWLLAKIWVRSSDFH  360

                 *    *
15LOX: 355 VHELNSHLLRGHLMAEVFTVATMRCLPSIHPVFKLIVPHLRYTLEINVRARN  406
5LOX : 361 VHQTITHLLRTHLVSEVFGIAMYRQLPAVHPIFKLLVAHVRFTIAINTKARE  412

15LOX: 407 GLVSDFGIFDQIMSTGGGGHVQLLQQAGAFLTYRSFCPPDDLADRGL---LG  455
5LOX : 413 QLICECGLFDKANATGGGGHVQMVQRAMKDLTYASLCFPEAIKARGMESKED  464

15LOX: 456 VESSFYAQDALRLWEIISRYVQGIMGLYYKTDEAVRDDLELQSWCREITEIG  507
5LOX : 465 IPYYFYRDDGLLVWEAIRTFTAEVVDIYYEGDQVVEEDPELQDFVNDVYVYG  516

                                          *    *
15LOX: 508 LQGAQKQGFPTSLQSVAQACHFVTMCIFTCTGQHSSIHLGQLDWFTWVPNAP  559
5LOX : 517 MRGRKSSGFPKSVKSREQLSEYLTVVIFTASAQHAAVNFGQYDWCSWIPNAP  568

15LOX: 560 CTMRLPPPTTK-DATLETVMATLPNLKQSSLQMSIVWQLGRDQPIMVPLGQH  610
5LOX : 569 PTMRAPPPTAKGVVTIEQIVDTLPDRGRSCWHLGAVWALSQFQENELFLGMY  620

                                                        *
15LOX: 611 QEEYFSGPEPRAVLEKFREELAIMDKEIEVRNEKLDIPYEYLRPSIVENSVAI 663
5LOX : 621 PEEHFIEKPVKEAMARFRKNLEAIVSVIAERNKKKQLPYYYLSPDRIPNSVAI 673
```

Figure 6. 13 Alignement des séquences en acides aminés de la 5-LOX humaine et la 15-LOX de lapin. Les parties de la séquence de la 15-LOX correspondant à des « cassures » dans la structure cristallographique (résidus manquants) sont représentées en orange. Les résidus hautement conservés parmi toutes les LOXs sont colorés en vert, les résidus coordonnant l'atome de fer non hémique sont marqués d'une astérisque (*) et les résidus impliqués dans la spécificité d'oxygénation de l'AA sont colorés en gris.

Le modèle 3D de la 5-LOX humaine fourni automatiquement par *EsyPred3D* est présenté à la **Figure 6. 14**. Bien que l'on retrouve les deux unités de reploiement caractéristiques des LOXs, à savoir le petit domaine N-terminal formé de feuillets β et le domaine catalytique C-terminal constitué principalement d'hélices, ce modèle présente un

problème important : la partie correspondant à une « cassure » dans la structure de la 15-LOX (résidus 177-188), qui doit normalement être une hélice, n'en est pas une. *MODELLER* n'a pu correctement modéliser cette hélice.

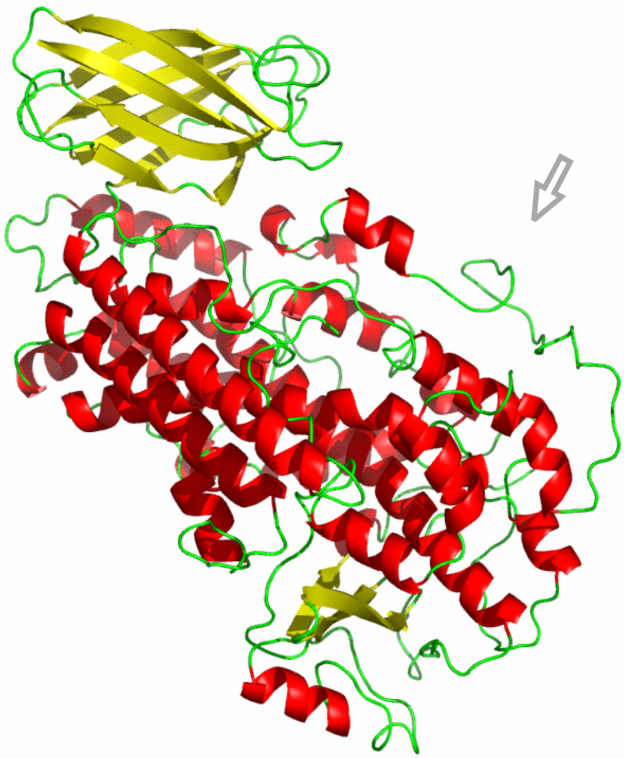


Figure 6. 14 Modèle 3D de la 5-LOX humaine obtenu à l'aide d'*ESyPred3D*. Les hélices sont représentées en rouge et les feuillets β en jaune.

Il nous est donc apparu intéressant de **construire « manuellement »** un autre modèle de la 5-LOX humaine à l'aide du module *HOMOLOGY*, sur base de l'alignement consensus fourni par *ESyPred3D*. En effet, il a été montré que la modélisation « manuelle » de structures par homologie fournit généralement de meilleurs résultats que les procédures automatisées. [Leach, 1996]

L'alignement consensus des séquences de la 5-LOX humaine et de la 15-LOX de lapin a donc été importé dans le module *HOMOLOGY* du logiciel *INSIGHTII*. Cette démarche nous permet de contrôler chacune des étapes de l'élaboration du modèle.

2.4. Construction du modèle par HOMOLOGY [Biosym/MSI, 1993]

Généralement, trois étapes se succèdent dans la construction proprement dite d'un modèle par homologie. D'abord, **le squelette peptidique** des régions structurellement conservées (SCR) est généré sur base de celui du *template*. Ensuite, les régions structurellement variables (SVR), généralement des **boucles**, sont insérées entre les domaines conservés. Enfin, la dernière étape consiste en l'**affinement du modèle** obtenu.

2.4.1. Construction des régions structurellement conservées

La modélisation par homologie repose sur le fait qu'il existe des régions, dans des protéines apparentées, pratiquement identiques au niveau de leur structure. Ces zones tendent à se trouver au cœur de la protéine où des différences dans la topologie de la chaîne peptidique auraient d'importants effets sur sa conformation globale. Elles correspondent généralement aux éléments de structure secondaire (hélices-α et feuillets-β).

Nous avons donc, à partir de l'alignement consensus, transposé les coordonnées des éléments de structure secondaire de la 15-LOX de lapin à la 5-LOX humaine (**Figure 6. 15**).

Lorsque les acides aminés sont identiques dans les deux séquences alignées, toutes les coordonnées de ces résidus sont transférées (à la fois celles du squelette et celles de la chaîne latérale). Par contre, lorsqu'ils diffèrent, seules les coordonnées du squelette sont transférées dans un premier temps. Ensuite, les angles dièdres communs aux deux résidus sont également alignés, de telle sorte que la conformation de la chaîne latérale de référence soit préservée le mieux possible. Enfin, dans le cas où la structure « non squelettique » du résidu à modéliser est plus longue que celle du résidu *template*, elle se voit attribuer une conformation étendue peu réaliste, qu'il conviendra donc d'optimaliser dans une étape ultérieure (cfr **point 2.4.3**).

2.4.2. Construction des régions structurellement variables

Alors que la construction du cœur de la protéine est relativement aisée, la détermination de la conformation des régions structurellement variables (SVR) est plus difficile. Les SVR correspondent généralement aux chaînes polypeptidiques (boucles) qui relient les éléments de structure secondaire entre eux. Elles se situent le plus souvent à la

surface de la protéine et peuvent présenter d'importantes différences dans leur séquence et dans leur longueur. Elles peuvent parfois être directement reprises du *template* mais ne peuvent être considérées comme conservées car elles ne sont pas communes à toutes les protéines apparentées.

Dans un premier temps, nous avons donc recherché, parmi les SVR et sur base d'une matrice de substitution (cfr Annexes), les substitutions dans la séquence de la 5-LOX qui préservent les propriétés physico-chimiques des résidus correspondants chez la 15-LOX (substitutions conservatrices). Pour ces parties, les coordonnées ont été transférées de la 15-LOX vers la 5-LOX, de la même façon que pour la construction des régions structurellement conservées (**Figure 6. 15**).

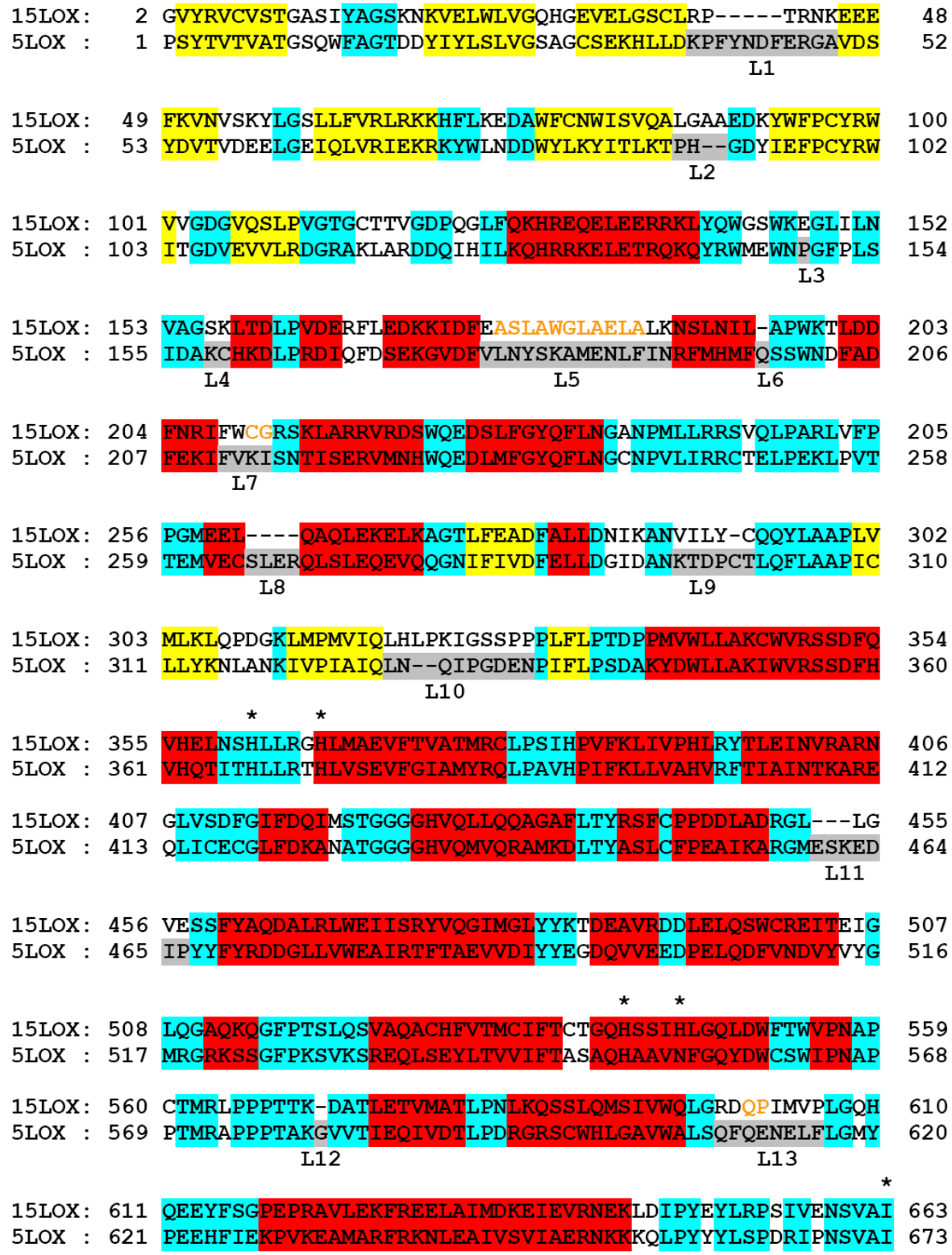


Figure 6. 15 Alignement des séquences de la 15-LOX de lapin et de la 5-LOX humaine.

Les éléments de structure secondaire sont représentés : les hélices α en rouge et les feuillets β en jaune. Dans les régions structuralement variables de la 5-LOX, les régions présentant des substitutions conservatrices sont représentées en bleu ; les boucles pour lesquelles le *template* retrouvé dans la PDB est la 15-LOX de lapin sont en noir tandis que les boucles dont le *template* retrouvé dans la PDB est une protéine différente de la 15-LOX sont colorées en gris et numérotées **LX**. Les résidus coordonnant l'atome de fer non hémique sont marqués d'une astérisque (*).

Pour attribuer des coordonnées appropriées aux SVR restantes, nous avons recherché dans la banque PDB des segments peptidiques présentant, d'une part, la même longueur que la boucle et, d'autre part, un même squelette peptidique pour les résidus entourant la boucle et appartenant aux SCR (option *Search Loops).*

Cette méthode fait appel à une matrice de distances qui caractérise la position relative des carbones α des résidus localisés aux extrémités à relier. L'écart moyen (RMSD) entre le modèle et la protéine issue de la PDB, dans les régions bordant la boucle, permet de classer les dix meilleures solutions. Le choix le plus approprié consiste en la boucle présentant le RMSD le plus faible et s'éloignant du corps de la protéine.

Pour la **majorité des boucles de la 5-LOX humaine**, la première solution proposée provient de la structure cristallographique de la 15-LOX de lapin, notre protéine de référence. Le RMSD de ces solutions n'excède pas 0,1 Å.

Toutefois, pour les parties du *template* correspondant à une cassure (résidus 177-188 ; 210-211 ; 601-602) et les régions, dans l'alignement des séquences, présentant des *gaps*, d'autres protéines ont été proposées pour modéliser ces boucles. Notre choix s'est porté sur celles présentant une valeur de RMSD la plus faible possible et dont le squelette peptidique s'éloigne du corps du modèle (**Tableau 6. 2**). Notons que pour la boucle « L13 », aucun *template* approprié n'a été obtenu dans la banque PDB. Nous avons donc construit *de novo* cette partie. A nouveau, nous avons choisi, parmi les différentes conformations générées pour la boucle, celle présentant une valeur de RMSD la plus faible possible et s'éloignant du corps de la protéine.

Tableau 6. 2 Protéines, autres que la 15-LOX, choisies pour modéliser certaines boucles et valeur du RMSD associé.

Boucle	Code PDB de la protéine choisie comme référence pour cette boucle	RMSD (Å)
L1	1bgx	1,57
L2	1bmi	0,78
L3	1diq	0,41
L4	2bpg	1,87
L5	1gei	0,21
L6	1i6h	1,10
L7	1ihy	1,36
L8	1aa0	0,95
L9	1b51	1,08
L10	1dd1	1,18
L11	1heu	1,58
L12	1bvz	1,25
L13	Construction *de novo*	0,50

Au terme de cette étape, la plupart des coordonnées du modèle de la 5-LOX ont été définies. Cependant, certaines régions n'ayant pas été déterminées et les conformations initialement assignées n'étant pas optimales, il est nécessaire d'affiner la structure générée.

2.4.3. Affinement du modèle

Jusqu'à présent, les coordonnées ont été assignées aux régions structurellement conservées et aux boucles. Contrairement au résidu C-terminal qui appartient à une SCR, aucune coordonnée n'a encore été attribuée à l'extrémité N-terminale. Elles ont donc été ajoutées au modèle (option *End-Repair*).

Par ailleurs, il est nécessaire d'explorer les différentes conformations possibles de la chaîne latérale des acides aminés qui diffèrent par rapport au *template*. En effet, lorsque les coordonnées de résidus du modèle sont issues d'une protéine de référence avec des acides aminés de nature différente, leur chaîne latérale peut ne pas se placer correctement dans leur nouvel environnement moléculaire. Elle peut par exemple être plus longue que celle du *template* ou encore se brancher différemment. De plus, lorsque la boucle est générée *de novo*, une conformation étendue, tout à fait irréaliste, est attribuée aux chaînes latérales. Cette structure étirée ne se rencontre jamais dans les protéines naturelles. Il est donc nécessaire d'effectuer une **recherche conformationnelle visant à optimaliser la structure « non squelettique » des résidus du modèle**.

Des études statistiques sur les structures des protéines ont montré que les chaînes latérales des acides aminés adoptent un nombre limité de conformations énergétiquement favorables, déterminées par leur environnement local et appelées **rotamères**.

Le module *HOMOLOGY* dispose d'une librairie de rotamères intégrée. Celle-ci est explorée en vue de sélectionner les conformations qui réduisent les conflits stériques au sein de la protéine. Le meilleur rotamère est d'abord sélectionné pour le premier résidu, puis, pour le second et ainsi de suite. Un cycle est défini par un passage complet à travers la liste. La recherche est terminée lorsque l'énergie ne change plus de manière significative d'un cycle à l'autre.

Afin de respecter l'homogénéité du modèle, nous avons soumis l'ensemble de la protéine à la recherche des meilleurs rotamères (option *Auto-Rotamer*). Un exemple des modifications structurales introduites au niveau de la conformation des chaînes latérales est représenté à la **Figure 6. 16**. Si certains résidus semblent relativement peu affectés par la recherche d'un nouveau rotamère, énergétiquement plus favorable, d'autres, probablement impliqués dans quelque conflit stérique, y sont par contre, plus sensibles. Leur chaîne

latérale adopte alors une conformation différente de celle initialement générée, en harmonie avec son environnement moléculaire immédiat.

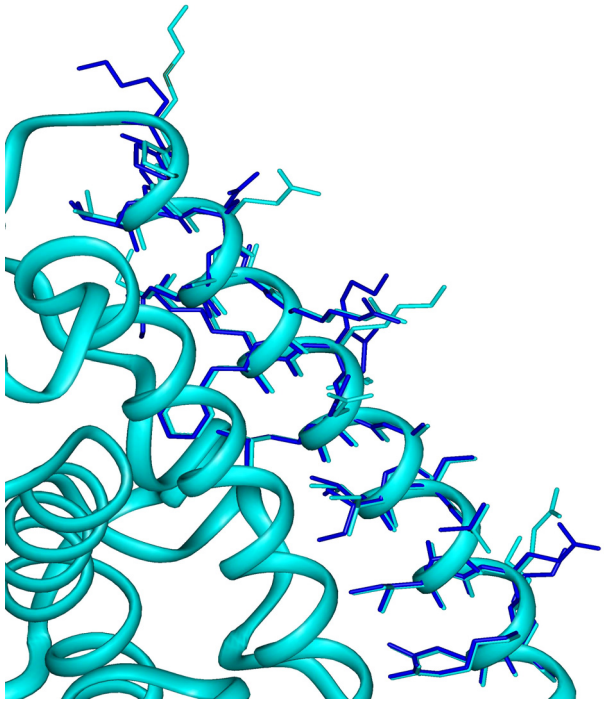


Figure 6. 16 Illustration du déplacement des chaînes latérales **avant** (en bleu foncé) et **après** (en bleu clair) sélection des rotamères les plus favorables.

D'autre part, les nombreux segments peptidiques utilisés pour construire le modèle de la 5-LOX proviennent de différentes sources protéiques. Il se peut dès lors que ces motifs ne s'associent pas correctement (longueur de liaison incorrecte ou lien peptidique pas en conformation *trans*). Nous avons donc **optimisé la géométrie des points d'assemblage** (option *Splice-Repair*) par mécanique moléculaire. La plupart des atomes de la protéine sont maintenus fixes durant la simulation, à l'exception des atomes entourant les points de jonction qui peuvent optimiser leurs coordonnées tridimensionnelles.

Enfin, afin de libérer le modèle des derniers contacts stériques défavorables et de relaxer l'ensemble de la structure, le modèle a été soumis à une **minimisation d'énergie** à l'aide du module *Discover3* et du champ de forces *CVFF*, adapté aux protéines.

Tous les atomes ont été autorisés à modifier leurs coordonnées tridimensionnelles, à l'exception de ceux qui coordonnent l'atome de fer. En effet, afin de préserver la disposition du site de coordination du fer (hétéroatome qui n'est pas modélisé dans notre structure), nous avons fixé la position des résidus His367, His372, His550, Asn554 et Ile673 durant la minimisation.

Le modèle final de la 5-LOX humaine est présenté à la **Figure 6. 17**. On peut distinguer les deux domaines caractéristiques du reploiement général des LOXs, à savoir le petit domaine N-terminal, constitué de feuillets β, et le large domaine C-terminal, formé principalement d'hélices. A la différence du modèle obtenu automatiquement avec *EsyPred3D* (**Figure 6. 14**), le modèle construit manuellement prédit correctement les éléments de structure secondaire correspondant aux « cassures » dans la structure de la 15-LOX de lapin.

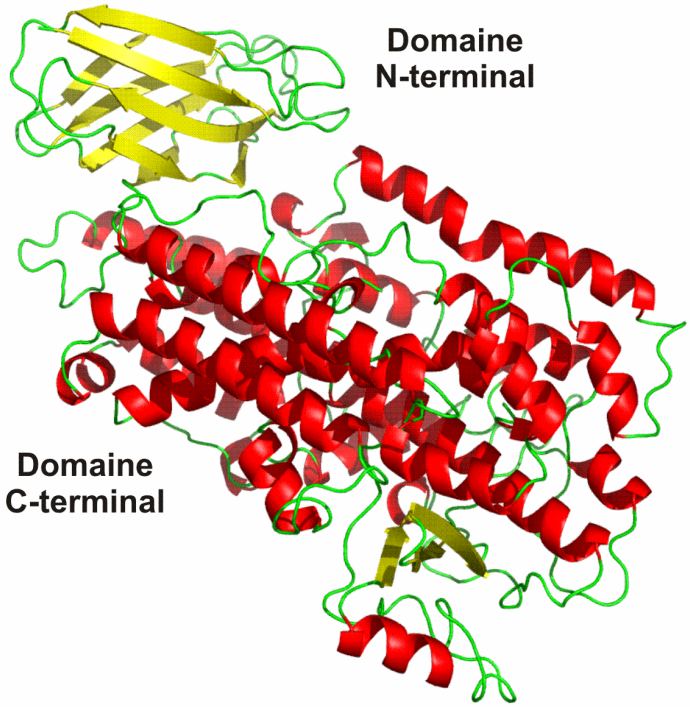


Figure 6. 17 Modèle 3D de la 5-LOX humaine obtenu à l'aide d'*HOMOLOGY*, sur base de l'alignement consensus. Les hélices α sont représentées en rouge et les feuillets β en jaune.

Nous disposons maintenant d'un modèle 3D de la protéine. Il faut toutefois garder à l'esprit que ce qui a été généré est une **représentation de la protéine**. Seule la détermination expérimentale de la structure pourra valider notre modèle. Néanmoins, il est possible d'apprécier sa « vraisemblance » en le comparant à une série de critères établis à partir de structures cristallographiques.

2.5. Evaluation du modèle

Le programme *PROCHECK* [Laskowski, 1993] permet d'évaluer la qualité d'une structure par comparaison avec des structures obtenues expérimentalement. Il met également en évidence les régions du modèle nécessitant de plus amples investigations.

Les différents critères vérifiés par *PROCHECK* sont, entre autres, les longueurs et angles des liaisons peptidiques, la planarité des cycles aromatiques (résidus Phe, Tyr, Trp et His) et des chaînes latérales présentant une conjugaison (résidus Arg, Gln, Glu, Asn et Asp).

Chacune de ces données est comparée à une valeur moyenne correspondante, dérivée de structures cristallographiques de haute résolution.

Pour notre modèle de la 5-LOX humaine, nous obtenons les résultats suivants :

- 93.7 % des longueurs des liaisons peptidiques tombent dans l'intervalle de confiance tandis que 6.3 % présentent une valeur supérieure à la moyenne de 0.05 Å.
- 89.6 % des angles de liaisons peptidiques tombent dans l'intervalle de confiance tandis que 10.4 % présentent une valeur d'angle supérieure à la moyenne de 10°.
- 86.6 % des groupes plans tombent dans l'intervalle de confiance tandis que 13.4 % présentent une déviation par rapport au plan moyen.

Enfin, *PROCHECK* fournit également la carte de « Ramachandran » associée au modèle. Elle permet d'évaluer la validité de la structure modélisée en calculant les valeurs des angles ϕ (phi) et ψ (psi), caractéristiques de la chaîne principale (**Figure 6. 18**).

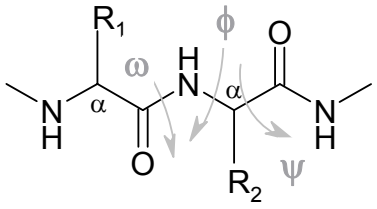


Figure 6. 18 Angles ω (Cα-C-N-Cα), ϕ (C-N-Cα-C) et ψ (N-Cα-C-N), caractérisant la conformation du squelette peptidique

Tous les angles ϕ et ψ entre acides aminés ne sont pas permis, pour de simples considérations géométriques. Des modèles atomiques, prenant en compte les distances inter-atomes connues et les rayons de van der Waals[37], permettent d'observer que certains angles sont beaucoup plus probables que d'autres selon la nature des acides aminés. Certaines conformations sont donc plus stables que d'autres. Le diagramme de « Ramachandran » précise les couples de valeurs des angles ϕ et ψ entre atomes, mesurés pour des protéines de structure connue. Plusieurs zones sont ainsi définies et colorées différemment en fonction de la fréquence d'observation du couplage (ϕ,ψ). La surface de

[37] Le rayon de van der Waals correspond au rayon atomique, impénétrable par d'autres atomes.

couleur blanche correspond à une fréquence très faible tandis que la surface la plus foncée correspond à la région présentant les combinaisons des angles les plus favorables.

Pour tester un modèle, les valeurs des angles ϕ et ψ calculées pour celui-ci sont reportées sur le diagramme. Le modèle est cohérent si la majorité des points représentant les coordonnées des angles sont compris dans les zones favorables (c'est-à-dire colorées).

La carte de « Ramachandran » obtenue pour notre modèle de la 5-LOX humaine est présentée à la **Figure 6. 19**. Les statistiques qui lui sont associées montrent que 82.3 % des résidus de la protéine modélisée se trouvent dans les régions les plus favorables et 17.0 % dans les régions favorables supplémentaires. Par contre, quatre acides aminés (soit 0.7 % des résidus de la protéine) se situent dans les régions « interdites ». Ces résidus, Asn335, Leu266, Glu267 et Ala157, appartiennent tous à des boucles, éloignées du site actif (**Figure 6. 20**). Cela confirme la difficulté de modéliser correctement ces parties variables de la structure d'une protéine.

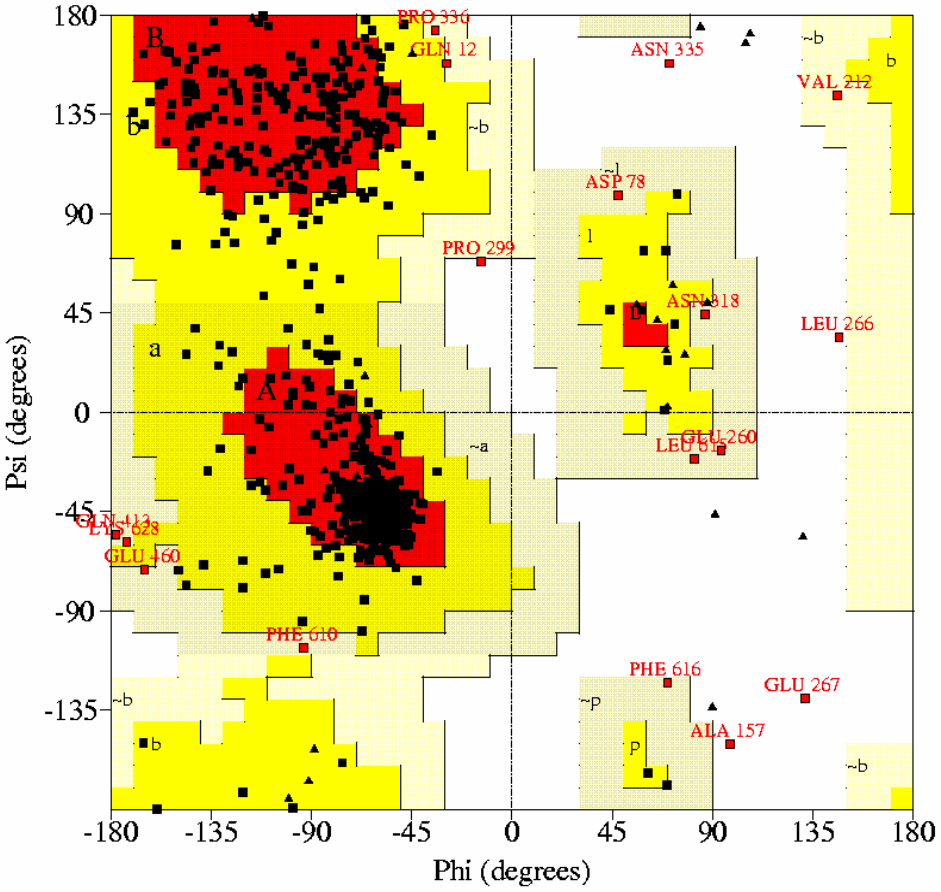


Figure 6. 19 Carte de « Ramachandran » obtenue pour le modèle de la 5-LOX humaine

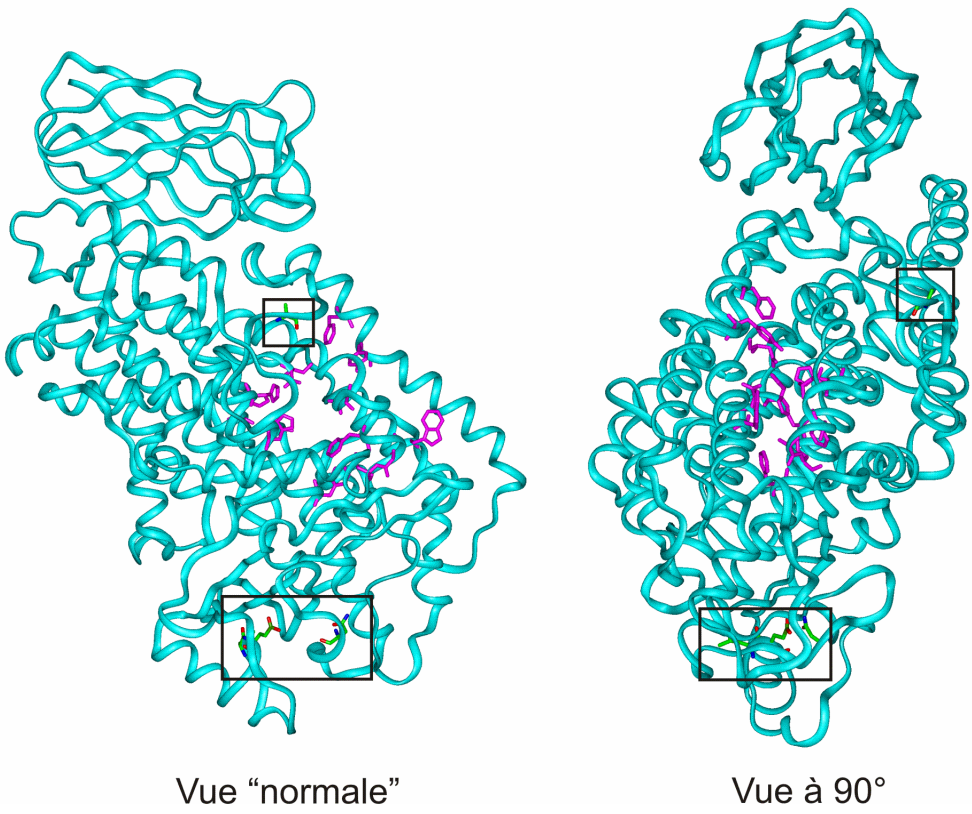


Figure 6. 20 Localisation des résidus situés dans les régions interdites de la carte de « Ramachandran » (en couleur par atomes). Les résidus constituant le site actif de l’enzyme sont représentés en magenta.

2.6. Conclusion

L'utilisation des données expérimentales concernant les LOXs, combinée aux outils de modélisation, nous a permis d'élaborer un modèle 3D de la 5-LOX humaine dont la qualité a été évaluée et qui concorde avec les données structurales disponibles sur les LOXs. Bien que quelque peu fastidieuse, la démarche de construction manuelle du modèle, étape par étape, que nous avons adoptée, nous a permis de représenter de façon cohérente la structure 3D de la 5-LOX.

Ce modèle de la 5-LOX humaine sera exploité pour étudier le mode d'interaction de ligands avec l’enzyme (*docking*) (cfr Chapitre 7).

3. Caractérisation du site actif de la 5-LOX modélisée

Sur base de la superposition de la 5-LOX humaine avec la 15-LOX de lapin, nous avons pu définir le site actif 5-LOX en considérant une sphère de 12.5 Å de rayon, centrée sur l’inhibiteur co-cristallisé avec la 15-LOX (RS75091). Afin de bien visualiser et de

comparer les deux sites actifs, nous avons représenté leur surface de Connolly respective (sonde de 1.4 Å), rendant compte de la surface accessible au solvant et donc, du site de liaison pour les ligands (**Figure 6. 21** et **Figure 6. 22**).

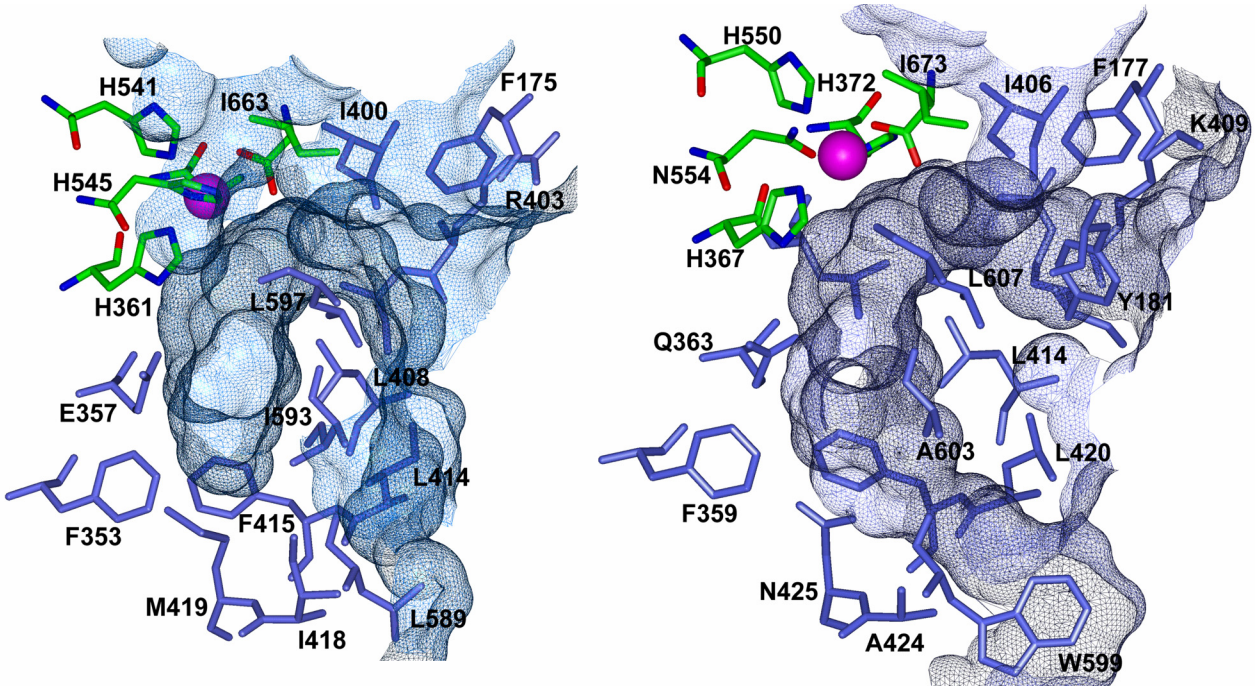


Figure 6. 21 Représentation des sites actifs de la 15-LOX de lapin (à gauche) et de la 5-LOX humaine (à droite). La surface de Connolly (représentée en pointillé) rend compte du site de liaison accessible. Les résidus coordonnant l'atome de fer non hémique (sphère colorée en magenta) sont représentés en couleur par atomes.

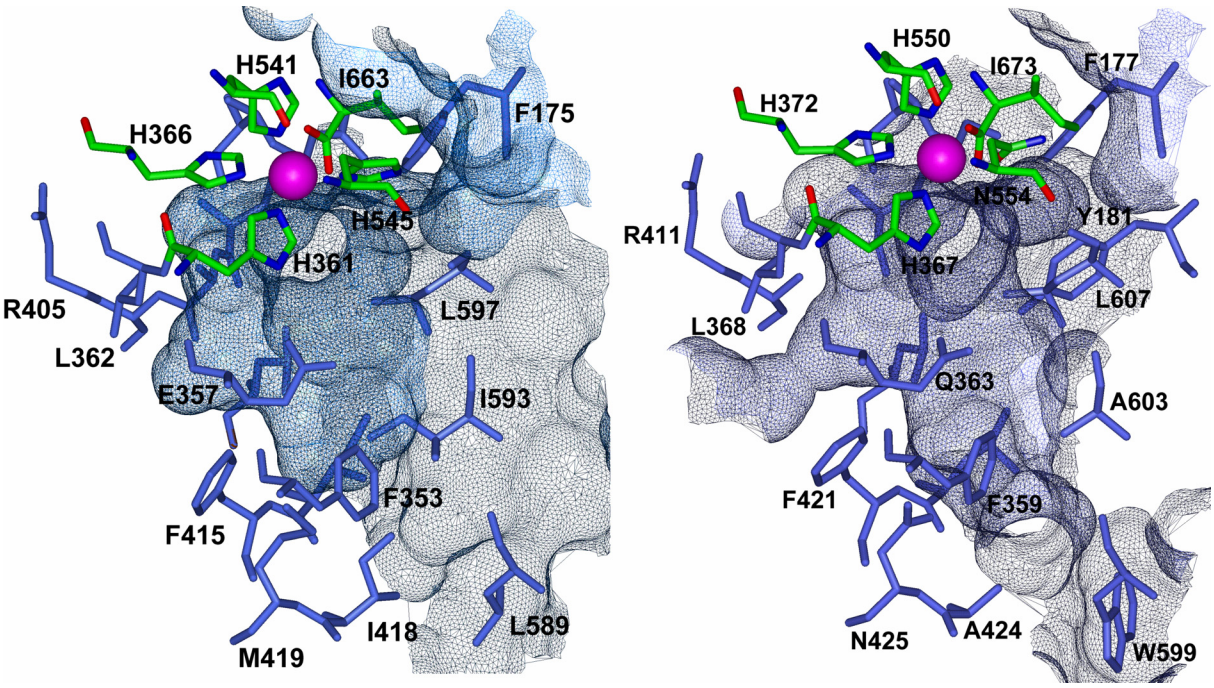


Figure 6. 22 Représentation des sites actifs de la 15-LOX de lapin (à gauche) et de la 5-LOX humaine (à droite). Vue à 90° permettant de visualiser la petite poche secondaire chez la 5-LOX délimitée par les résidus Phe421, Leu368 et Gln363.

Nous pouvons constater, en accord avec les données de mutagenèse publiées précédemment [Borngraber, 1999; Sloane, 1991], que le volume du site actif de la 5-LOX est supérieur à celui de la 15-LOX de lapin. En effet, les résidus à la base de la cavité (Asn425, Ala424, Ala603) sont moins volumineux que ceux correspondant chez la 15-LOX (Met419, Ile418, Ile593).

Le site de liaison 5-LOX a une **forme de botte**, coudée. Il s'étend de la Phe177 et la Tyr181 au sommet de la cavité, jusqu'au Trp599 et à la Leu420, au fond de la poche (**Figure 6. 21** et **Figure 6. 23**). Ces deux extrémités sont localisées à la surface de la protéine. Un résidu chargé positivement, la Lys409, se situe à l'entrée du site actif et interagirait favorablement par pont salin avec le groupement carboxylate, chargé négativement au pH physiologique, du substrat lipidique, l'AA. Le centre catalytique, formé par l'atome de fer non hémique coordonné par les résidus His367, His372, His550, Asn554 et le carboxylate C-terminal de l'Ile673, occupe la partie supérieure de la cavité.

Par ailleurs, une **petite cavité additionnelle** (**Figure 6. 22**) existe, vers l'arrière de la poche principale de liaison. Elle est principalement délimitée par les résidus Phe421, Gln363 et Leu368 et pourrait accueillir de petits groupements lipophiles.

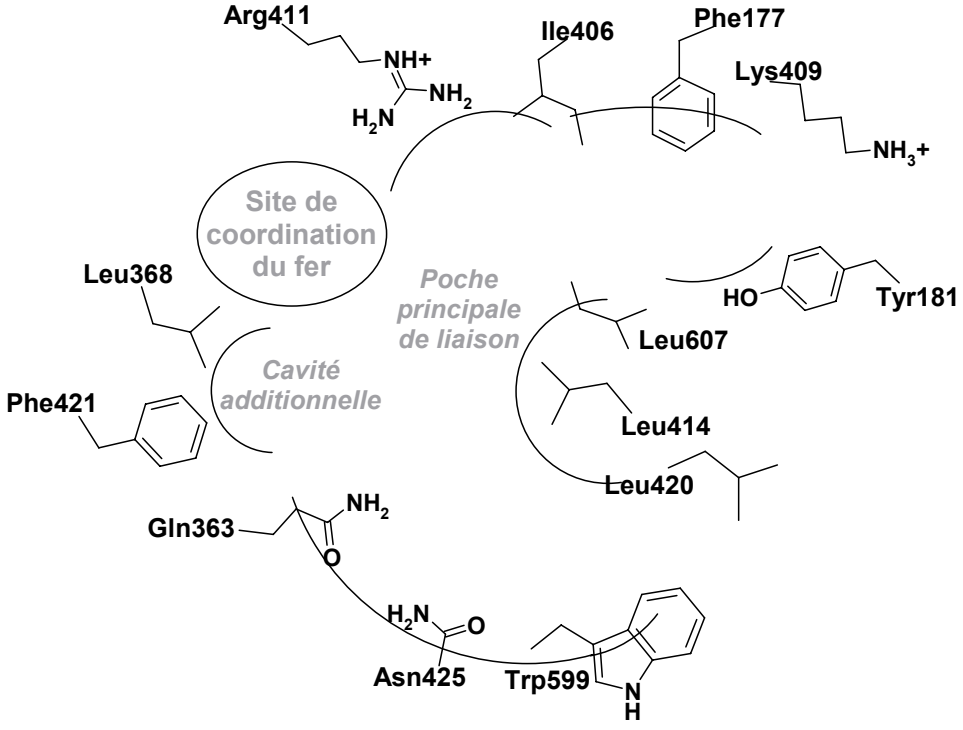


Figure 6. 23 Représentation schématique du site actif 5-LOX

La plupart des acides aminés bordant la **poche** sont **hydrophobes**. Toutefois, **plusieurs résidus polaires**, tels les Gln363, Asn425, Gln557, Ser608 et Arg411, sont

distribués tout au long de la cavité et pourraient interagir favorablement avec des ligands. Ces sites potentiels d'interaction ont d'ailleurs été mis en évidence à l'aide de différentes **sondes *GRID***. La **Figure 6. 24** illustre les zones polaires et hydrophobes mises en évidence grâce aux sondes H_2O et méthyle (C3), respectivement.

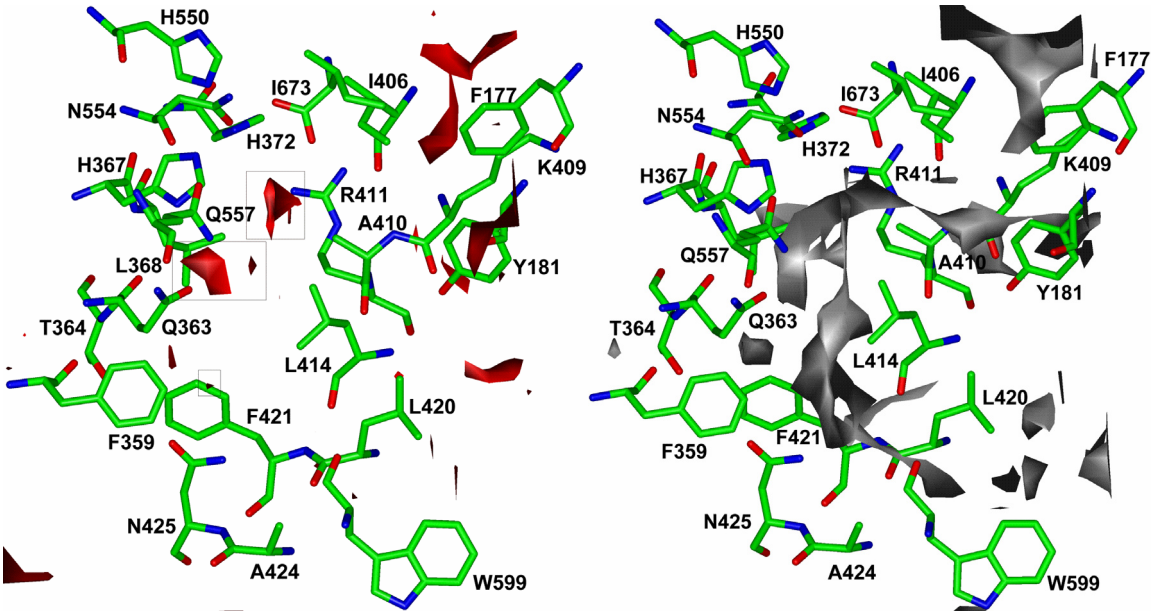


Figure 6. 24 Exploration du site actif 5-LOX à l'aide des sondes H_2O (gauche, isocontour à -7.5 kcal.mol^{-1}) et méthyle (droite, isocontour à -2.5 kcal.mol^{-1})

Nous pouvons constater que les zones polaires se trouvent à proximité de l'Asn425, des Gln363 et Gln557, ainsi qu'à proximité du centre de coordination de l'atome de fer non hémique. La zone hydrophobe s'étend de l'entrée du site actif, près des Phe177 et Tyr181, jusqu'au pied de la cavité, près du Trp599. Elle comprend également la petite cavité additionnelle, formée par les résidus Phe421 et Leu368.

D'autres sondes *GRID*, caractéristiques de fonctions portées par les inhibiteurs 5-LOX non redox ont été utilisées, lors de l'étude de leur mode d'interaction avec la 5-LOX, pour appuyer les résultas de *docking* obtenus.

4. Etude du mode d'interaction de l'acide arachidonique

Pour valider notre modèle de la 5-LOX humaine, nous avons étudié, à l'aide du programme de *docking* ***GOLD***,[38] le mode de liaison de l'acide arachidonique au sein du site actif et l'avons confronté aux modèles d'interaction proposés dans la littérature.

[38] Les paramètres de la simulation sont présentés en annexe.

Nous avons mis en évidence un mode de liaison principal pour le substrat. Il est présenté à la **Figure 6. 25**.

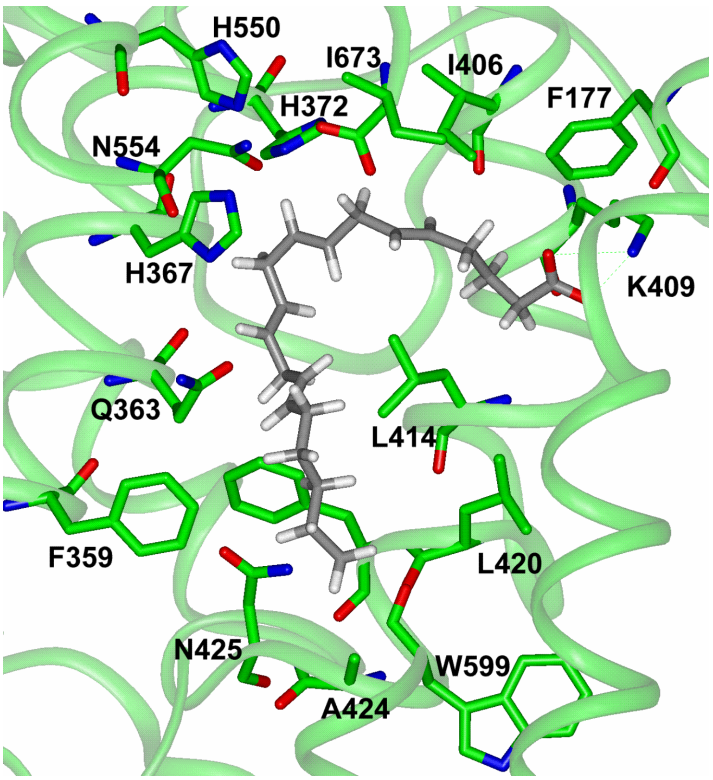


Figure 6. 25 Mode d'interaction proposé pour l'acide arachidonique au sein du site actif 5-LOX modélisé

Au sein du site actif 5-LOX, l'AA adopte une conformation courbée qui épouse la forme de la cavité. Son groupement carboxylate interagit par pont salin avec la Lys409 située, en surface, à l'entrée de la poche. Cette interaction forte « verrouille », en quelque sorte, l'orientation de l'acide gras dans le site actif et favorise un positionnement correct de l'atome C-7 vis-à-vis du centre catalytique.

Ce modèle d'interaction concorde avec le modèle proposé par Browner et Gillmor, [Browner, 1998; Gillmor, 1997] à savoir que la spécificité de position de la 5-LOX serait basée sur le volume de la cavité de liaison (cfr Chapitre 1, **point 3.1.3.3**).

Le site actif modélisé va maintenant pouvoir être utilisé pour étudier le mode d'interaction d'inhibiteurs 5-LOX non redox, qui se lient également à la cavité enzymatique.

CHAPITRE 7.

Etude du mode d'interaction des inhibiteurs 5-LOX non redox au sein de l'enzyme modélisée

Dans ce chapitre, nous présentons l'**étude de l'interaction** de différents ligands, représentatifs des cinq classes chimiques d'**inhibiteurs 5-LOX non redox**, au sein du site actif de l'enzyme humaine modélisée. Par ailleurs, nous avons également tenté de comprendre les données d'activité obtenues pour les **cinq composés *Maybridge*** sélectionnés à l'aide du modèle de pharmacophore.

1. Stratégie 152

2. Validation de la méthode de *docking* 152

3. *Docking* des inhibiteurs 5-LOX non redox au sein de l'enzyme humaine 154

   3.1. Familles des dérivés thiopyranindoles 154

   3.2. Famille des dérivés biaryles 157

   3.3. Famille des dérivés pyrazoles 160

   3.4. Famille des dérivés imidazoles 162

   3.5. Famille des dérivés dihydropyrrolizines 164

   3.6. Conclusion 165

4. Rationalisation du mode d'interaction des composés *Maybridge* sélectionnés au sein du site actif 5-LOX 167

   4.1. Etude du mode d'interaction du composé actif BTB02850 167

   4.2. Etude du mode d'interaction des composés inactifs SPB04623, SPB04695, SPB04944 et BTB02942 170

   4.3. Conclusion 172

1. Stratégie

Dans un premier temps, nous avons utilisé deux programmes de *docking* automatisé, *GOLD* et *Autodock*, pour explorer les modes de liaison possibles des inhibiteurs.[39] Nous avons accordé une probabilité plus importante aux solutions communes aux deux algorithmes. Par ailleurs, nous n'avons retenu que les hypothèses d'interaction concordant avec les RSA disponibles dans la littérature et validées par l'analyse du site actif à l'aide des sondes *GRID*.

Dans un second temps, pour prendre en compte la flexibilité des résidus du site actif (le *docking* s'effectuant dans un récepteur rigide), nous avons optimisé les complexes par mécanique moléculaire à l'aide du programme *Discover3*. Le champ de forces *CVFF* a été utilisé, de même qu'une constante diélectrique dépendante de la distance (ε=1**r*). Le processus de minimisation comporte deux étapes: l'utilisation de l'algorithme *Steepest Descent*, jusqu'à une convergence de 10.0 kcal.mol^{-1}.Å^{-1}, suivie de l'algorithme *Conjugate Gradient* pour atteindre une convergence de 0.01 kcal.mol^{-1}.Å^{-1}. D'abord, le ligand et les chaînes latérales du site actif sont relaxés (tous les autres atomes de la protéine sont maintenus fixes). Par après, les coordonnées des carbones α des résidus du site de liaison sont également minimisées. Une contrainte est appliquée sur ces atomes pour les empêcher de trop s'écarter de leur position originale. Cette contrainte présente une forme quadratique avec une constante de force de 20 kcal.Å^{-2} et est progressivement diminuée (d'un facteur 0.5 puis 0.25).

Les différents complexes enzyme-ligand, présentés dans la suite de ce travail, correspondent aux hypothèses de *docking* après minimisation par *Discover3*.

2. Validation de la méthode de *docking*

Avant d'étudier le mode d'interaction des inhibiteurs non redox au sein de la 5-LOX, nous avons voulu valider les programmes de *docking* utilisés. Il ne nous était pas possible de le faire directement sur notre propre cible puisque aucune structure cristallographique n'existe à ce jour. Par contre, nous avons évalué la méthode sur des protéines apparentées: nous avons simulé l'interaction enzyme-ligand d'inhibiteurs dont la structure co-cristallisée avec des LOXs est disponible dans la banque PDB, et ce, dans le but de vérifier si les deux programmes, *GOLD* et *Autodock*, permettent de retrouver le positionnement correct du ligand au sein de l'enzyme, tel qu'il est observé dans la structure cristallographique.

[39] Les paramètres des simulations de *docking* sont présentés en annexe.

Deux inhibiteurs structuralement différents et cristallisés au sein d'isoformes différentes ont été étudiés : le RS75091 en complexe avec la 15-LOX de lapin (code PDB LOX1) et le 4-nitrocathécol cocristallisé avec la LOX-3 de soja (code PDB 1NO3).

Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 7. 1**. Nous pouvons constater que de manière générale, *GOLD* et *Autodock* fournissent des hypothèses de *docking* qui correspondent aux résultats cristallographiques.

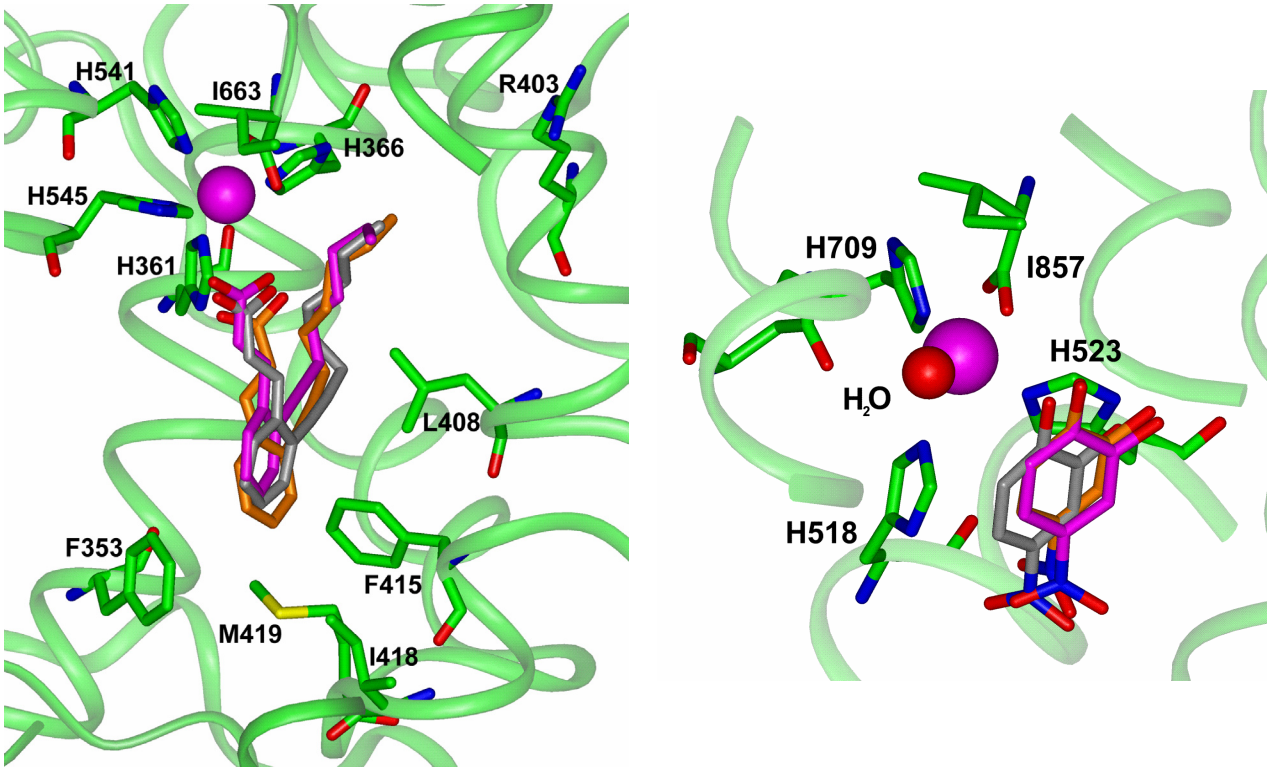


Figure 7. 1 Comparaison des complexes obtenus par *docking* (*GOLD* en magenta et *Autodock* en orange) avec le complexe co-cristallisé du RS75091 (en gris) et la 15-LOX de lapin (à gauche) et le complexe co-cristallisé du 4-nitrocatéchol (en gris) et la LOX-3 de soja (à droite).

Ces deux programmes de *docking* reproduisent assez fidèlement le mode de liaison des inhibiteurs observés expérimentalement par DRX. Ils pourront donc être utilisés dans la suite de ce travail pour étudier le mode d'interaction des inhibiteurs 5-LOX non redox au sein de l'enzyme.

3. *Docking* d'inhibiteurs 5-LOX non redox au sein de l'enzyme humaine

L'interaction d'inhibiteurs 5-LOX non redox représentatifs de chacune des cinq familles chimiques, à savoir les composés **1**, **6**, **11**, **13** et **15**, a été étudiée par *docking* au sein du site de liaison modélisé. La structure des composés étudiés est rappelée dans le **volet C** à la fin du manuscrit.

3.1. Famille des dérivés thiopyranindoles

Les dérivés thiopyranindoles sont les inhibiteurs 5-LOX non redox les mieux décrits dans la littérature. De nombreuses pharmacomodulations ont été investiguées autour de ce noyau, permettant la présentation de RSA assez complètes (cfr Chapitre 2, **point 2.1**).

L'étude de l'interaction du composé **1** au sein du site actif 5-LOX a permis la mise en évidence d'un seul mode de liaison (**Figure 7. 2**), rendant bien compte des RSA de cette famille. Les principales interactions réalisées avec les résidus de la cavité sont reprises dans le **Tableau 7. 1**, de même que les caractéristiques géométriques des ponts H et interactions CH…π sont présentées dans le **Tableau 7. 2**.

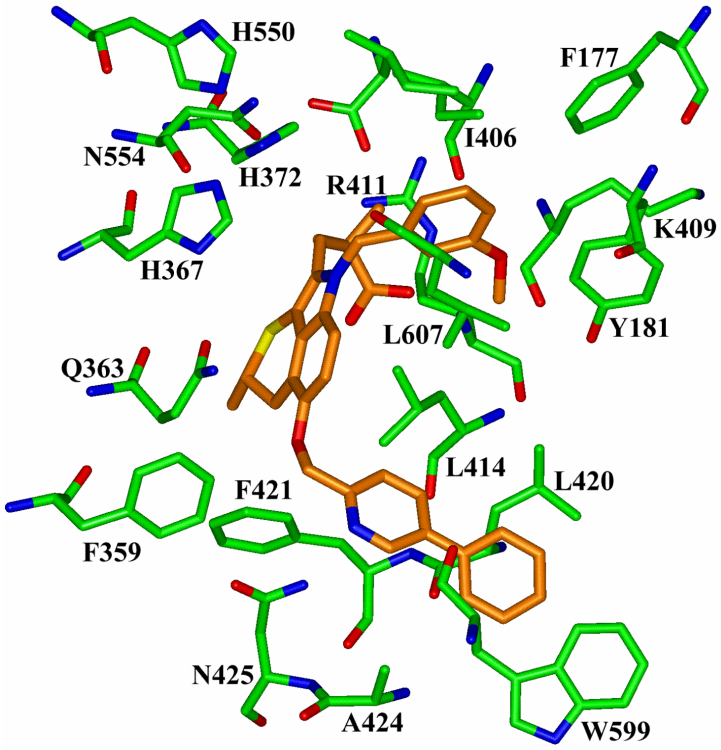


Figure 7. 2 Mode d'interaction du composé **1** au sein de la 5-LOX

L'inhibiteur adopte une conformation étendue au sein du site actif et en épouse parfaitement la forme. Le groupe indole se trouve au centre de la cavité, à proximité de la Leu414 avec laquelle il forme un contact CH…π (**Tableau 7. 1** et **Tableau 7. 2**).

Le groupement 3-méthoxyphényle remplit l'entrée du site actif et est stabilisé par des interactions principalement de type van der Waals, impliquant notamment les résidus Leu607 et Ile406 (interactions CH…π). Cette poche peut accueillir des groupements plus volumineux, tels qu'un 3-phénylpropyle ou un 5-phénylpyridin-2-yle, qui pourront être stabilisés en interagissant avec les résidus aromatiques Phe177 et Tyr181. Ce type de substitution conduit à des composés plus affins. Par contre, le remplacement du 3-méthoxyphényle par un simple méthyle entraîne une perte d'activité.

Le cycle thiopyrane, substitué par un méthyle en position équatoriale (stéréochimie *S*), s'insère dans la petite cavité hydrophobe formée par les Phe421, Gln363 et Leu368. Le méthyle en position axiale est défavorable pour l'activité inhibitrice. En effet, il entraîne une déstabilisation du complexe suite à un conflit stérique avec la chaîne principale de la Gln363.

Le groupement phényl-pyridine remplit le fond de la poche. L'azote de la pyridine forme un pont hydrogène faible avec l'Asn425 tandis que le cycle phényle réalise une interaction de type π…π décalée avec le Trp599 (distance entre les centroïdes = 5.07 Å). Les isomères de position (phényle en position ortho ou para), qui correspondent à des composés moins actifs, présenteraient une gène stérique importante avec les résidus Leu420 et Trp599, déstabilisant les complexes enzyme-inhibiteur.

Tableau 7. 1 Principales interactions par résidu pour le composé **1** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	E Coulomb (kcal.mol^{-1})	E van der Waals (kcal.mol^{-1})	E totale (kcal.mol^{-1})
Gln363	0.53	-3.29	-2.76
His367	-0.20	-2.99	-3.20
Leu414	-2.11	-4.87	-6.98
Leu420	-0.20	-2.87	-3.07
Phe421	-0.13	-3.75	-3.88
Asn425	-0.32	-1.02	-1.34
Trp599	-0.03	-4.03	-4.06
Leu607	-0.70	-3.74	-4.44

Tableau 7. 2 Caractéristiques géométriques des interactions CH…π et pont H réalisées par le composé **1** au sein du site actif 5-LOX

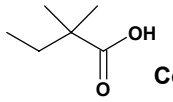
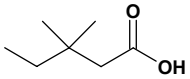
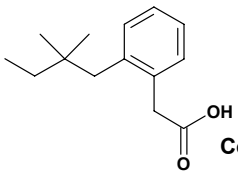
Résidu	Interaction	Caractéristiques géométriques*		
		Hx…Ca (Å)	θ (°)	ω (°)
Leu414	**CH…π**	2.99	46.1	85.2
Ile406		2.84	4.8	111.8
Leu607		2.78	23.6	-73.8
Leu420		2.72	15.0	108.5
Phe421		3.04	18.4	95.2
	Pont H faible	**d (Å)**	**D (Å)**	**θ (°)**
Asn425		2.40	3.23	137.8

* La définition des paramètres géométriques est présentée dans le **volet E**.

Enfin, la chaîne acide, portée par l'indole, pointe vers l'arrière du site actif, en direction de l'Arg411. L'interaction observée entre ces deux groupements, principalement de nature électrostatique, est faible (**Tableau 7. 3**).

Pour vérifier les tendances observées dans les RSA, à savoir qu'une chaîne latérale (portant la fonction acide) plus longue est favorable à l'activité inhibitrice, nous avons étudié le *docking* de deux composés analogues et minimisé les complexes obtenus. Tous deux adoptent un mode de liaison semblable à celui mis en évidence pour le composé **1**. Nous pouvons remarquer que l'allongement de la chaîne permet de diminuer la distance séparant les deux partenaires en interaction (fonction acide…Arg411) et ainsi, de renforcer le pont salin (**Tableau 7. 3**). Cette observation concorde avec les résultats relevés expérimentalement.

Tableau 7. 3 Caractéristiques géométriques et énergétiques de l'interaction entre l'Arg411 au sein du site actif 5-LOX et différents types de chaîne acide portée par le noyau indole

Chaîne acide en interaction avec l'Arg411	Distance O…N (Å)*	E Coulomb (kcal.mol^{-1})	E van der Waals (kcal.mol^{-1})	E totale (kcal.mol^{-1})
 Composé 1	8.70	-1.2	-0.2	-1.3
	6.15	-3.6	-0.2	-3.8
 Composé 2	2.61	-17.2	0.3	-16.9

* Distance entre les atomes en interaction les plus proches

3.2. Famille des dérivés biaryles

L'étude de l'interaction du composé **6** a permis de mettre en évidence un mode de liaison préférentiel (**Figure 7. 3**), en accord avec les tendances observées dans les RSA. Les principales interactions par résidu réalisées par l'inhibiteur au sein du site actif sont reprises dans le **Tableau 7. 4**. Le **Tableau 7. 5** présente les caractéristiques géométriques de certaines interactions, observées au sein du complexe.

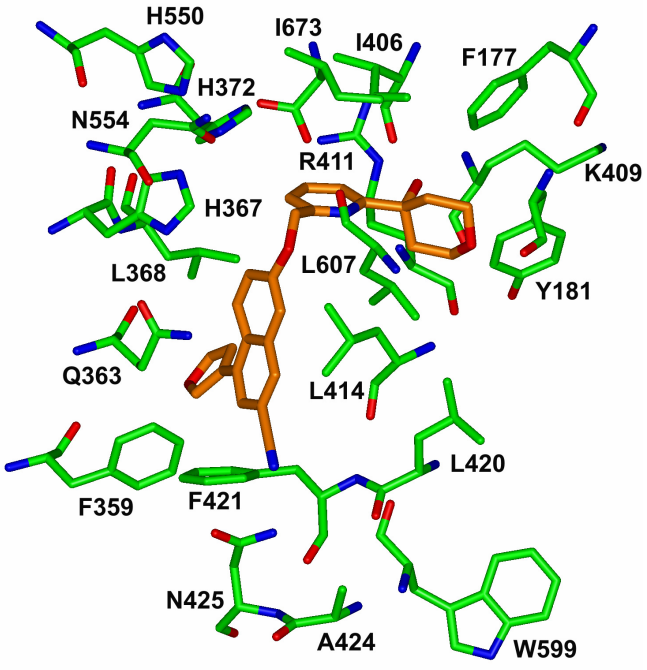


Figure 7. 3 Mode d'interaction du composé **6** au sein du site actif 5-LOX

L'inhibiteur adopte une conformation coudée au sein de la cavité. Le cycle naphtalène occupe une position centrale et interagit fortement par contacts XH…π (X = C ou N), d'un côté, avec la Leu414 et de l'autre, avec la Gln363. Ce type d'interaction, NH…π, a déjà été observé dans 117 complexes cristallographiques de la PDB (données extraites grâce à Isostar, **Figure 7. 4**).

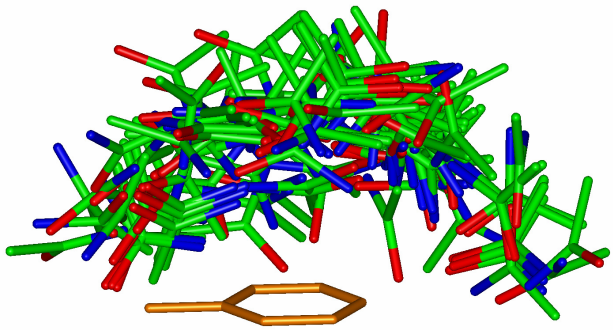


Figure 7. 4 Représentation de la distribution des groupes amide ($CONH_2$) autour d'un noyau phényle (données issues d'Isostar)

La fonction nitrile pointe vers le fond de la poche et réalise un pont H (à la limite entre faible et fort) avec l'Asn425. Le groupement furane, lui, remplit la petite cavité additionnelle et forme un contact CH…π avec la Phe421. La pyridine occupe la région lipophile à proximité du site de liaison de l'atome de fer non hémique. Un pont H faible, de type CH…O, est formé entre le carboxylate de l'Ile673 terminale et le groupement oxyméthylène de l'inhibiteur. La pyridine, elle, interagit favorablement avec la Leu607 (pont CH…N) et l'Ile406 (interaction CH…π). Enfin, le cycle tétrahydropyrane forme un pont H fort avec la Tyr181, à l'entrée du site actif.

Tableau 7. 4 Principales interactions par résidus réalisées par le composé **6** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	E Coulomb (kcal.mol^{-1})	E van der Waals (kcal.mol^{-1})	E totale (kcal.mol^{-1})
Tyr181	-2.82	-0.95	-3.77
Gln363	-0.11	-3.84	-3.95
Ile406	0.017	-2.25	-2.24
Leu414	0.053	-4.22	-4.17
Phe421	0.063	-2.51	-2.45
Asn425	-0.61	-0.45	-1.06
Leu607	-0.32	-3.40	-3.72
Ile673	-2.18	-0.33	-2.51

Tableau 7. 5 Caractéristiques géométriques des interactions CH…π et ponts H réalisées par le composé **6** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	Interaction	Caractéristiques géométriques*		
		Hx…Ca (Å)	θ (°)	ω (°)
Gln363	**NH…π**	2.92	32.8	-72.1
Leu414	**CH…π**	2.82	35.6	-69.5
		2.83	25.9	-81.3
Ile406		2.68	14.1	-112.2
Phe421		2.73	51.6	-100.1
		d (Å)	**D (Å)**	**θ (°)**
Tyr181	**Pont H fort**	1.74	2.65	156.01
Asn425	**Pont H (entre faible et fort)**	2.21	3.19	158.86
Leu607	**Pont H faible (CH…N)**	2.75	3.73	147.9
Ile673	**Pont H faible (CH…O)**	2.54	2.86	95.5

* La définition des paramètres géométriques est présentée dans le **volet E**.

3.3. Famille des dérivés pyrazoles

L'analyse du complexe formé entre le composé **15** et le site actif 5-LOX permet de mettre en évidence des points d'interaction principaux (**Tableau 7. 6** et **Tableau 7. 7**), semblables à ceux observés pour le composé **6**. En effet, l'inhibiteur occupe le site actif d'une manière similaire (**Figure 7. 5**). Il épouse la forme légèrement courbée du site actif. Le cycle tétrahydropyrane est positionné à l'entrée de la cavité, tout comme pour le composé **6**, tandis que le groupement sulfone se loge dans le fond de la poche, à proximité de l'Asn425.

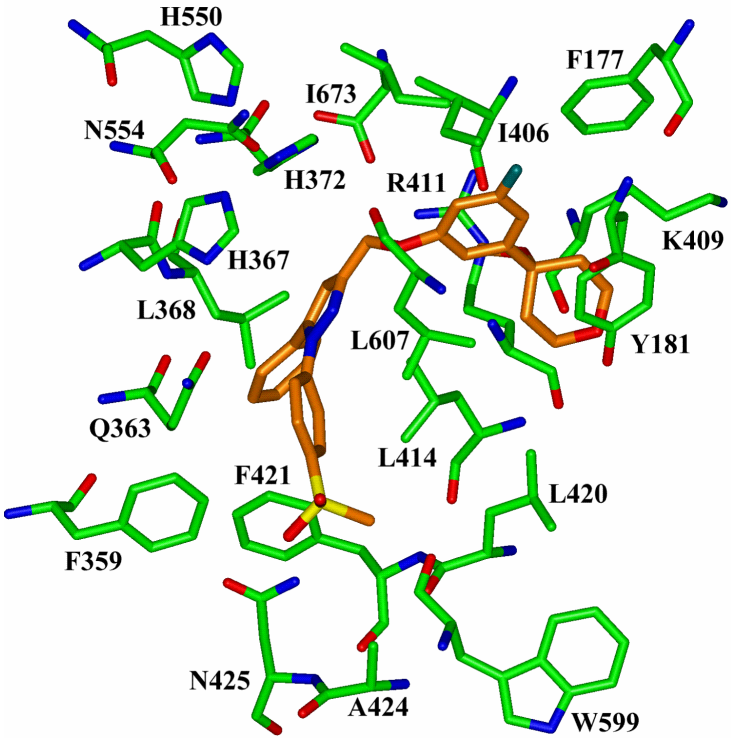


Figure 7. 5 Mode d'interaction du composé **15** au sein du site actif 5-LOX

Le phényle non substitué interagit favorablement avec les résidus hydrophobes délimitant la petite cavité secondaire, et notamment avec la Gln363 par pont CH…O et avec la Phe421. Des contacts CH…π sont également observés entre la Leu414 et les noyaux pyrazole et phénylsulfone de l'inhibiteur. Le cycle fluorophényle est entouré par les résidus Ile406 et Leu607 avec lesquels il forme des interactions CH…π. Par ailleurs, deux ponts H stabilisent l'inhibiteur au sein de la cavité ; le premier, un pont H de nature forte, implique le tétrahydropyrane et la Tyr181 tandis que le second, plus faible, est réalisé par la sulfone et l'Asn425. Ces observations corroborent les résultats expérimentaux, établissant les rôles,

principal et plutôt secondaire, joués par les fonctions tétrahydropyrane et sulfone, respectivement.

Tableau 7. 6 Principales interactions par résidus réalisées par le composé **15** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	E Coulomb (kcal.mol^{-1})	E van der Waals (kcal.mol^{-1})	E totale (kcal.mol^{-1})
Tyr181	-3.56	-3.55	-7.11
Gln363	0.35	-3.13	-2.78
Ile406	-0.27	-1.92	-2.19
Leu414	0.29	-3.98	-3.69
Phe421	0.11	-3.27	-3.16
Asn425	-1.22	-0.12	-1.34
Leu607	-0.51	-3.04	-3.55
Ile673	-2.84	0.19	-2.65

Tableau 7. 7 Caractéristiques géométriques des interactions CH…π et ponts H réalisées par le composé **15** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	Interaction	Caractéristiques géométriques*		
		Hx…Ca (Á)	**θ (°)**	**ω (°)**
Leu414	**CH…π**	2.94	45.3	-96.5
		2.76	30.0	132.3
Ile406		3.26	41.0	-68.3
Leu607		2.79	20.9	-123.5
		d (Á)	**D (Å)**	**θ (°)**
Tyr181	**Pont H fort**	1.65	2.62	170.7
Asn425	**Pont H fort**	1.81	2.81	160.9
Gln363	**Pont H faible (CH…O)**	2.53	3.56	160.8
Ile673	**Pont H faible (CH…O)**	2.31	2.71	102.2

* La définition des paramètres géométriques est présentée dans le **volet E**.

3.4. Famille des dérivés imidazoles

Les dérivés imidazoles (**11** et **12**) présentent un squelette imidazolylphényle avec, attaché en para, le fragment tétrahydropyrane, caractéristique du ZD2138, que l'on retrouve également dans les inhibiteurs de type biaryle et pyrazole.

Peu de données de RSA sont disponibles pour cette série. Cependant, le mode de liaison que nous avons identifié pour le composé **11** (**Figure 7. 6**) est en accord avec le mode d'interaction que nous avons mis en évidence pour les autres inhibiteurs. En effet, des interactions clés similaires stabilisent l'inhibiteur au sein de la cavité (**Tableau 7. 8** et **Tableau 7. 9**).

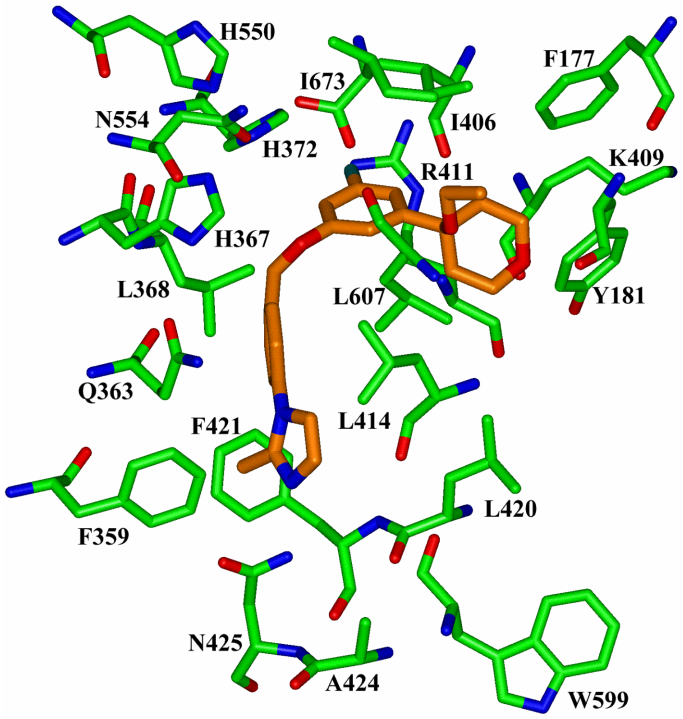


Figure 7. 6 Mode d'interaction du composé **11** au sein du site 5-LOX

Deux ponts H forts sont réalisés entre l'oxygène du tétrahydropyrane et la Tyr181, et, l'azote imidazolique et l'Asn425, respectivement. Le méthyle porté par le noyau imidazole n'occupe pas vraiment la petite cavité secondaire. Toutefois, il interagit favorablement avec la Phe421 par contact CH…π. Les résidus Leu414 et Leu607 forment des interactions CH…π avec le cycle phényle tandis que le fluorophényle interagit favorablement avec le groupement carboxylate de l'Ile673. Une interaction semblable, entre un carboxylate et un groupement phényle, est observée dans 119 structures de complexes de la PDB (**Figure 7. 7**).

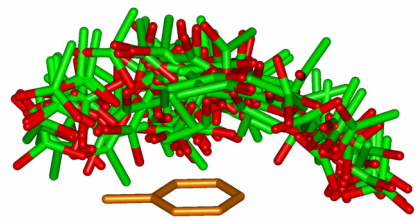


Figure 7. 7 Représentation de la distribution de groupements carboxylates (COO^-) autour d'un phényle (Isostar)

Tableau 7. 8 Principales interactions par résidus réalisées par le composé **11** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	E Coulomb ($kcal.mol^{-1}$)	E van der Waals ($kcal.mol^{-1}$)	E totale ($kcal.mol^{-1}$)
Tyr181	-2.59	-1.99	-4.58
Gln363	-0.25	-3.15	-3.40
Ile406	-0.25	-2.19	-2.44
Leu414	0.10	-2.48	-2.38
Phe421	0.01	-2.57	-2.56
Asn425	-0.92	-0.34	-1.26
Leu607	-0.06	-3.82	-3.88
Ile673	0.15	-2.35	-2.20

Tableau 7. 9 Caractéristiques géométriques des interactions CH…π et ponts H réalisées par le composé **11** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	Interaction	Caractéristiques géométriques		
		Hx…Ca (Å)	**θ (°)**	**ω (°)**
Leu414	**CH…π**	2.81	50.8	94.0
Ile406		2.61	17.6	-125.3
Phe421		3.05	43.0	-79.7
Leu607		2.78	21.9	94.8
		d (Å)	**D (Å)**	**θ (°)**
Tyr181	**Pont H fort**	1.76	2.71	166.8
Asn425	**Pont H fort**	2.19	3.20	167.7

3.5. Famille des dérivés dihydropyrrolizines

Le licofélone (composé **13**) est plus petit que les autres inhibiteurs étudiés et peu de RSA sont disponibles dans la littérature, qui pourraient nous aider dans l'identification de points d'ancrage importants. Il n'a donc pas été évident de sélectionner un seul mode de liaison pour ce composé au sein du site actif 5-LOX.

Bien qu'il ait été suggéré que le licofélone « mime » la conformation de l'AA lorsqu'il est lié à l'enzyme, c'est-à-dire une conformation de fer à cheval (conformation *horseshoe*) [Laufer, 2001], il est trop rigide pour occuper le site actif comme l'AA le fait.

Dans le mode d'interaction que nous avons mis en évidence (**Figure 7. 8**), l'inhibiteur occupe principalement la partie inférieure du site actif. L'extrémité carboxylate pointe en direction de l'Arg411, à l'arrière du site actif (distance O…N = 8.3 Å), et interagit faiblement avec celle-ci. Le groupement chlorophényle est stabilisé au sein de la petite cavité secondaire lipophile, en interagissant avec les résidus Gln363, Leu368 et Phe421 (interaction π…π décalée avec une distance entre les centroïdes des deux cycles de 4.20 Å). Le phényle non substitué, quant à lui, interagit par contact CH…π avec la Leu414. Aucun pont H n'est observé au sein du complexe (**Tableau 7. 10** et **Tableau 7. 11**).

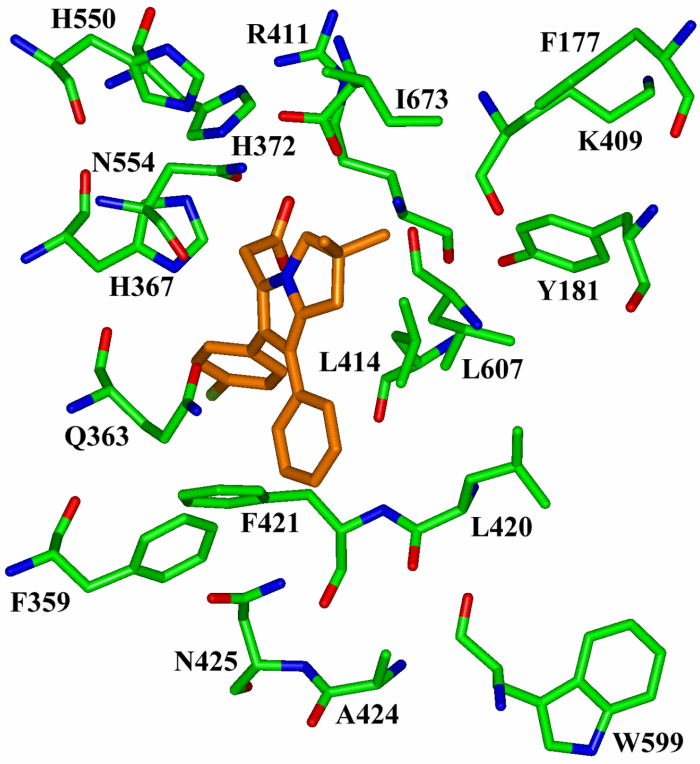


Figure 7. 8 Mode d'interaction du licofélone (composé **13**) au sein du site actif 5-LOX

Tableau 7. 10 Principales interactions par résidus réalisées par le composé **13** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	E Coulomb (kcal.mol^{-1})	E van der Waals (kcal.mol^{-1})	E totale (kcal.mol^{-1})
Gln363	0.49	-4.74	-4.25
Leu368	-2.29	-0.67	-2.96
Arg411	-1.80	-0.11	-1.91
Leu414	-1.07	-4.15	-5.22
Phe421	0.15	-4.31	-4.17

Tableau 7. 11 Caractéristiques géométriques des interactions CH…π réalisées par le composé **13** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	Interaction	Caractéristiques géométriques*		
		Hx…Ca (Å)	**θ (°)**	**ω (°)**
Gln363	**CH…π**	2.79	22.7	-103.3
Leu368		2.75	35.4	-117.2
Leu414		2.90	16.7	103.2

* La définition des paramètres géométriques est présentée dans le **volet E**.

3.6. Conclusion

De manière générale, tous les inhibiteurs étudiés adoptent, au sein du site actif 5-LOX, une **conformation coudée** épousant la forme de la cavité. Les inhibiteurs, qui sont principalement hydrophobes, interagissent favorablement avec la **cavité lipophile**. Cependant, une analyse plus précise des complexes a permis de mettre en évidence des **interactions spécifiques** importantes. Certaines, communes à tous les inhibiteurs, semblent être essentielles pour l'activité inhibitrice.

D'abord, tous les inhibiteurs présentent une interaction de type **CH…π** avec la **Leu414**, occupant une position centrale au sein du site actif. La petite cavité secondaire, limitée entre autres par les résidus Leu368, Gln363 et Phe421, est généralement occupée par un groupe aromatique, qui interagit très favorablement avec la **Phe421** (généralement par contact CH…π ou interaction π…π décalée). Les résidus **Ile406** et **Leu607** stabilisent

également un cycle aromatique (la nature des interactions mises en jeu peut varier d'un inhibiteur à l'autre). Par ailleurs, un **pont H**, de force variable, impliquant l'**Asn425**, est observé dans tous les complexes, hormis celui formé par le licofélone.[40]

Deux points d'ancrage supplémentaires, différents selon le type de familles, sont également observés. D'une part, pour les composés qui comportent un fragment tétrahydropyrane, un **pont H fort** est formé avec la **Tyr181**, à l'entrée du site actif. D'autre part, pour les composés qui présentent une fonction acide, un **pont salin** est réalisé avec l'**Arg411**, à l'arrière de la cavité.

Ces observations nous permettent de proposer un premier modèle d'interaction au sein du site actif (**Figure 7. 9**).

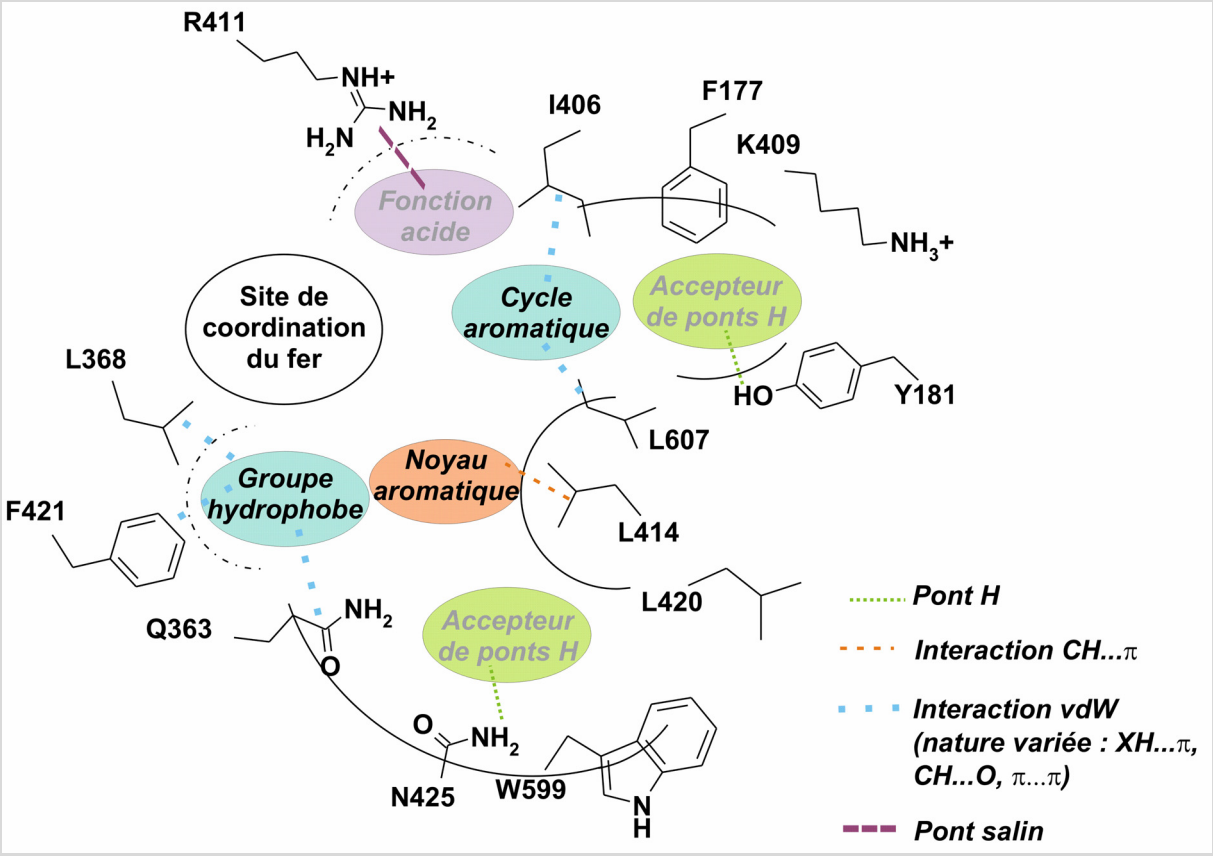


Figure 7. 9 Premier modèle d'interaction proposé pour des inhibiteurs 5-LOX de type non redox au sein du site actif de l'enzyme (les groupements communs à tous les inhibiteurs sont représentés en noir tandis que les fonctions supplémentaires, suivant le type de familles, sont représentées en gris)

Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence des points d'ancrages importants au sein de la cavité enzymatique. Nous allons tenter de le compléter en

[40] Le licofélone, plus petit que les autres inhibiteurs, ne partage que deux des points d'ancrage mis en évidence pour les autres composés, à savoir l'interaction CH…π avec la Leu414 et l'occupation favorable de la petite cavité secondaire, constituée entre autres de la Phe421.

analysant le mode d'interaction des composés *Maybridge* (actif et inactifs), qui présentent des structures chimiques tout à fait différentes de celles des inhibiteurs de référence.

4. Rationalisation du mode d'interaction des composés *Maybridge* sélectionnés au sein du site actif 5-LOX

Dans le but de comprendre et d'expliquer les données d'activité obtenues avec les composés *Maybridge*, à savoir que seul le **BTB02850** inhibe efficacement la 5-LOX, nous avons étudié le mode d'interaction de ces molécules au sein de l'enzyme. Une stratégie identique à celle adoptée pour l'analyse du mode de liaison des inhibiteurs 5-LOX non redox de la littérature a été mise en œuvre (cfr Chapitre 7, **point 1**). La structure des cinq composés étudiés est rappelée dans le **volet D** à la fin du manuscrit.

*4.1. Etude du mode d'interaction du composé actif **BTB02850***

L'étude de l'interaction du **BTB02850** au sein de la 5-LOX nous a permis de mettre en évidence un mode de liaison préférentiel. Il est présenté à la **Figure 7. 10**.

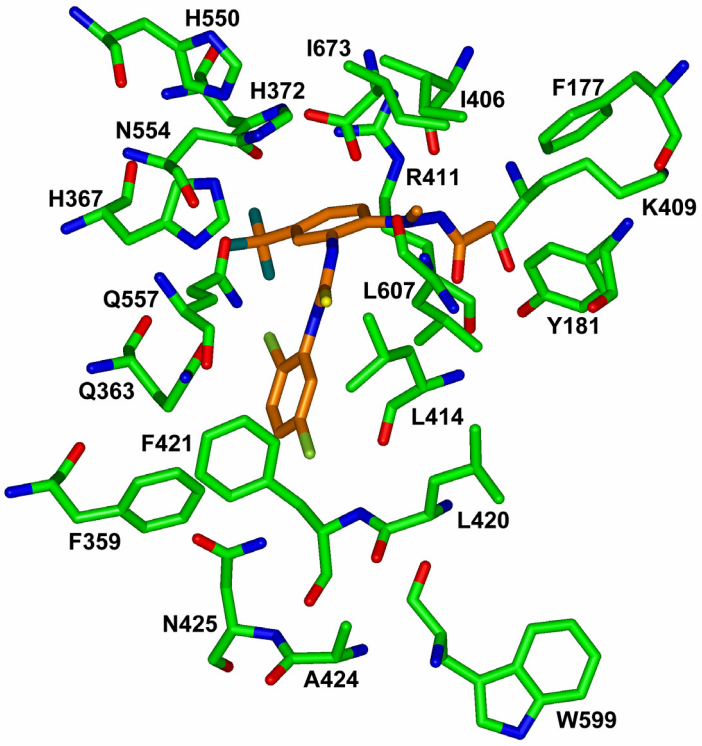


Figure 7. 10 Mode d'interaction proposé pour le **BTB02850** au sein de la 5-LOX

L'inhibiteur adopte, au sein de la cavité, une conformation coudée. Dans cette conformation, la fonction thiourée est plane. La recherche dans la banque CSD de molécules présentant ce fragment a permis d'appuyer ce résultat de *docking*. En effet, comme observé dans le complexe obtenu, la thiourée (sur un total de 256 observations) est toujours plane. La **Figure 7. 11** présente la répartition de l'angle de torsion T_1 en fonction de T_2. Les hydrogènes portés par les deux atomes d'azote se trouvent d'un même côté (T_1 et T_2, tous deux, de (±) 180° ou 0°) ou non (T_1 et T_2 de 0 et (±) 180°, ou, de (±) 180 et 0°, respectivement).

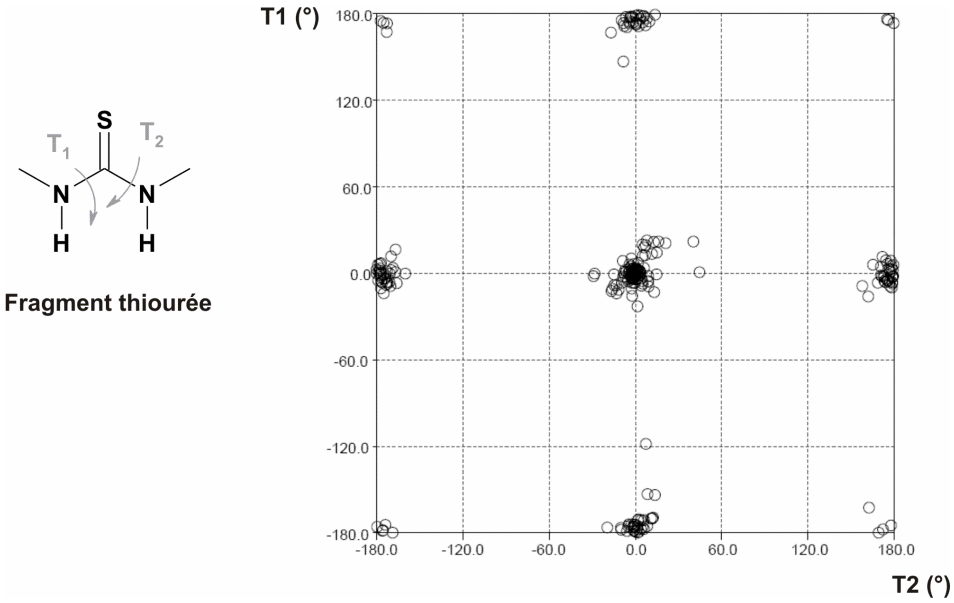


Figure 7. 11 Structure du fragment thiourée et distribution de l'angle de torsion T_1 en fonction de T_2

L'analyse des interactions que le **BTB02850** réalise avec les résidus de la poche enzymatique (**Tableau 7. 12** et **Tableau 7. 13**) permet de mettre en évidence des points d'ancrage importants. Notamment, le groupement carbonyle terminal réalise un pont H fort avec la Tyr181, à l'entrée du site actif. Le groupement dichlorophényle interagit favorablement avec la Leu414 (par interaction CH…π) et avec la Gln363. La petite cavité secondaire reste inoccupée mais le cycle dichlorophényle forme un contact CH…π avec la Phe421. Le groupement thiourée est impliqué dans deux ponts H faibles, avec la Gln557 et la chaîne latérale de la Leu607. Enfin, le groupement trifluorophényle est stabilisé par des interactions de type van der Waals avec les résidus Leu607 et Ile406 et une interaction de type π…π décalée avec l'His372 (distance entre les centroïdes de 4.34 Å).

Tableau 7. 12 Principales interactions par résidus réalisées par le **BTB02850** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	E Coulomb (kcal.mol^{-1})	E van der Waals (kcal.mol^{-1})	E totale (kcal.mol^{-1})
Tyr181	-3.79	-0.83	-4.62
Gln363	0.35	-3.06	-2.71
Ile406	-0.04	-2.15	-2.19
Leu414	-0.10	-2.91	-3.02
Phe421	-0.14	-1.44	-1.58
Gln557	-0.44	-0.90	-1.34
Leu607	-0.84	-2.59	-3.43
His372	-0.32	-2.59	-2.91

Tableau 7. 13 Caractéristiques géométriques des interactions CH…π et ponts H réalisées par le **BTB02850** au sein du site actif 5-LOX

Résidu	Interaction	Caractéristiques géométriques*		
		Hx…Ca (Á)	**θ (°)**	**ω (°)**
Leu414	**CH…π**	2.66	24.6	-103.7
Phe421		2.90	21.7	112.0
		d (Á)	**D (Å)**	**θ (°)**
Tyr181	**Pont H fort**	1.62	2.59	169.0
Gln557	**Pont H faible (NH…S)**	2.54	3.08	112.7
Leu607	**Pont H faible (CH…S)**	2.59	3.16	111.2

* La définition des paramètres géométriques est présentée dans le **volet E**.

*4.2. Etude du mode d'interaction des composés inactifs **SPB04623**, **SPB04695**, **SPB04944** et **BTB02942***

Les modes d'interaction mis en évidence pour les quatre composés inactifs sont présentés aux **Figure 7. 12** et **Figure 7. 13**.

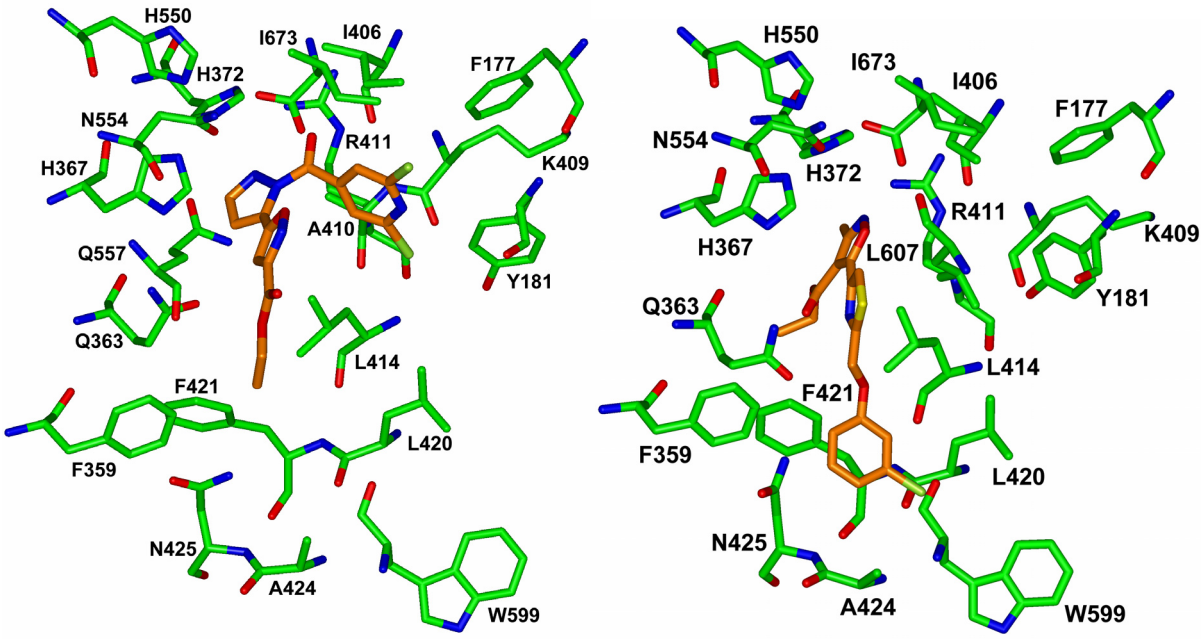


Figure 7. 12 Mode d'interaction proposé pour les composés **SPB04623** (gauche) et **SPB04695** (droite) au sein de la 5-LOX

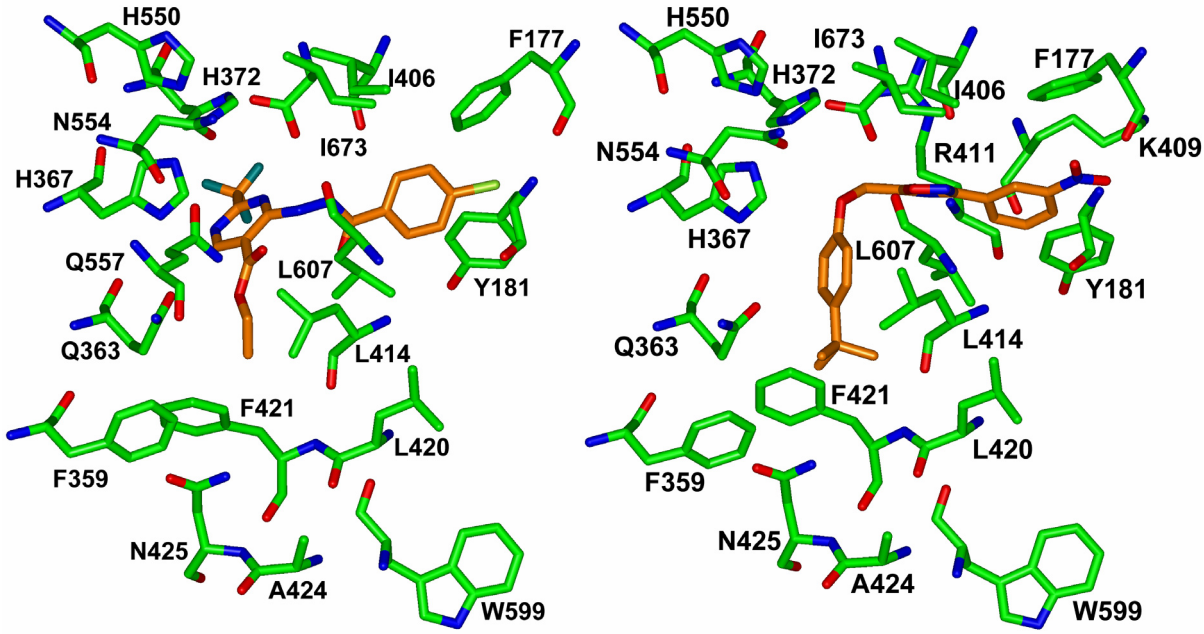


Figure 7. 13 Mode d'interaction proposé pour les composés **SPB04944** (gauche) et **BTB02942** (droite) au sein de la 5-LOX

La géométrie des conformations adoptées, au sein de la protéine, par les fragments particuliers 5-(pyrazol-5-yl)isoxazole (composé **SPB04623**), 5-(1,3-thiazol-4-yl)isoxazole (composé **SPB04695**) et acétohydrazide (composé **SPB04944**) a été comparée à celle observée dans des structures de molécules analogues répertoriées dans la banque CSD. On constate une bonne correspondance.

Bien que ces composés adoptent des conformations stables au sein de la cavité enzymatique, une analyse des interactions qu'ils réalisent avec les résidus de la poche (**Tableau 7. 14**) nous montrent que, contrairement, aux inhibiteurs 5-LOX de la littérature étudiés précédemment ou au composé **BTB02850**, ils n'interagissent pas aussi favorablement avec les points d'ancrage mis en évidence (cfr **point 3.6** de ce chapitre).

En effet, le composé **SPB04623** est stabilisé principalement par des interactions avec les résidus Ile406 et Leu607 (interactions CH…π), Gln363 et Gln557 (pont H faible avec la fonction ester) mais ne forme pas de pont H avec les Tyr181 ou Asn425. Il n'interagit pas non plus avec la Phe421 de la petite poche secondaire, laissée vacante.

Le composé **SPB04695** se positionne dans la partie inférieure du site de liaison. L'ester éthylique occupe en partie la petite poche secondaire et interagit par contact CH…π avec la Phe421 tandis que l'oxygène de l'ester forme un pont H avec la Gln363. La partie supérieure du site actif, par contre, reste complètement inoccupée.

Le composé **SPB04944**, lui, se loge principalement dans la partie supérieure de la cavité. Il interagit, notamment, avec la Tyr181 (par interaction π…π décalée, distance entre les centroïdes de 4.42 Å) et réalise également un pont H fort impliquant la fonction carbonyle de l'ester et la Gln557.

Le composé **BTB02942** interagit favorablement au sein de la cavité. Le groupement nitrophényle forme une interaction π…π décalée avec la Tyr181 à l'entrée du site actif (distance entre les centroïdes de 4.35 Å). L'hétérocycle à cinq réalise des interactions CH…π avec les résidus Ile406 et Leu607, de même que le phényle portant le groupement *tert*-butyle avec la Leu414. La petite poche secondaire, par contre, est inoccupée et aucun pont H n'est réalisé avec l'Asn425 ou la Tyr181.

Tableau 7. 14 Principales interactions par résidus réalisées par les composés **SPB04623**, **SPB04695**, **SPB04944** et **BTB02942** au sein du site actif 5-LOX, comparativement au **BTB02850**

Résidu	E totale (kcal.mol^{-1})				
	SPB04623	**SPB04695**	**SPB04944**	**BTB02942**	**BTB02850**
Tyr181	-1.40	-0.12	-2.89	-4.41	-4.62
Gln363	-2.80	-3.07	-2.17	-1.55	-2.71
Ile406	-2.32	-0.35	-1.44	-1.96	-2.19
Leu414	-1.60	-2.60	-3.04	-2.63	-3.02
Phe421	-0.57	-2.35	-0.52	-1.05	-1.58
Gln557	-1.29	-1.15	-1.68	-1.20	-1.34
Leu607	-3.38	-1.21	-3.08	-3.66	-3.43
His372	-3.0	-1.79	-2.44	-1.28	-2.91

4.3. Conclusion

L'étude du mode d'interaction des cinq composés *Maybridge* au sein de la 5-LOX, nous a permis d'expliquer en grande partie les données d'activité. En effet, pour le composé actif, **BTB02850**, nous retrouvons des points d'ancrages identiques à ceux identifiés pour les inhibiteurs 5-LOX non redox de la littérature, à savoir, un pont H fort avec la Tyr181 et des interactions de type CH…π avec les résidus Leu414 et Phe421. Par ailleurs, à la différence des inhibiteurs de référence étudiés, il forme un pont H faible avec la Gln557.

Les autres composés, par contre, n'occupent pas le site de liaison de manière optimale et ne développent pas suffisamment d'interaction avec les points d'ancrages à l'enzyme mis en évidence précédemment.

CHAPITRE 8.

Proposition d'un modèle général d'interaction au sein du site actif 5-LOX

L'étude du mode d'interaction des inhibiteurs 5-LOX non redox de la littérature et des composés *Maybridge* nous a permis de mettre en évidence des points d'ancrage clés au sein de la cavité enzymatique et ainsi, de proposer un premier modèle d'interaction au sein du site actif.

Dans le but d'évaluer la qualité du pharmacophore que nous avons mis en évidence précédemment (cfr Chapitre 5, **point 6**) et de l'affiner, nous l'avons confronté avec les résultats de l'étude de *docking*.

Cette démarche, qui combine les approches basées sur l'étude des ligands et l'étude de la protéine, s'est déjà avérée fructueuse, dans le cas d'autres cibles, pour appréhender le mécanisme d'inhibition et également, aider à la conception de nouveaux inhibiteurs. [de Groot, 2002; Dean, 2004; Moro, 2005]

1. Confrontation des résultats de docking avec le modèle de pharmacophore 174
2. Affinement du modèle de pharmacophore 176
3. Conclusion : établissement d'un modèle général d'interaction au sein du site actif 5-LOX 179

1. Confrontation des résultats de *docking* avec le modèle de pharmacophore

Dans un premier temps, nous avons comparé les conformations « bioactives » (provenant de l'étude de *docking*) aux conformations issues de l'alignement des inhibiteurs avec le deuxième modèle de pharmacophore (**RAAHH**). La superposition obtenue pour les composés **6**, **11** et **15** est présentée à la **Figure 8. 1**.

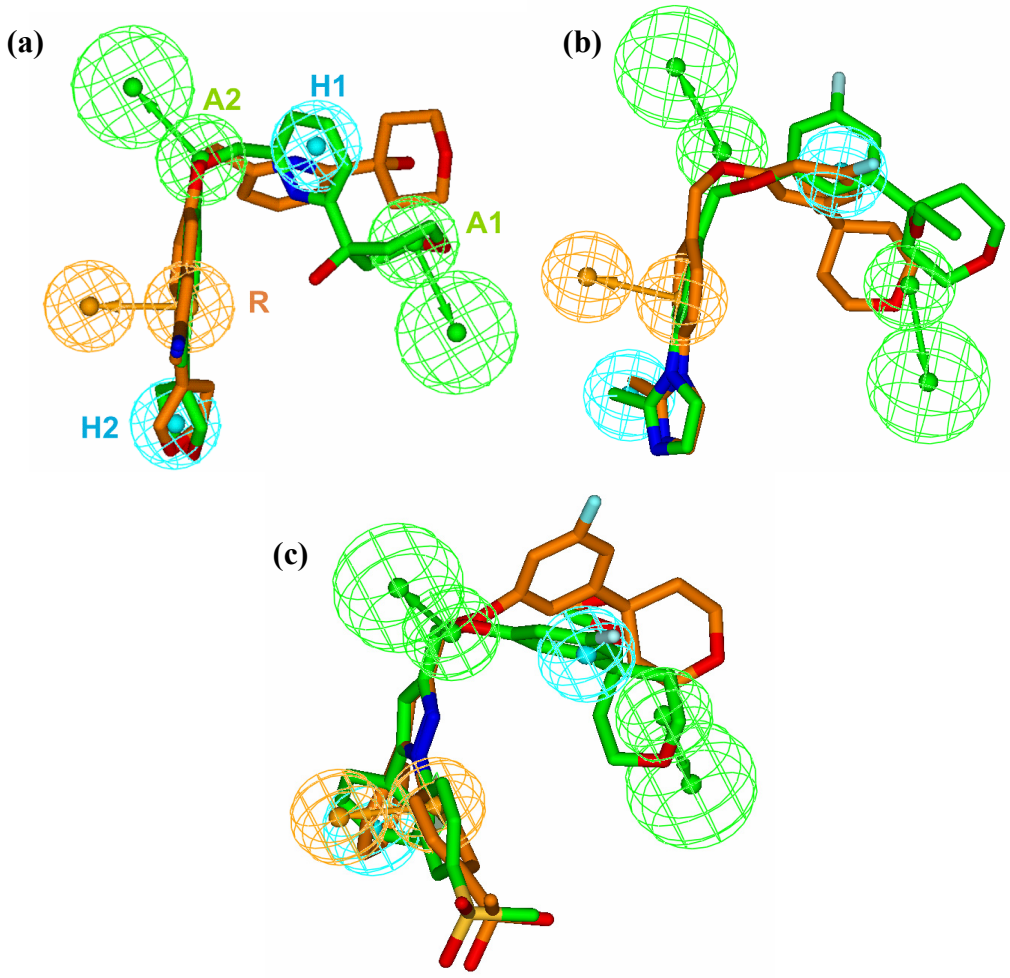


Figure 8. 1 Superposition de la conformation « bioactive » (issue du docking, colorée en orange) et de la conformation alignée avec le pharmacophore (colorée en couleur par atomes) pour les composés **6** (a), **11** (b) et **15** (c).

De façon tout à fait remarquable, on retrouve une correspondance entre les éléments de pharmacophore déduits de l'analyse des ligands seuls et les points d'ancrage à la protéine déduits de l'analyse par *docking*.

De façon plus détaillée, cette analyse nous permet de tirer trois observations majeures.

1 Pour les inhibiteurs présentés dans la **Figure 8. 1**, c'est-à-dire des composés appartenant à la famille des biaryles, imidazoles ou pyrazoles, on peut observer une bonne superposition des deux conformères. Le modèle de **pharmacophore coïncide** donc, globalement, avec la **topologie du site actif** et peut être repositionné au sein de la cavité. Cependant, l'alignement des groupements phényltétrahydropyranes n'est pas optimal et, montre la nécessité d'affiner le pharmacophore en tenant compte de la structure du site actif.

2 Par ailleurs, le modèle de pharmacophore ne permet pas de caractériser totalement les dérivés thiopyranindoles. En effet, la conformation du composé **1**, aligné avec le pharmacophore, ne se superpose pas correctement à la conformation mise en évidence lors de l'étude de *docking* et, n'est donc pas en accord avec la topologie du site actif.

Déjà lors de l'étude de *docking*, nous avons montré que ces inhibiteurs, bien que se liant au site de liaison 5-LOX comme les dérivés biaryles, pyrazoles ou imidazoles, n'occupent pas exactement les mêmes points d'ancrage : ils présentent une fonction acide qui interagit par pont salin avec l'Arg411 et ne possèdent pas tous un accepteur de protons qui occuperait l'entrée du site actif et formerait un pont H avec la Tyr181. Le modèle de pharmacophore mis en évidence décrit donc correctement les composés comportant un cycle tétrahydropyrane mais ne permet pas d'expliquer complètement les RSA observées pour les dérivés thiopyranindoles.

3 Enfin, **quatre** des cinq **points du pharmacophore** correspondent à des **sites d'interaction hautement conservés** parmi les inhibiteurs étudiés. En effet, le groupe aromatique (**R**), représentant des groupes tels que l'indole, imidazole, naphtalène ou phényle, se positionne au centre de la cavité et interagit fortement avec la Leu414 par contact CH…π (direction de l'interaction conservée pour tous les inhibiteurs). Le groupement hydrophobe (**H2**) occupe la petite poche secondaire lipophile, délimitée, entre autres, par les résidus Phe421 et Leu368. Le second groupe hydrophobe (**H1**), lui, est localisé dans la partie supérieure du site de liaison, à proximité des résidus Ile406 et Leu607. L'accepteur de protons (**A1**) est localisé à l'entrée du site actif et forme un pont H avec la Tyr181. Le second accepteur de protons (**A2**), par contre, ne trouve pas de partenaire d'interaction au sein du site actif. Bien qu'il soit commun à une grande partie des inhibiteurs étudiés, ce point du pharmacophore n'est donc pas une caractéristique essentielle dans

l'interaction avec l'enzyme mais, représenterait plutôt un groupement « espaceur », permettant le positionnement correct des autres groupements.

Sur base de ces observations, il est clair que le pharmacophore doit être amélioré.

2. Affinement du modèle de pharmacophore

Dans le but d'affiner ce modèle, nous avons pris en compte la conformation « bioactive » des composés **1**, **6**, **11**, **13** et **15** dans la procédure mise en œuvre par *Catalyst*.[41] Cette démarche nous a permis d'intégrer, en quelque sorte, de l'information sur le site actif de la protéine dans l'élaboration du pharmacophore.

Sur cette base, dix nouvelles hypothèses de pharmacophore ont été générées.[42] Leurs caractéristiques moléculaires ainsi que la fonction de score qui leur est associée sont présentées dans le **Tableau 8. 1**.

Tableau 8. 1 Caractéristiques moléculaires et fonction de score des 10 hypothèses de pharmacophore

Hypothèses	Caractéristiques moléculaires	Fonction de score
1	RHHA	239.7
2	RHHA	237.5
3	RRHA	234.1
4	RRHA	233.7
5	RRHA	233.5
6	RRHA	233.0
7	RRHA	231.4
8	RHHA	231.1
9	RHHA	230.8
10	RHHA	230.3

Nous pouvons constater que les dix hypothèses obtenues ne comportent plus que quatre points, avec un seul accepteur de protons (**A**). Elles peuvent être réparties en deux groupes distincts, **RHHA** et **RRHA**.

Lorsqu'on compare les hypothèses, on remarque qu'elles sont assez proches l'une de l'autre ; elles diffèrent principalement dans la position de l'accepteur de protons et la direction du vecteur associé à ce point. Le second cycle aromatique (**R**) dans le groupe **RRHA** correspond à un des groupements hydrophobes (**H**) dans le groupe **RHHA**.

[41] La conformation issue du *docking* des composés **1**, **6**, **11**, **13** et **15** a été importée dans *Catalyst*.

[42] Les paramètres de la génération d'hypothèses sont récapitulés en annexe.

Pour déterminer lequel de ces modèles présente la meilleure correspondance avec le mode d'interaction des inhibiteurs, nous avons aligné les inhibiteurs **6**, **11** et **15** à chacune des hypothèses et comparé les conformations obtenues à celles adoptées au sein du site actif. Cette analyse nous a permis de retenir la **neuvième hypothèse** (**Figure 8. 2**). Elle comporte un cycle aromatique (**R**), deux groupes hydrophobes (**H**) et un accepteur de protons (**A**).

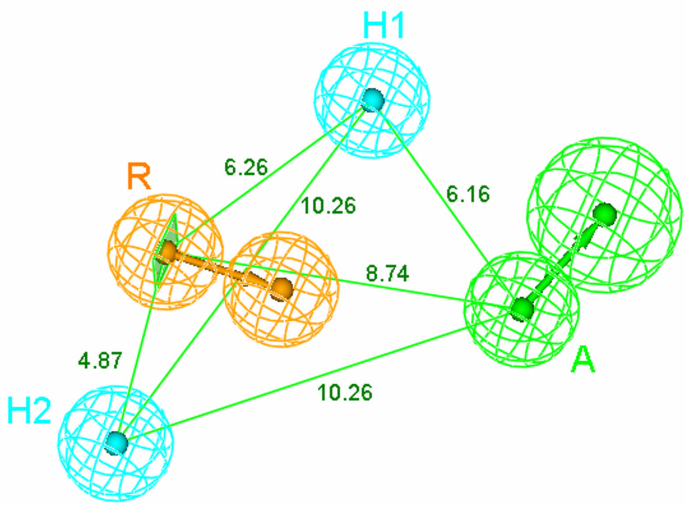


Figure 8. 2 Représentation de l'hypothèse de pharmacophore 5-LOX sélectionnée comprenant deux groupements hydrophobes **H** (en cyan), un accepteur de protons **A** (en vert) et un cycle aromatique **R** (en orange). Les distances sont exprimées en Å, avec une tolérance de ± 0.8 Å.

La **Figure 8. 3** illustre le composé **15** dans la conformation qu'il adopte au sein du site actif (mise en évidence lors de l'étude de *docking*) ainsi que les différents éléments du pharmacophore affiné qui lui correspondent.

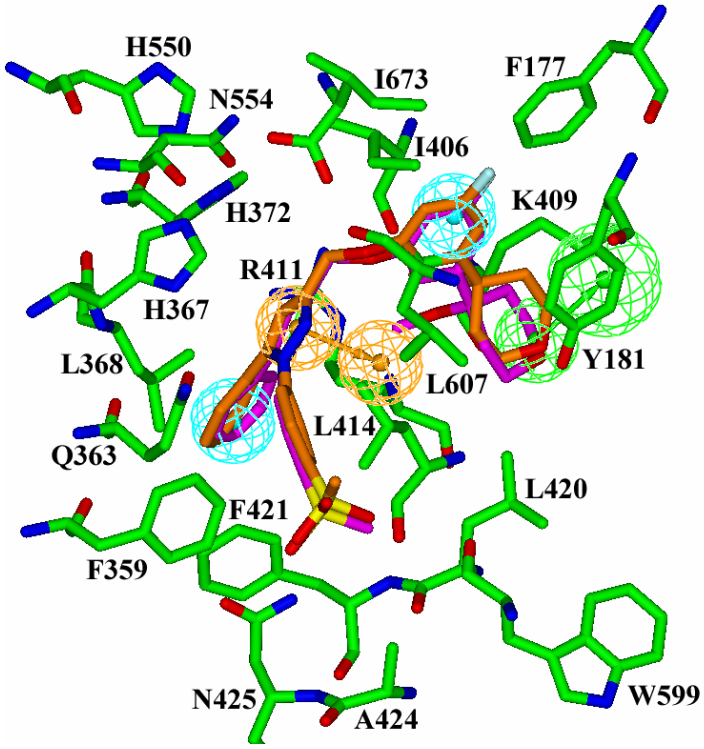


Figure 8. 3 Superposition de la conformation « bioactive » du composé **15** (en orange) et des différents points du pharmacophore affiné (en magenta)

On peut constater, avec cette nouvelle hypothèse de pharmacophore affinée, que la **combinaison des approches directe et indirecte** donne des **résultats meilleurs** que l'une ou l'autre des deux approches seule.

Pour les dérivés thiopyranindoles et dihydropyrrolizines, une bonne corrélation est également obtenue lorsqu'on néglige une des fonctions du modèle, à savoir l'accepteur de protons (**A**), lors de l'alignement des composés avec les éléments du pharmacophore (**Figure 8. 4**).

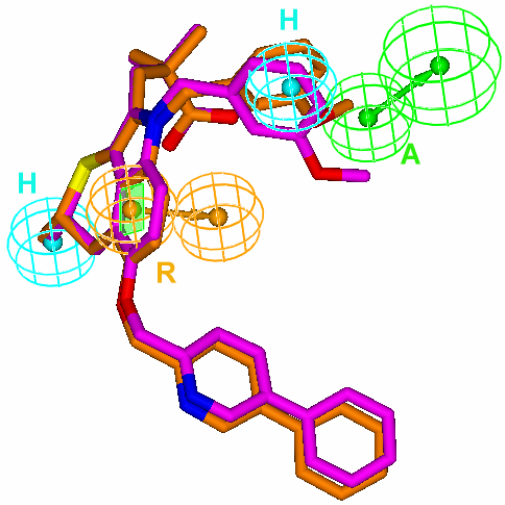


Figure 8. 4 Comparaison de la conformation « bioactive » (issue du *docking*, colorée en orange) et de la conformation alignée avec le pharmacophore (colorée en magenta) pour le composé **1**

Ce modèle de pharmacophore affiné rend donc compte de l'arrangement 3D des points d'ancrage clés au sein du site actif.

3. Conclusion : établissement d'un modèle général d'interaction au sein du site actif 5-LOX

La confrontation des résultats obtenus lors de l'étude du mode d'interaction des inhibiteurs de la littérature avec le modèle de pharmacophore à 5 points (**RHHAA**) nous a permis d'évaluer la **complémentarité stérique et électronique** entre l'hypothèse de pharmacophore et le site actif 5-LOX.

D'une part, nous avons pu montrer le **bon accord** entre le modèle de **pharmacophore** et la **topologie du site de liaison**.

D'autre part, **quatre caractéristiques** du pharmacophore sur les cinq correspondent à des **points d'ancrage** à la protéine mis en évidence pour les inhibiteurs au sein de la cavité enzymatique. Seul l'accepteur de protons **A2** n'a pas de partenaire d'interaction au sein du site actif ; aucun donneur de protons n'est présent dans son voisinage. Cette fonction, qui représente principalement des oxygènes de type éther, ne serait donc pas une caractéristique chimique essentielle à une bonne affinité pour l'enzyme mais plutôt un groupe « espaceur », commun à la plupart des composés étudiés.

Les **conformations « bioactives »** des inhibiteurs (interagissant au sein de la cavité 5-LOX) ont été prises en compte dans la génération d'une nouvelle série d'hypothèses de

pharmacophore. L'hypothèse retenue comporte, cette fois, quatre points dont un cycle aromatique (**R**), deux groupes hydrophobes (**H**) et un seul accepteur de protons (**A**). Il permet une excellente corrélation avec le mode d'interaction des inhibiteurs au sein de la 5-LOX.

Remarquons, toutefois, que ce pharmacophore ne permet pas de décrire complètement les dérivés thiopyranindoles. Ceux-ci ne comportent pas d'accepteurs de protons se positionnant à l'entrée du site actif, mais présentent deux points d'ancrage supplémentaires : un groupe acide, capable d'interagir avec l'Arg411 et un accepteur de protons à proximité de l'Asn425 (ce point est également partagé par d'autres dérivés comme les biaryles). Par ailleurs, l'étude du mode d'interaction des composés *Maybridge* sélectionnés nous a conduits à l'identification d'un autre site d'ancrage à la protéine, à savoir un accepteur de protons formant un pont H avec la Gln557. Ces fonctions, bien que secondaires, pourraient être intéressantes lors de la conception de nouveaux inhibiteurs 5-LOX.

Dès lors, nous proposons un **modèle général d'interaction au sein du site de liaison 5-LOX** (**Figure 8. 5**).

Il comprend quatre points indispensables à l'activité. Les trois premiers (communs à tous les inhibiteurs) semblent indispensables à l'activité inhibitrice : (i) un **groupe hydrophobe** interagissant favorablement avec les résidus **Ile406** et **Leu607**, (ii) un second **groupe hydrophobe** occupant la petite cavité secondaire formée, entre autres, par la **Phe421** et (iii) un **cycle aromatique** formant un contact CH…π avec la **Leu414**. Le quatrième point peut être soit, un **accepteur de protons** à l'entrée du site de liaison, formant un pont H avec la **Tyr181**, soit, une **fonction acide** se positionnant vers l'arrière de la cavité et interagissant par pont salin avec l'**Arg411**. Enfin, un cinquième point, secondaire, est représenté par un **accepteur de protons**, pouvant interagir avec les résidus **Asn425** ou **Gln557**.

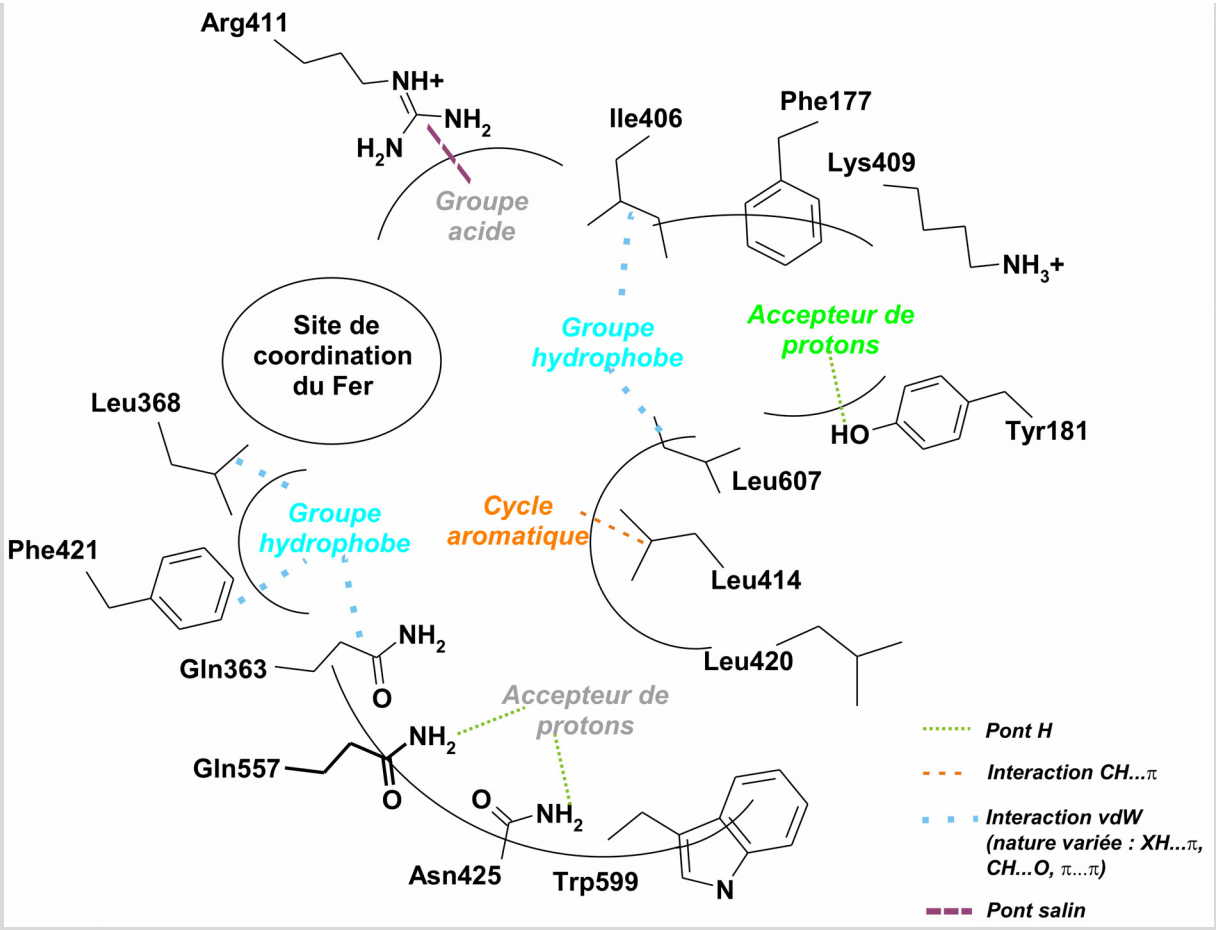


Figure 8. 5 Modèle général d'interaction proposé au sein du site de liaison 5-LOX combinant les approches indirecte (sites d'ancrages colorés suivant la convention) et directe (sites d'ancrage colorés en gris). (Le résidu Gln557, en trait plus gras, se trouve à l'avant de la cavité.)

CHAPITRE 9.
Conclusions et perspectives

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent un traitement de choix des maladies inflammatoires, telles que la polyarthrite rhumatoïde. Leur utilisation est toutefois souvent limitée par les effets secondaires qu'ils présentent, particulièrement au niveau du tractus gastro-intestinal et du rein.

La cible moléculaire de ces composés, la cyclooxygénase, existe sous deux formes distinctes : la COX-1, exprimée de manière constitutive, notamment au niveau de la muqueuse gastrique et du rein, et la COX-2, induite par des stimuli pro-inflammatoires. Le manque de sélectivité des AINS vis-à-vis de la COX-2, par rapport à la COX-1, est jugé responsable des effets indésirables qu'ils engendrent et a conduit à la conception d'inhibiteurs spécifiques de la COX-2, composés présentant potentiellement moins de toxicité gastro-intestinale et rénale par rapport aux AINS classiques.

Actuellement, différentes observations tendent à remettre en cause les fondements de cette démarche, les rôles des COX-1 et -2 n'étant pas purement physiologiques et pathologiques.

Il est dès lors intéressant d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques, parmi lesquelles l'inhibition de la voie de la 5-LOX. Cette seconde voie de métabolisation de l'acide arachidonique est régulée positivement lors de l'inhibition de la voie des COX. Elle donne lieu à la biosynthèse des leucotriènes, médiateurs impliqués dans plusieurs désordres inflammatoires et d'hypersensibilité, comme l'asthme, et est donc responsable d'effets indésirables.

Le développement d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 pourrait conduire à des composés présentant non seulement, un profil anti-inflammatoire amélioré mais également moins d'effets secondaires. Par ailleurs, cette démarche présente un intérêt thérapeutique supplémentaire: les deux enzymes étant impliquées dans les processus de prolifération cellulaire, les inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2 offrent de nouvelles perspectives dans le traitement préventif de certains cancers.

Notre travail de thèse s'inscrit dans le cadre général de la conception rationnelle d'inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2. Alors que la COX-2 a déjà été l'objet de nombreuses recherches, notamment au sein de notre laboratoire, le niveau de nos connaissances

concernant la 5-LOX humaine est beaucoup plus restreint. Dès lors, avant de pouvoir proposer efficacement des inhibiteurs mixtes, il nous est apparu indispensable de travailler d'abord sur la **5-LOX humaine**.

En particulier, notre objectif a été de **caractériser sa structure ainsi que son mode d'interaction avec les inhibiteurs de type non redox**. Cette étude pourra par la suite aider à la conception de nouveaux inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2.

Pour répondre à cet objectif, nous avons entrepris de combiner une **approche indirecte**, centrée sur l'étude d'inhibiteurs 5-LOX non redox, et une **approche directe**, centrée sur l'étude de la protéine et de son interaction avec des ligands.

La comparaison de 16 inhibiteurs 5-LOX de type non redox, actifs et appartenant à cinq classes structurales différentes, nous a permis de mettre en évidence un premier modèle de pharmacophore à cinq points, comprenant un cycle aromatique (**R**), trois groupements hydrophobes (**H**) et un accepteur de protons (**A**) (**Figure 9. 1**).

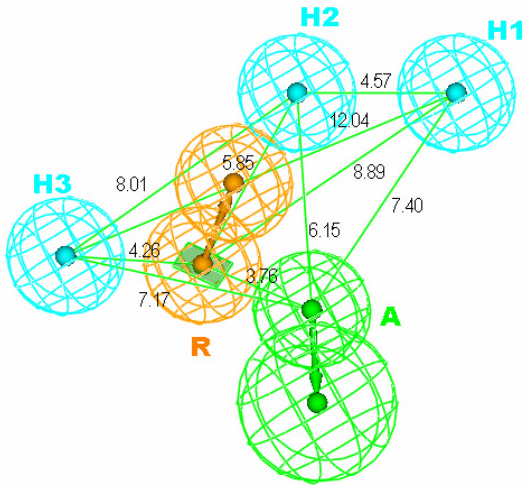


Figure 9. 1 Premier modèle de pharmacophore mis en évidence à partir d'inhibiteurs 5-LOX non redox. Les distances sont exprimées en Å, avec une tolérance de ± 1.0 Å.

Nous avons évalué ce modèle à partir de composés ne faisant pas partie de la sélection de départ. Ainsi, la banque de composés commerciaux *Maybridge* a été criblée à l'aide du pharmacophore. Nous avons **sélectionné**, en incluant une série de filtres *in silico* pertinents (pharmacophore COX-2, poids moléculaire, chiralité, flexibilité), **cinq composés** répondant au(x) pharmacophore(s) 5-LOX (et COX-2) (**Figure 9. 2**).

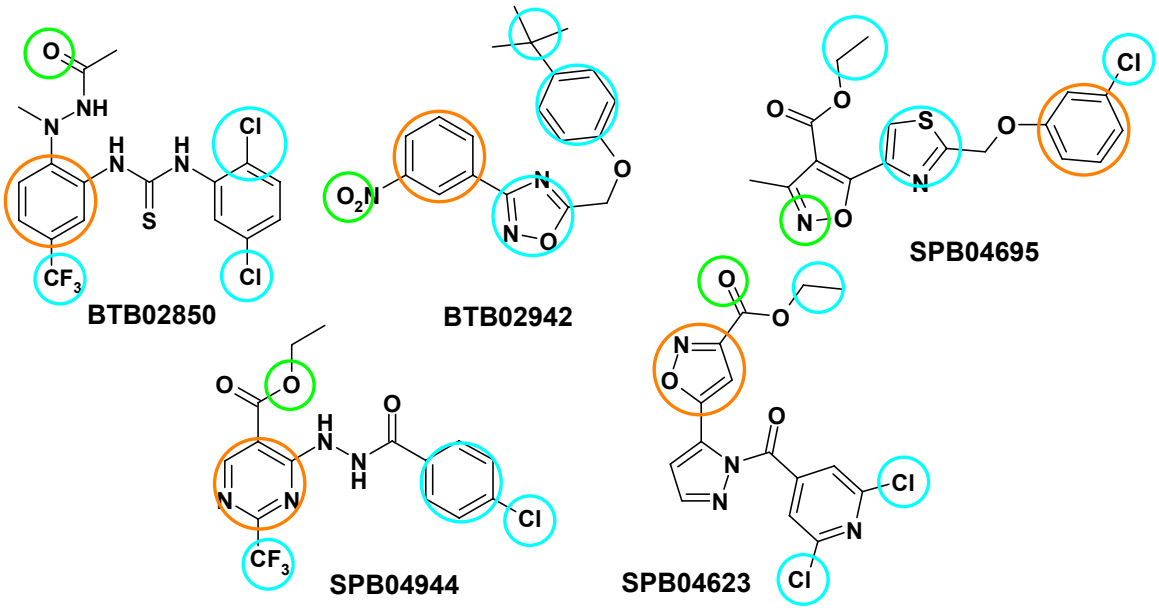


Figure 9. 2 Représentation des composés Maybridge sélectionnés alignés avec les points du pharmacophore 5-LOX

Leur évaluation pharmacologique a été réalisée sur la 5-LOX humaine (test sur sang total réalisé à l'ICPL, Lille). Des cinq composés testés, seul le **BTB02850** inhibe efficacement la 5-LOX humaine (**IC_{50} de 6.2 µM** *vs.* IC_{50} de 0.7 µM pour la référence zileuton). Ces résultats, bien qu'encourageants, nous ont montré la nécessité, avant toute autre chose, d'**améliorer le pharmacophore 5-LOX**.

Ainsi, nous avons ajusté deux paramètres[43] intervenant dans le processus de génération d'hypothèses. Sur cette base, nous avons pu mettre en évidence un **second modèle** (**Figure 9. 3**), **plus sélectif** que le premier. En effet, sur les 5 composés *Maybridge* sélectionnés avec le premier pharmacophore, trois seulement sont retenus avec le phamacophore affiné. De façon très encourageante, le composé actif, **BTB02850**, fait partie des trois molécules retenues avec ce second modèle.

[43] Les deux paramètres ajustés sont, d'une part, la tolérance accordée aux points du pharmacophore (0.8 au lieu de 1.0) et d'autre part, le nombre de molécules pouvant ne pas se superposer à tous les points du pharmacophore (*Misses* = 2 au lieu de 1).

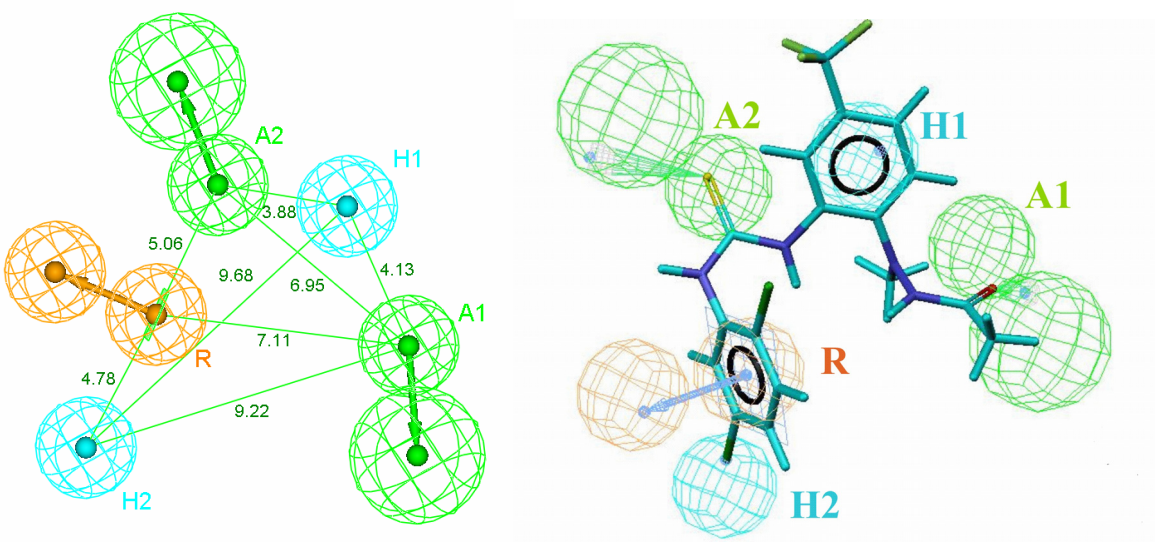


Figure 9. 3 Second pharmacophore à 5 points mis en évidence (à gauche) et alignement du composé **BTB02850** avec le modèle (à droite). Les distances sont exprimées en Å, avec une tolérance de ± 0.8 Å.

Cette démarche nous a montré que, suivant l'utilisation faite des paramètres de *Catalyst*, des modèles de pharmacophore différents peuvent être obtenus.

Dès lors, pour affiner le pharmacophore 5-LOX, il nous a semblé important de dépasser le stade de l'approche indirecte « classique », en intégrant des données structurales sur la protéine et son interaction avec des ligands (approche directe).

Nous avons élaboré un modèle 3D de l'enzyme par homologie à partir de la 15-LOX de lapin dont la structure cristallographique a été déterminée par DRX. Ce modèle, en accord avec les données structurales disponibles sur les LOXs, a été utilisé pour étudier le mode d'interaction d'inhibiteurs 5-LOX non redox de la littérature ainsi que pour rationnaliser les données d'activité obtenues pour les composés *Maybridge*. Cette analyse nous a permis d'identifier une série de points d'ancrage clés à la protéine.

Par après, la confrontation des résultats de l'étude de *docking* et de l'hypothèse à 5 points **RHHAA** nous a permis d'évaluer leur complémentarité stérique et électronique. De manière générale, nous obtenons une bonne correspondance entre le pharmacophore et la topologie du site actif. Par ailleurs, quatre des cinq points du pharmacophore correspondent à des sites d'interaction conservés, identifiés lors de l'étude du mode de liaison des inhibiteurs.

Ces informations structurales ont été intégrées, sous la forme des conformations « bioactives » des inhibiteurs, dans la génération d'une nouvelle série d'hypothèses. Le modèle de pharmacophore affiné retenu comporte, cette fois, quatre points (**RHHA**) et présente une excellente correspondance avec le mode d'interaction mis en évidence pour les inhibiteurs au sein du site actif (**Figure 9. 4**).

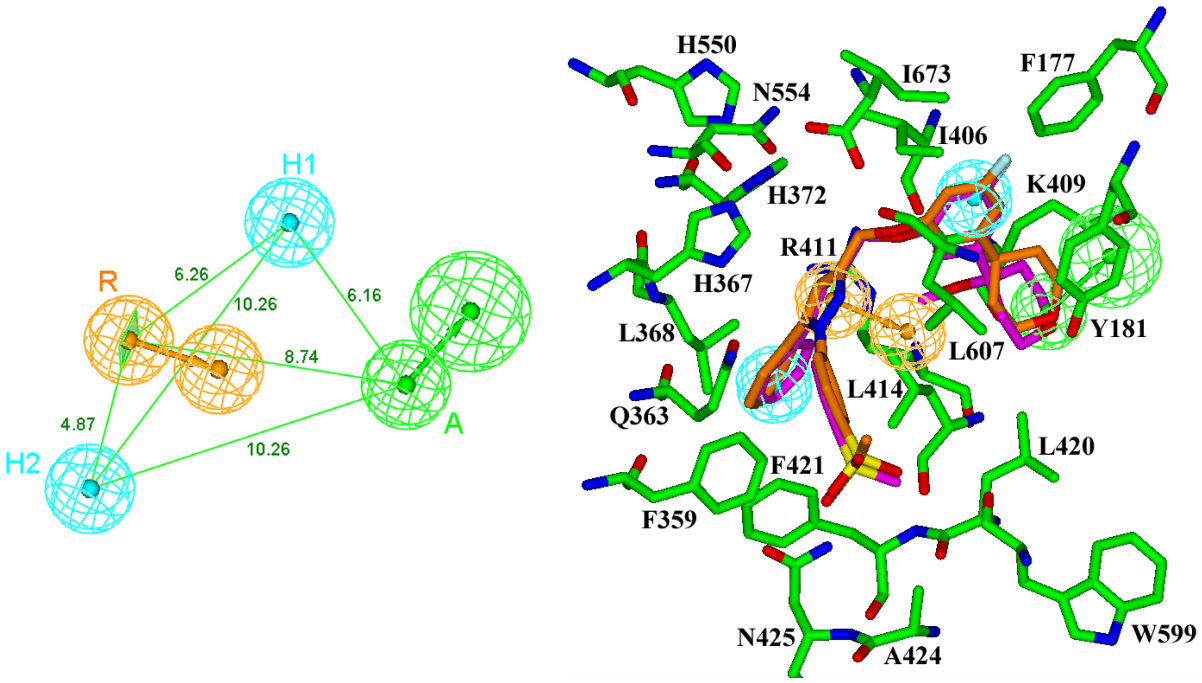


Figure 9. 4 Hypothèse de pharmacophore affinée à 4 points (à gauche) et superposition du composé **15**, aligné avec les points du pharmacophore affiné (en magenta), et de la conformation « bioactive » au sein du site actif 5-LOX (en orange) (à droite). Les distances sont exprimées en Å, avec une tolérance de ± 0.8 Å.

De plus, sur base de l'analyse des complexes *dockés*, deux autres points d'ancrage ont été identifiés : un groupe acide, capable d'interagir avec l'Arg411 et un accepteur de protons à proximité de l'Asn425 ou de la Gln557. Ces fonctions, bien que secondaires, pourraient être intéressantes lors de la conception de nouveaux inhibiteurs 5-LOX.

Dès lors, nous proposons un **modèle général d'interaction pour les inhibiteurs 5-LOX non redox au sein du site de liaison de l'enzyme**, comprenant quatre fonctions principales et deux secondaires (**Figure 9. 5**).

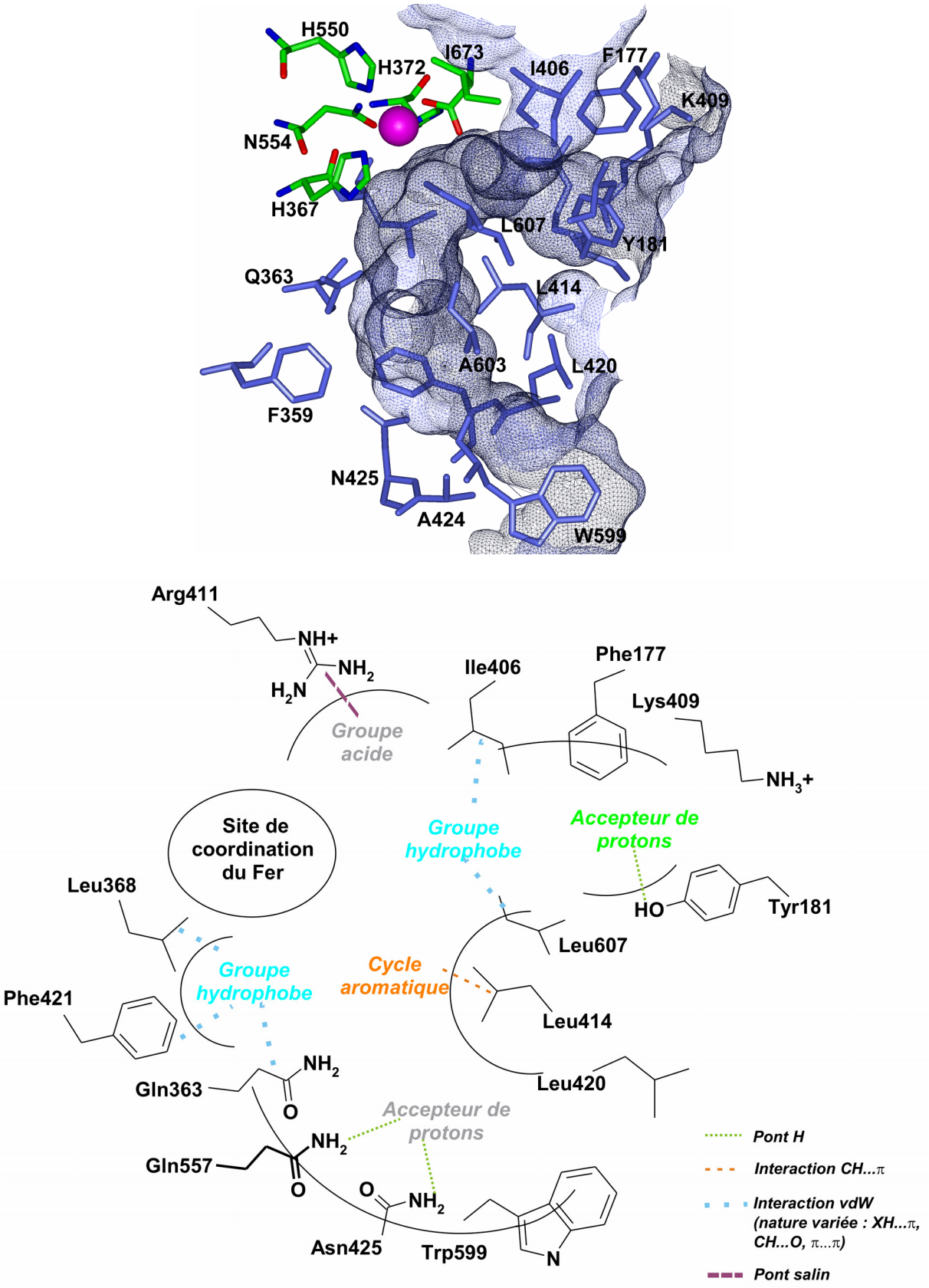


Figure 9. 5 Représentation du site actif de la 5-LOX humaine avec la surface de Connolly représentant la cavité accessible (en haut) et modèle général d'interaction proposé au sein du site de liaison 5-LOX (en bas), combinant les approches indirecte (sites d'ancrages colorés suivant la convention) et directe (sites d'ancrage colorés en gris). (Le résidu Gln557, en trait plus gras, se trouve à l'avant de la cavité.)

Une partie de ces résultats fait l'objet d'un article intitulé « *Structural Insights into Human 5-Lipoxygenase Inhibition : Combined Ligand-Based and Target-based Approach* » paru dans la revue *Journal of Medicinal Chemistry*. [Charlier, 2006]

Ce travail est un premier pas vers la caractérisation de la 5-LOX humaine et la compréhension de son interaction avec des inhibiteurs de type non redox. Il ouvre des **perspectives**, particulièrement intéressantes, notamment au niveau expérimental.

Le modèle général d'interaction que nous proposons met en évidence des résidus importants pour l'interaction de l'enzyme avec des inhibiteurs. Des études de **mutagenèse dirigée** visant ces sites d'ancrage clés permettraient d'évaluer la qualité de notre démarche combinant les approches indirecte et directe.

Au cours de ce travail, nous avons également ouvert des perspectives en vue de la purification de la 5-LOX à partir d'une préparation d'enzyme commerciale. Il sera intéressant de poursuivre ces études en vue de réaliser des études de **cristallogenèse**.

L'**étude structurale** de toute **autre isoforme LOX animale** est également séduisante. L'obtention d'une nouvelle structure cristallographique pourrait apporter des informations complémentaires quant à la topologie du site de liaison des ligands, à la compréhension de leur mécanisme d'inhibition et aux différences structurales existant entres les isoformes. Ces données pourraient être particulièrement utiles dans la conception d'inhibiteurs sélectifs de l'une ou l'autre isoforme.

Par ailleurs, pour compléter ce travail, il serait important d'**évaluer** l'activité du composé **BTB02850** vis-à-vis de la **COX-2**. Cette molécule, qui inhibe la 5-LOX, pourrait constituer un **nouvel inhibiteur mixte 5-LOX/COX-2** et être le point de départ de diverses pharmacomodulations. Notamment, une substitution différente du cycle dichlorophényle, visant une meilleure occupation de la petite poche secondaire chez la 5-LOX, pourrait renforcer son affinité pour l'enzyme (et vérifier notre modèle d'interaction).

Enfin, sur base de ce travail, nous proposons une **stratégie de criblage virtuel améliorée**, dans le but d'identifier de manière plus efficace de nouveaux composés, potentiellement inhibiteurs 5-LOX (ou mixtes 5-LOX/COX-2). Elle consiste en (i) l'utilisation du modèle de pharmacophore affiné **RHHA** pour sélectionner, dans une banque de composés, des molécules répondant au modèle, (ii) le *docking* de ces composés au sein du

site actif 5-LOX et, (iii) l'analyse de l'occupation des points d'ancrage mis en évidence dans notre modèle général d'interaction, pour ne retenir que ceux présentant la meilleure complémentarité stéréoélectronique avec le site actif. Une démarche similaire pourrait être réalisée vis-à-vis de la COX-2 et, ainsi, mener à l'identification de nouveaux composés, potentiellement inhibiteurs mixtes 5-LOX/COX-2.

Références bibliographiques

Accelrys Inc. **1998** *Discover3*; version 2.98 ed.: San Diego, CA.

Accelrys Inc. **2000** *InsightII*; version 2000 ed.: San Diego, CA.

Accelrys Inc. **2002** *Catalyst*; version 4.9 ed.: San Diego, CA.

Aisen, P. S. Evaluation of selective COX-2 inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J Pain Symptom Manage* **2002***, 23*, S35-40.

Allard, J. B.; Brock, T. G. Structural organization of the regulatory domain of human 5-lipoxygenase. *Curr Protein Pept Sci* **2005***, 6*, 125-131.

Allen, F. H. The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising. *Acta Crystallogr B* **2002***, 58*, 380-388.

Allen, F. H.; Taylor, R. Librarians, crystal structures and drug design. *Chem Commun (Camb)* **2005**, 5135-5140.

Alsalameh, S.; Burian, M.; Mahr, G.; Woodcock, B. G.; Geisslinger, G. The pharmacological properties and clinical use of valdecoxib, a new cyclo-oxygenase-2-selective inhibitor. *Aliment Pharmacol Ther* **2003***, 17*, 489-501.

Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. SIR97 : a new tool for crystal structure determination and refinement. *J Appl Cryst* **1999***, 32*, 115-119.

Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **1997***, 25*, 3389-3402.

Asako, H.; Kubes, P.; Wallace, J.; Gaginella, T.; Wolf, R. E.; Granger, D. N. Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am J Physiol* **1992***, 262*, G903-908.

Barbey, S.; Goossens, L.; Taverne, T.; Cornet, J.; Choesmel, V.; Rouaud, C.; Gimeno, G.; Yannic-Arnoult, S.; Michaux, C.; Charlier, C.; Houssin, R.; Henichart, J. P. Synthesis and activity of a new methoxytetrahydropyran derivative as dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* **2002***, 12*, 779-782.

Bateman, A.; Sandford, R. The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr Biol* **1999***, 9*, R588-590.

Bayly, C. I.; Black, W. C.; Leger, S.; Ouimet, N.; Ouellet, M.; Percival, M. D. Structure-based design of COX-2 selectivity into flurbiprofen. *Bioorg Med Chem Lett* **1999***, 9*, 307-312.

Berman, H. M.; Battistuz, T.; Bhat, T. N.; Bluhm, W. F.; Bourne, P. E.; Burkhardt, K.; Feng, Z.; Gilliland, G. L.; Iype, L.; Jain, S.; Fagan, P.; Marvin, J.; Padilla, D.; Ravichandran, V.; Schneider, B.; Thanki, N.; Weissig, H.; Westbrook, J. D.; Zardecki, C. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2002***, 58*, 899-907.

Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000***, 28*, 235-242.

Bertolini, A.; Ottani, A.; Sandrini, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* **2001***, 44*, 437-450.

Bhattacharyya, D. K.; Lecomte, M.; Rieke, C. J.; Garavito, M.; Smith, W. L. Involvement of arginine 120, glutamate 524, and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol Chem* **1996***, 271*, 2179-2184.

Bias, P.; Buchner, A.; Klesser, B.; Laufer, S. The gastrointestinal tolerability of the LOX/COX inhibitor, licofelone, is similar to placebo and superior to naproxen therapy in healthy volunteers: results from a randomized, controlled trial. *Am J Gastroenterol* **2004***, 99*, 611-618.

Bigby, T. D. The yin and the yang of 5-lipoxygenase pathway activation. *Mol Pharmacol* **2002***, 62*, 200-202.

Biosym/MSI *Homology, User guide*: San Diego, CA., **1993**.

Bishop-Bailey, D.; Wray, J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2003***, 71*, 1-22.

Bombardier, C. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. *Am J Cardiol* **2002***, 89*, 3D-9D.

Borbulevych, O. Y.; Jankun, J.; Selman, S. H.; Skrzypczak-Jankun, E.; Zhou, K.; McCabe, N. P. Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1 A resolution. *Proteins* **2004***, 54*, 13-19.

Borngraber, S.; Browner, M.; Gillmor, S.; Gerth, C.; Anton, M.; Fletterick, R.; Kuhn, H. Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site. The functional interplay of sequence determinants for the reaction specificity. *J Biol Chem* **1999***, 274*, 37345-37350.

Boschelli, D. H.; Connor, D. T.; Hoefle, M.; Bornemeier, D. A.; Dyer, R. D. Conversion of NSAIDS into balanced dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *Bioorg Med Chem Lett* **1992***, 2*, 69-72.

Botting, R. COX-1 and COX-3 inhibitors. *Thromb Res* **2003***, 110*, 269-272.

Botting, R. M. Mechanism of action of acetaminophen: is there a cyclooxygenase 3? *Clin Infect Dis* **2000***, 31 Suppl 5*, S202-210.

Boyington, J. C.; Gaffney, B. J.; Amzel, L. M. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* **1993***, 260*, 1482-1486.

Brash, A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* **1999***, 274*, 23679-23682.

Brash, A. R.; Boeglin, W. E.; Chang, M. S.; Shieh, B. H. Purification and molecular cloning of an 8R-lipoxygenase from the coral Plexaura homomalla reveal the related primary structures of R- and S- lipoxygenases. *J Biol Chem* **1996***, 271*, 20949-20957.

Brideau, C.; Chan, C.; Charleson, S.; Denis, D.; Evans, J. F.; Ford-Hutchinson, A. W.; Fortin, R.; Gillard, J. W.; Guay, J.; Guevremont, D.; et al. Pharmacology of MK-0591 (3-[1-(4-chlorobenzyl)-3-(t-butylthio)-5-(quinolin-2-yl-methoxy)-indol-2-yl]-2,2-dimethyl propanoic acid), a potent, orally active leukotriene biosynthesis inhibitor. *Can J Physiol Pharmacol* **1992***, 70*, 799-807.

Brooks, C. D.; Summers, J. B. Modulators of leukotriene biosynthesis and receptor activation. *J Med Chem* **1996***, 39*, 2629-2654.

Browner, M. F.; Gillmor, S. A.; Fletterick, R. Burying a charge. *Nat Struct Biol* **1998***, 5*, 179.

Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Kessler, M.; Luo, J.; Motherwell, W. D.; Purkis, L. H.; Smith, B. R.; Taylor, R.; Cooper, R. I.; Harris, S. E.; Orpen, A. G. Retrieval of crystallographically-derived molecular geometry information. *J Chem Inf Comput Sci* **2004***, 44*, 2133-2144.

Bruno, I. J.; Cole, J. C.; Lommerse, J. P.; Rowland, R. S.; Taylor, R.; Verdonk, M. L. IsoStar: a library of information about nonbonded interactions. *J Comput Aided Mol Des* **1997***, 11*, 525-537.

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

Casey, R.; West, S. I.; Robinson, D. S.; Wu, Z.; Hughes, R. K. New frontiers in food enzymology : recombinant lipoxygenases. *Trends in Food Science & Technology* **1999***, 10*, 297-302.

Celotti, F.; Laufer, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. *Pharmacol Res* **2001***, 43*, 429-436.

Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002***, 19*, 19.

Charlier, C.; Henichart, J. P.; Durant, F.; Wouters, J. Structural insights into human 5-lipoxygenase inhibition: combined ligand-based and target-based approach. *J Med Chem.* **2006***, 49*, 186-195.

Charlier, C.; Michaux, C. Dual inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) and 5-lipoxygenase (5-LOX) as a new strategy to provide safer non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem* **2003***, 38*, 645-659.

Chen, X. S.; Funk, C. D. Structure-function properties of human platelet 12-lipoxygenase: chimeric enzyme and in vitro mutagenesis studies. *Faseb J* **1993***, 7*, 694-701.

Chen, X. S.; Funk, C. D. The N-terminal "beta-barrel" domain of 5-lipoxygenase is essential for nuclear membrane translocation. *J Biol Chem* **2001***, 276*, 811-818.

Chen, X. S.; Naumann, T. A.; Kurre, U.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Funk, C. D. cDNA cloning, expression, mutagenesis, intracellular localization, and gene chromosomal assignment of mouse 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* **1995***, 270*, 17993-17999.

Chivian, D.; Robertson, T.; Bonneau, R.; Baker, D. Ab initio methods. *Structural Bioinformatics*; Wiley-Liss: Hoboken, New Jersey, **2003**; pp 547-557.

Coffa, G.; Brash, A. R. A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004***, 101*, 15579-15584.

Crawley, G. C.; Dowell, R. I.; Edwards, P. N.; Foster, S. J.; McMillan, R. M.; Walker, E. R.; Waterson, D.; Bird, T. G.; Bruneau, P.; Giroaeau, J. M. Methoxytetrahydropyrans. A new series of selective and orally potent 5- lipoxygenase inhibitors. *J Med Chem* **1992***, 35*, 2600-2609.

Cuatrecasas, P.; Wilchek, M. Affinity chromatography. *Encyclopedia of Biological Chemistry*; Elsevier Ltd.: Oxford, **2004**; pp 51-56.

Dailey, L. A.; Imming, P. 12-Lipoxygenase: classification, possible therapeutic benefits from inhibition, and inhibitors. *Curr Med Chem* **1999***, 6*, 389-398.

Dannenberg, A. J.; Altorki, N. K.; Boyle, J. O.; Dang, C.; Howe, L. R.; Weksler, B. B.; Subbaramaiah, K. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol* **2001***, 2*, 544-551.

Dannhardt, G.; Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors - current status and future prospects. *Eur J Med Chem* **2001***, 36*, 109-126.

Dannhardt, G.; Laufer, S. Structural approaches to explain the selectivity of COX-2 inhibitors: is there a common pharmacophore? *Curr Med Chem* **2000***, 7*, 1101-1112.

Davies, N. M.; Good, R. L.; Roupe, K. A.; Yanez, J. A. Cyclooxygenase-3: axiom, dogma, anomaly, enigma or splice error?--Not as easy as 1, 2, 3. *J Pharm Pharm Sci* **2004***, 7*, 217-226.

De Caterina, R.; Zampolli, A. From asthma to atherosclerosis--5-lipoxygenase, leukotrienes, and inflammation. *N Engl J Med* **2004***, 350*, 4-7.

de Groot, M. J.; Alex, A. A.; Jones, B. C. Development of a combined protein and pharmacophore model for cytochrome P450 2C9. *J Med Chem* **2002***, 45*, 1983-1993.

de Leval, X.; Julemont, F.; Delarge, J.; Pirotte, B.; Dogne, J. M. New Trends in Dual 5-LOX/COX Inhibition. *Curr Med Chem* **2002***, 9*, 941-962.

Dean, P. M.; Lloyd, D. G.; Todorov, N. P. De novo drug design: integration of structure-based and ligand-based methods. *Curr Opin Drug Discov Devel* **2004***, 7*, 347-353.

Delorme, D.; Ducharme, Y.; Brideau, C.; Chan, C. C.; Chauret, N.; Desmarais, S.; Dube, D.; Falgueyret, J. P.; Fortin, R.; Guay, J.; Hamel, P.; Jones, T. R.; Lepine, C.; Li, C.; McAuliffe, M.; McFarlane, C. S.; Nicoll-Griffith, D. A.; Riendeau, D.; Yergey, J. A.; Girard, Y. Dioxabicyclooctanyl naphthalenenitriles as nonredox 5-lipoxygenase inhibitors: structure-activity relationship study directed toward the improvement of metabolic stability. *J Med Chem* **1996***, 39*, 3951-3970.

Denis, D.; Falgueyret, J. P.; Riendeau, D.; Abramovitz, M. Characterization of the activity of purified recombinant human 5- lipoxygenase in the absence and presence of leukocyte factors. *J Biol Chem* **1991***, 266*, 5072-5079.

Diamant, Z.; Bel, E. H.; Dekhuijzen, P. N. Anti-leukotriene therapy in asthma. *Neth J Med* **1998***, 53*, 176-189.

Ding, C.; Cicuttini, F. Licofelone (Merckle). *IDrugs* **2003***, 6*, 802-808.

Dixon, R. A.; Diehl, R. E.; Opas, E.; Rands, E.; Vickers, P. J.; Evans, J. F.; Gillard, J. W.; Miller, D. K. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* **1990***, 343*, 282-284.

Dixon, R. A.; Jones, R. E.; Diehl, R. E.; Bennett, C. D.; Kargman, S.; Rouzer, C. A. Cloning of the cDNA for human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988***, 85*, 416-420.

Dogne, J. M.; Supuran, C. T.; Pratico, D. Adverse Cardiovascular Effects of the Coxibs. *J Med Chem* **2005***, 48*, 2251-2257.

Drazen, J. M.; Israel, E.; O'Byrne, P. M. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* **1999***, 340*, 197-206.

Dube, D.; Blouin, M.; Brideau, C.; Chan, C. C.; Desmarais, S.; Ethier, D.; Falgueyret, J. P.; Friesen, R. W.; Girard, M.; Girard, Y.; Guay, J.; Riendeau, D.; Tagari, P.; Young, R. N. Quinolines as potent 5-lipoxygenase inhibitors: synthesis and biological profile of L-746,530. *Bioorg Med Chem Lett* **1998***, 8*, 1255-1260.

Ducharme, Y.; Brideau, C.; Dube, D.; Chan, C. C.; Falgueyret, J. P.; Gillard, J. W.; Guay, J.; Hutchinson, J. H.; McFarlane, C. S.; Riendeau, D.; Scheigetz, J.; Girard, Y. Naphthalenic lignan lactones as selective, nonredox 5-lipoxygenase inhibitors. Synthesis and biological activity of (methoxyalkyl)thiazole and methoxytetrahydropyran hybrids. *J Med Chem* **1994***, 37*, 512-518.

Dyer, R. D.; Connor, D. T. Dual inhibitors of prostaglandin and leukotriene biosynthesis. *Curr Pharm Des* **1997***, 3*, 463-472.

Enraf-Nonius **1992** *CAD-4 EXPRESS*: Delft, the Nederlands.

Evrard, G. Radiocristallographie; Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, 2000-2001.

Falgueyret, J. P.; Denis, D.; Macdonald, D.; Hutchinson, J. H.; Riendeau, D. Characterization of the arachidonate and ATP binding sites of human 5- lipoxygenase using photoaffinity labeling and enzyme immobilization. *Biochemistry* **1995***, 34*, 13603-13611.

Falgueyret, J. P.; Hutchinson, J. H.; Riendeau, D. Criteria for the identification of non-redox inhibitors of 5- lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* **1993***, 45*, 978-981.

Fiorucci, S.; Meli, R.; Bucci, M.; Cirino, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy?(1). *Biochem Pharmacol* **2001***, 62*, 1433-1438.

Fischer, L.; Steinhilber, D.; Werz, O. Molecular pharmacological profile of the nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor CJ-13,610. *Br J Pharmacol* **2004***, 142*, 861-868.

Ford-Hutchinson, A. W.; Gresser, M.; Young, R. N. 5-Lipoxygenase. *Annu Rev Biochem* **1994***, 63*, 383-417.

Fosslien, E. Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. *Ann Clin Lab Sci* **1998***, 28*, 67-81.

Fu, J. Y.; Masferrer, J. L.; Seibert, K.; Raz, A.; Needleman, P. The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* **1990***, 265*, 16737-16740.

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

Funk, C. D.; Chen, X. S.; Johnson, E. N.; Zhao, L. Lipoxygenase genes and their targeted disruption. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 303-312.

Funk, C. D.; Hoshiko, S.; Matsumoto, T.; Rdmark, O.; Samuelsson, B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989***, 86*, 2587-2591.

Funk, C. D.; Loll, P. J. A molecular dipstick? *Nat Struct Biol* **1997***, 4*, 966-968.

Furstenberger, G.; Marks, F.; Krieg, P. Arachidonate 8(S)-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 235-243.

Gambaro, G. Strategies to safely interfere with prostanoid activity while avoiding adverse renal effects: could COX-2 and COX-LOX dual inhibition be the answer? *Nephrol Dial Transplant* **2002***, 17*, 1159-1162.

Gan, Q. F.; Browner, M. F.; Sloane, D. L.; Sigal, E. Defining the arachidonic acid binding site of human 15-lipoxygenase. Molecular modeling and mutagenesis. *J Biol Chem* **1996***, 271*, 25412-25418.

Garavito, R. M. The cyclooxygenase-2 structure: new drugs for an old target? *Nat Struct Biol* **1996***, 3*, 897-901.

Garavito, R. M.; Malkowski, M. G.; DeWitt, D. L. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 129-152.

Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Hauser, S. D.; Rangwala, S. H.; Koboldt, C. M.; Seibert, K. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* **1996***, 271*, 15810-15814.

Gillmor, S. A.; Villasenor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E.; Browner, M. F. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* **1997***, 4*, 1003-1009.

Gilroy, D. W.; Tomlinson, A.; Willoughby, D. A. Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *Eur J Pharmacol* **1998***, 355*, 211-217.

Godzik, A. Fold recognition methods. *Structural Bioinformatics*; Wiley-Liss: Hoboken, New Jersey, **2003**; pp 525-546.

Goldenberg, M. M. Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Ther* **1999***, 21*, 1497-1513.

Goodford, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem* **1985**, *28*, 849-857.

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

Grechkin, A. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* **1998***, 37*, 317-352.

Griswold, D. E.; Adams, J. L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX- 2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev* **1996***, 16*, 181-206.

Guner, O. F. Pharmacophore perception, development, and use in drug design. In *IUL Biotechnology*; International University Line: La Jolla, CA., **2000**; pp 537.

Haeggstrom, J. Z.; Wetterholm, A. Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. *Cell Mol Life Sci* **2002***, 59*, 742-753.

Hamberg, M.; Samuelsson, B. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J Biol Chem* **1967***, 242*, 5329-5335.

Hamel, P.; Riendeau, D.; Brideau, C.; Chan, C. C.; Desmarais, S.; Delorme, D.; Dube, D.; Ducharme, Y.; Ethier, D.; Grimm, E.; Falgueyret, J. P.; Guay, J.; Jones, T. R.; Kwong, E.; McAuliffe, M.; McFarlane, C. S.; Piechuta, H.; Roumi, M.; Tagari, P.; Young, R. N.; Girard, Y. Substituted (pyridylmethoxy)naphthalenes as potent and orally active 5-lipoxygenase inhibitors; synthesis, biological profile, and pharmacokinetics of L-739,010. *J Med Chem* **1997***, 40*, 2866-2875.

Hammarberg, T.; Provost, P.; Persson, B.; Radmark, O. The N-terminal domain of 5-lipoxygenase binds calcium and mediates calcium stimulation of enzyme activity. *J Biol Chem* **2000***, 275*, 38787-38793.

Hammarberg, T.; Radmark, O. 5-lipoxygenase binds calcium. *Biochemistry* **1999***, 38*, 4441-4447.

Hammarberg, T.; Zhang, Y. Y.; Lind, B.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Mutations at the C-terminal isoleucine and other potential iron ligands of 5-lipoxygenase. *Eur J Biochem* **1995***, 230*, 401-407.

Hammond, M. L.; Kopka, I. E.; Zambias, R. A.; Caldwell, C. G.; Boger, J.; Baker, F.; Bach, T.; Luell, S.; MacIntyre, D. E. 2,3-Dihydro-5-benzofuranols as antioxidant-based inhibitors of leukotriene biosynthesis. *J Med Chem* **1989***, 32*, 1006-1020.

Hay, D. W.; Torphy, T. J.; Undem, B. J. Cysteinyl leukotrienes in asthma: old mediators up to new tricks. *Trends Pharmacol Sci* **1995***, 16*, 304-309.

Hegg, E. L.; Que, L., Jr. The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur J Biochem* **1997***, 250*, 625-629.

Henikoff, S.; Henikoff, J. G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992***, 89*, 10915-10919.

Hogaboom, G. K.; Cook, M.; Newton, J. F.; Varrichio, A.; Shorr, R. G.; Sarau, H. M.; Crooke, S. T. Purification, characterization, and structural properties of a single protein from rat basophilic leukemia (RBL-1) cells possessing 5- lipoxygenase and leukotriene A4 synthetase activities. *Mol Pharmacol* **1986***, 30*, 510-519.

Hoshiko, S.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990***, 87*, 9073-9077.

Hutchinson, J. H.; Charleson, S.; Evans, J. F.; Falgueyret, J. P.; Hoogsteen, K.; Jones, T. R.; Kargman, S.; Macdonald, D.; McFarlane, C. S.; Nicholson, D. W.; Piechuta, H.; Riendeau, D.; Scheigetz, J.; Thérien, M.; Girard, Y. Thiopyranol[2,3,4-c,d]indoles as inhibitors of 5-lipoxygenase, 5- lipoxygenase-activating protein, and leukotriene C4 synthase. *J Med Chem* **1995***, 38*, 4538-4547.

Hutchinson, J. H.; Riendeau, D.; Brideau, C.; Chan, C.; Delorme, D.; Denis, D.; Falgueyret, J. P.; Fortin, R.; Guay, J.; Hamel, P.; Jones, T. R.; Macdonald, D.; McFarlane, C. S.; Piechuta, H.; Scheigetz, J.; Tagari, P.; Thérien, M.; Girard, Y. Substituted thiopyrano[2,3,4-c,d]indoles as potent, selective, and orally active inhibitors of 5-lipoxygenase. Synthesis and biological evaluation of L-691,816. *J Med Chem* **1993***, 36*, 2771-2787.

Hutchinson, J. H.; Riendeau, D.; Brideau, C.; Chan, C.; Falgueyret, J. P.; Guay, J.; Jones, T. R.; Lepine, C.; Macdonald, D.; McFarlane, C. S.; Piechuta, H.; Scheigetz, J.; Tagari, P.; Thérien, M.; Girard, Y. Thiopyrano[2,3,4-cd]indoles as 5-lipoxygenase inhibitors:

synthesis, biological profile, and resolution of 2-[2-[1-(4-chlorobenzyl)-4-methyl- 6-[(5-phenylpyridin-2-yl)methoxy]-4,5 -dihydro-1H-thiopyrano[2,3,4- cd]indol-2-yl]ethoxy]butanoic acid. *J Med Chem* **1994***, 37*, 1153-1164.

Hyams, D. **2001** *CurveExpert, A curve fitting system for Windows*; 1.37 ed.; Microsoft Corporation.

Ikawa, H.; Kamitani, H.; Calvo, B. F.; Foley, J. F.; Eling, T. E. Expression of 15-lipoxygenase-1 in human colorectal cancer. *Cancer Res* **1999***, 59*, 360-366.

Inagaki, M.; Tsuri, T.; Jyoyama, H.; Ono, T.; Yamada, K.; Kobayashi, M.; Hori, Y.; Arimura, A.; Yasui, K.; Ohno, K.; Kakudo, S.; Koizumi, K.; Suzuki, R.; Kawai, S.; Kato, M.; Matsumoto, S. Novel antiarthritic agents with 1,2-isothiazolidine-1,1-dioxide (gamma-sultam) skeleton: cytokine suppressive dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *J Med Chem* **2000***, 43*, 2040-2048.

Ishii, S.; Noguchi, M.; Miyano, M.; Matsumoto, T.; Noma, M. Mutagenesis studies on the amino acid residues involved in the iron- binding and the activity of human 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **1992***, 184*, 1133-1134.

Janusz, J. M.; Young, P. A.; Ridgeway, J. M.; Scherz, M. W.; Enzweiler, K.; Wu, L. I.; Gan, L.; Chen, J.; Kellstein, D. E.; Green, S. A.; Tulich, J. L.; Rosario-Jansen, T.; Magrisso, I. J.; Wehmeyer, K. R.; Kuhlenbeck, D. L.; Eichhold, T. H.; Dobson, R. L. New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 3. 7-tert-butyl-2, 3- dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: variations at the 5 position. *J Med Chem* **1998a***, 41*, 3515-3529.

Janusz, J. M.; Young, P. A.; Ridgeway, J. M.; Scherz, M. W.; Enzweiler, K.; Wu, L. I.; Gan, L.; Darolia, R.; Matthews, R. S.; Hennes, D.; Kellstein, D. E.; Green, S. A.; Tulich, J. L.; Rosario-Jansen, T.; Magrisso, I. J.; Wehmeyer, K. R.; Kuhlenbeck, D. L.; Eichhold, T. H.; Dobson, R. L.; Sirko, S. P.; Farmer, R. W. New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 1. 7-tert-buty1-2,3- dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: discovery and variation of the 5- keto substituent. *J Med Chem* **1998b***, 41*, 1112-1123.

Janusz, J. M.; Young, P. A.; Scherz, M. W.; Enzweiler, K.; Wu, L. I.; Gan, L.; Pikul, S.; McDow-Dunham, K. L.; Johnson, C. R.; Senanayake, C. B.; Kellstein, D. E.; Green, S. A.; Tulich, J. L.; Rosario-Jansen, T.; Magrisso, I. J.; Wehmeyer, K. R.; Kuhlenbeck, D. L.; Eichhold, T. H.; Dobson, R. L. New cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitors. 2. 7-tert-butyl-2,3- dihydro-3,3-dimethylbenzofuran derivatives as gastrointestinal safe antiinflammatory and analgesic agents: variations of the dihydrobenzofuran ring. *J Med Chem* **1998c***, 41*, 1124-1137.

Jisaka, M.; Iwanaga, C.; Takahashi, N.; Goto, T.; Kawada, T.; Yamamoto, T.; Ikeda, I.; Nishimura, K.; Nagaya, T.; Fushiki, T.; Yokota, K. Double dioxygenation by mouse 8S-lipoxygenase: Specific formation of a potent peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist. *Biochem Biophys Res Commun* **2005***, 338*, 136-143.

Jones, G.; Willett, P.; Glen, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* **1995***, 245*, 43-53.

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.

Jones, S. M.; Luo, M.; Healy, A. M.; Peters-Golden, M.; Brock, T. G. Structural and functional criteria reveal a new nuclear import sequence on the 5-lipoxygenase protein. *J Biol Chem* **2002***, 277*, 38550-38556.

Jones, S. M.; Luo, M.; Peters-Golden, M.; Brock, T. G. Identification of two novel nuclear import sequences on the 5- lipoxygenase protein. *J Biol Chem* **2003***, 278*, 10257-10263.

Julemont, F.; Dogne, J. M.; Laeckmann, D.; Pirotte, B.; de Leval, X. Recent developments in 5-lipoxygenase inhibitors. *Expert Opin. Ther. Patents* **2003***, 13*, 1-13.

Kalgutkar, A. S.; Crews, B. C.; Rowlinson, S. W.; Garner, C.; Seibert, K.; Marnett, L. J. Aspirin-like molecules that covalently inactivate cyclooxygenase-2. *Science* **1998***, 280*, 1268-1270.

Kargman, S.; Vickers, P. J.; Evans, J. F. A23187-induced translocation of 5-lipoxygenase in osteosarcoma cells. *J Cell Biol* **1992***, 119*, 1701-1709.

Katori, M.; Majima, M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* **2000***, 49*, 367-392.

Kawai, N.; Tsujii, M.; Tsuji, S. Cyclooxygenases and colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 187-196.

Kiefer, J. R.; Pawlitz, J. L.; Moreland, K. T.; Stegeman, R. A.; Hood, W. F.; Gierse, J. K.; Stevens, A. M.; Goodwin, D. C.; Rowlinson, S. W.; Marnett, L. J.; Stallings, W. C.; Kurumbail, R. G. Structural insights into the stereochemistry of the cyclooxygenase reaction. *Nature* **2000***, 405*, 97-101.

Kirchner, T.; Argentieri, D. C.; Barbone, A. G.; Singer, M.; Steber, M.; Ansell, J.; Beers, S. A.; Wachter, M. P.; Wu, W.; Malloy, E.; Stewart, A.; Ritchie, D. M. Evaluation of the antiinflammatory activity of a dual cyclooxygenase-2 selective/5-lipoxygenase

inhibitor, RWJ 63556, in a canine model of inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* **1997***, 282*, 1094-1101.

Kolasa, T.; Brooks, C. D.; Rodriques, K. E.; Summers, J. B.; Dellaria, J. F.; Hulkower, K. I.; Bouska, J.; Bell, R. L.; Carter, G. W. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as scaffolds for the design of 5- lipoxygenase inhibitors. *J Med Chem* **1997***, 40*, 819-824.

Kontogiorgis, C. A.; Hadjipavlou-Litina, D. J. Non steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. *Curr Med Chem* **2002***, 9*, 89-98.

Kozak, K. R.; Prusakiewicz, J. J.; Rowlinson, S. W.; Schneider, C.; Marnett, L. J. Amino acid determinants in cyclooxygenase-2 oxygenation of the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol. *J Biol Chem* **2001***, 276*, 30072-30077.

Krieger, E.; Nabuurs, S. B.; Vriend, G. Homology modeling. *Structural Bioinformatics*; Wiley-Liss: Hoboken, New Jersey, **2003**; pp 509-523.

Kuhn, H. Structural basis for the positional specificity of lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2000***, 62*, 255-270.

Kuhn, H. Biologic relevance of lipoxygenase isoforms in atherogenesis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **2005***, 3*, 1099-1110.

Kuhn, H.; Thiele, B. J. Arachidonate 15-lipoxygenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995***, 12*, 157-170.

Kuhn, H.; Thiele, B. J. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* **1999***, 449*, 7-11.

Kuhn, H.; Walther, M.; Kuban, R. J. Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 263-290.

Kulkarni, S.; Das, S.; Funk, C. D.; Murray, D.; Cho, W. Molecular basis of the specific subcellular localization of the C2-like domain of 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* **2002***, 277*, 13167-13174.

Kurogi, Y.; Guner, O. F. Pharmacophore modeling and three-dimensional database searching for drug design using catalyst. *Curr Med Chem* **2001***, 8*, 1035-1055.

Kurumbail, R. G.; Kiefer, J. R.; Marnett, L. J. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Curr Opin Struct Biol* **2001***, 11*, 752-760.

Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y.; Gildehaus, D.; Miyashiro, J. M.; Penning, T. D.; Seibert, K.; Isakson, P. C.; Stallings,

W. C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **1996***, 384*, 644-648.

Laine, L. Gastrointestinal safety of coxibs and outcomes studies: what's the verdict? *J Pain Symptom Manage* **2002***, 23*, S5-10; discussion S11-14.

Lambert, C.; Leonard, N.; De Bolle, X.; Depiereux, E. ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* **2002***, 18*, 1250-1256.

Laneuville, O.; Breuer, D. K.; Xu, N.; Huang, Z. H.; Gage, D. A.; Watson, J. T.; Lagarde, M.; DeWitt, D. L.; Smith, W. L. Fatty acid substrate specificities of human prostaglandin-endoperoxide H synthase-1 and -2. Formation of 12-hydroxy-(9Z, 13E/Z, 15Z)-octadecatrienoic acids from alpha-linolenic acid. *J Biol Chem* **1995***, 270*, 19330-19336.

Langer, T.; Hoffmann, R. D. Virtual screening: an effective tool for lead structure discovery? *Curr Pharm Des* **2001***, 7*, 509-527.

Laskowski, R. A. Procheck : a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **1993***, 26*, 283-291.

Laufer, S. Discovery and development of ML3000. *Inflammopharmacology* **2001***, 9*, 101-112.

Laufer, S. A.; Augustin, J.; Dannhardt, G.; Kiefer, W. (6,7-Diaryldihydropyrrolizin-5-yl)acetic acids, a novel class of potent dual inhibitors of both cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J Med Chem* **1994***, 37*, 1894-1897.

Leach, A. *"Molecular Modelling", Principles and applications*; Longman Singapore publishers (Pte) Ltd: Singapore, **1996**.

Lewis, R. A.; Austen, K. F.; Soberman, R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* **1990***, 323*, 645-655.

Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001***, 46*, 3-26.

Loll, P. J.; Picot, D.; Garavito, R. M. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* **1995***, 2*, 637-643.

Luong, C.; Miller, A.; Barnett, J.; Chow, J.; Ramesha, C.; Browner, M. F. Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* **1996***, 3*, 927-933.

Lutteke, T.; Krieg, P.; Furstenberger, G.; von der Lieth, C. W. LOX-DB-- database on lipoxygenases. *Bioinformatics* **2003***, 19*, 2482-2483.

Malkowski, M. G.; Thuresson, E. D.; Lakkides, K. M.; Rieke, C. J.; Micielli, R.; Smith, W. L.; Garavito, R. M. Structure of eicosapentaenoic and linoleic acids in the cyclooxygenase site of prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol Chem* **2001***, 276*, 37547-37555.

Mamas, S. Prostaglandines et thromboxanes: Paris, **1997**.

Mancini, J. A.; Riendeau, D.; Falgueyret, J. P.; Vickers, P. J.; O'Neill, G. P. Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J Biol Chem* **1995***, 270*, 29372-29377.

Mano, T.; Okumura, Y.; Sakakibara, M.; Okumura, T.; Tamura, T.; Miyamoto, K.; Stevens, R. W. 4-[5-Fluoro-3-[4-(2-methyl-1H-imidazol-1-yl)benzyloxy]phenyl]-3,4,5,6- tetrahydro-2H-pyran-4-carboxamide, an Orally Active Inhibitor of 5-Lipoxygenase with Improved Pharmacokinetic and Toxicology Characteristics. *J Med Chem* **2004***, 47*, 720-725.

Mano, T.; Stevens, R. W.; Ando, K.; Kawai, M.; Kawamura, K.; Nakao, K.; Okumura, Y.; Okumura, T.; Sakakibara, M.; Miyamoto, K.; Tamura, T. Optimization of imidazole 5-lipoxygenase inhibitors and selection and synthesis of a development candidate. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **2005***, 53*, 965-973.

Mano, T.; Stevens, R. W.; Ando, K.; Nakao, K.; Okumura, Y.; Sakakibara, M.; Okumura, T.; Tamura, T.; Miyamoto, K. Novel imidazole compounds as a new series of potent, orally active inhibitors of 5-lipoxygenase. *Bioorg Med Chem* **2003***, 11*, 3879-3887.

Marnett, L. J. Cyclooxygenase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* **2000***, 4*, 545-552.

Marnett, L. J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002a***, 68-69*, 153-164.

Marnett, L. J.; DuBois, R. N. COX-2: a target for colon cancer prevention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2002b***, 42*, 55-80.

Marnett, L. J.; Kalgutkar, A. S. Design of selective inhibitors of cyclooxygenase-2 as nonulcerogenic anti-inflammatory agents. *Curr Opin Chem Biol* **1998***, 2*, 482-490.

Martin, A. C.; MacArthur, M. W.; Thornton, J. M. Assessment of comparative modeling in CASP2. *Proteins* **1997***, Suppl*, 14-28.

McAdam, B. F.; Catella-Lawson, F.; Mardini, I. A.; Kapoor, S.; Lawson, J. A.; FitzGerald, G. A. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human

pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999***, 96*, 272-277.

McMillan, R. M.; Walker, E. R. Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **1992***, 13*, 323-330.

Mehrabian, M.; Allayee, H. 5-lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **2003***, 14*, 447-457.

Michaux, C. Elaboration d'un modèle de pharmacophore et d'interactions d'inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase-2: identification et conception de molécules originales, *Thèse de doctorat*, FUNDP, Namur **2004a**, pp 345.

Michaux, C.; Charlier, C. Structural approach for COX-2 inhibition. *Mini Rev Med Chem* **2004b***, 4*, 603-615.

Miller, D. K.; Gillard, J. W.; Vickers, P. J.; Sadowski, S.; Leveille, C.; Mancini, J. A.; Charleson, P.; Dixon, R. A.; Ford-Hutchinson, A. W.; Fortin, R.; et al. Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. *Nature* **1990***, 343*, 278-281.

Minor, W.; Steczko, J.; Stec, B.; Otwinowski, Z.; Bolin, J. T.; Walter, R.; Axelrod, B. Crystal structure of soybean lipoxygenase L-1 at 1.4 A resolution. *Biochemistry* **1996***, 35*, 10687-10701.

Moore, B. C.; Simmons, D. L. COX-2 inhibition, apoptosis, and chemoprevention by nonsteroidal anti- inflammatory drugs. *Curr Med Chem* **2000***, 7*, 1131-1144.

Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 165-175.

Morita, I.; Schindler, M.; Regier, M. K.; Otto, J. C.; Hori, T.; DeWitt, D. L.; Smith, W. L. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* **1995***, 270*, 10902-10908.

Mornin, Y.; Gillot, C. *Larousse Médical*; Larousse ed.: Paris, **1995**; 1204 pp.

Moro, S.; Braiuca, P.; Deflorian, F.; Ferrari, C.; Pastorin, G.; Cacciari, B.; Baraldi, P. G.; Varani, K.; Borea, P. A.; Spalluto, G. Combined target-based and ligand-based drug design approach as a tool to define a novel 3D-pharmacophore model of human A3 adenosine receptor antagonists: pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as a key study. *J Med Chem* **2005***, 48*, 152-162.

Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* **1998***, 19*, 1639-1662.

Mukherjee, D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol* **2002***, 63*, 817-821.

Muri, E. M.; Nieto, M. J.; Sindelar, R. D.; Williamson, J. S. Hydroxamic acids as pharmacological agents. *Curr Med Chem* **2002***, 9*, 1631-1653.

Musser, J. H.; Kreft, A. F. 5-lipoxygenase: properties, pharmacology, and the quinolinyl(bridged)aryl class of inhibitors. *J Med Chem* **1992***, 35*, 2501-2524.

Nguyen, T.; Falgueyret, J. P.; Abramovitz, M.; Riendeau, D. Evaluation of the role of conserved His and Met residues among lipoxygenases by site-directed mutagenesis of recombinant human 5- lipoxygenase. *J Biol Chem* **1991***, 266*, 22057-22062.

O'Banion, M. K.; Sadowski, H. B.; Winn, V.; Young, D. A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* **1991***, 266*, 23261-23267.

Okamoto, H.; Hammarberg, T.; Zhang, Y. Y.; Persson, B.; Watanabe, T.; Samuelsson, B.; Radmark, O. Mutation analysis of the human 5-lipoxygenase C-terminus: Support for a stabilizing C-terminal loop. *Biochim Biophys Acta* **2005***, 1749*, 123-131.

Oliw, E. H. Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 313-323.

Pace-Asciak, C. R.; Reynaud, D.; Demin, P. Mechanistic aspects of hepoxilin biosynthesis. *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995***, 12*, 307-311.

Parente, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? *J Rheumatol* **2001***, 28*, 2375-2382.

Parente, L.; Perretti, M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol* **2003***, 65*, 153-159.

Percival, D. Human 5-lipoxygenase contains an essential iron. *J Biol Chem* **1991***, 266*, 10058-10061.

Peters-Golden, M. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* **1998***, 157*, S227-232.

Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **1994***, 367*, 243-249.

Pommery, N.; Taverne, T.; Telliez, A.; Goossens, L.; Charlier, C.; Pommery, J.; Goossens, J. F.; Houssin, R.; Durant, F.; Henichart, J. P. New COX-2/5-LOX inhibitors: apoptosis-inducing agents potentially useful in prostate cancer chemotherapy. *J Med Chem* **2004***, 47*, 6195-6206.

Porta, H.; Rocha-Sosa, M. Lipoxygenase in bacteria: a horizontal transfer event? *Microbiology* **2001***, 147*, 3199-3200.

Porta, H.; Rocha-Sosa, M. Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol* **2002***, 130*, 15-21.

Prigge, S. T.; Boyington, J. C.; Faig, M.; Doctor, K. S.; Gaffney, B. J.; Amzel, L. M. Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* **1997***, 79*, 629-636.

Prigge, S. T.; Gaffney, B. J.; Amzel, L. M. Relation between positional specificity and chirality in mammalian lipoxygenases. *Nat Struct Biol* **1998***, 5*, 178-179.

Radmark, O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995***, 12*, 171-184.

Radmark, O. P. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. *Am J Respir Crit Care Med* **2000***, 161*, S11-15.

Ricchi, P.; Zarrilli, R.; Di Palma, A.; Acquaviva, A. M. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer* **2003***, 88*, 803-807.

Riendeau, D.; Falgueyret, J. P.; Nathaniel, D. J.; Rokach, J.; Ueda, N.; Yamamoto, S. Sensitivity of immunoaffinity-purified porcine 5-lipoxygenase to inhibitors and activating lipid hydroperoxides. *Biochem Pharmacol* **1989***, 38*, 2313-2321.

Riendeau, D.; Percival, M. D.; Brideau, C.; Charleson, S.; Dube, D.; Ethier, D.; Falgueyret, J. P.; Friesen, R. W.; Gordon, R.; Greig, G.; Guay, J.; Mancinin, J.; Ouellet, M.; Wong, E.; Xu, L.; Boyce, S.; Visco, D.; Girard, Y.; Prasit, P.; Zamboni, R.; Rodger, I. W.; Gresser, M.; Ford-Hutchinson, A. W.; Young, R. N.; Chan, C. C. Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* **2001**, *296*, 558-566.

Rioux, N.; Castonguay, A. Inhibitors of lipoxygenase: a new class of cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis* **1998***, 19*, 1393-1400.

Rishton, G. M. Reactive compounds and in vitro false positives in HTS. *Drug Discov Today* **1997***, 2*, 382-384.

Romano, M.; Claria, J. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *FASEB J* **2003**, *17*, 1986-1985.

Rome, L. H.; Lands, W. E. Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1975**, *72*, 4863-4865.

Rouzer, C. A.; Matsumoto, T.; Samuelsson, B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 857-861.

Rouzer, C. A.; Samuelsson, B. Reversible, calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5- lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 7393-7397.

Rowlinson, S. W.; Kiefer, J. R.; Prusakiewicz, J. J.; Pawlitz, J. L.; Kozak, K. R.; Kalgutkar, A. S.; Stallings, W. C.; Kurumbail, R. G.; Marnett, L. J. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 45763-45769.

Samuelsson, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* **1983**, *220*, 568-575.

Samuelsson, B.; Dahlen, S. E.; Lindgren, J. A.; Rouzer, C. A.; Serhan, C. N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **1987**, *237*, 1171-1176.

Samuelsson, B.; Funk, C. D. Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 19469-19472.

Sarkis, A.; Lopez, B.; Roman, R. J. Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **2004a**, *13*, 205-214.

Sarkis, A.; Roman, R. J. Role of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in hypertension. *Curr Drug Metab* **2004b**, *5*, 245-256.

Schneider, C.; Brash, A. R. Lipoxygenase-catalyzed formation of R-configuration hydroperoxides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002a**, *68-69*, 291-301.

Schneider, G.; Bohm, H. J. Virtual screening and fast automated docking methods. *Drug Discov Today* **2002b**, *7*, 64-70.

Schwarz, K.; Gerth, C.; Anton, M.; Kuhn, H. Alterations in leukotriene synthase activity of the human 5- lipoxygenase by site-directed mutagenesis affecting its positional specificity. *Biochemistry* **2000***, 39*, 14515-14521.

Schwarz, K.; Walther, M.; Anton, M.; Gerth, C.; Feussner, I.; Kuhn, H. Structural basis for lipoxygenase specificity. Conversion of the human leukocyte 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenating enzyme species by site- directed mutagenesis. *J Biol Chem* **2001***, 276*, 773-779.

Secko, D. Can NSAIDs contribute to Alzheimer's disease? *Cmaj* **2005***, 172*, 1677.

Serhan, C. N.; Romano, M. Lipoxin biosynthesis and actions: role of the human platelet LX-synthase. *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995***, 12*, 293-306.

Sheldrick, G. M. **1997** *SHELXL97. Program for the refinement of crystal structures*: University of Gottïngen, Germany.

Shibata, D.; Axelrod, B. Plant lipoxygenases. *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995***, 12*, 213-228.

Shimizu, T.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984***, 81*, 689-693.

Shureiqi, I.; Lippman, S. M. Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res* **2001***, 61*, 6307-6312.

Sigal, E.; Grunberger, D.; Craik, C. S.; Caughey, G. H.; Nadel, J. A. Arachidonate 15-lipoxygenase (omega-6 lipoxygenase) from human leukocytes. Purification and structural homology to other mammalian lipoxygenases. *J Biol Chem* **1988***, 263*, 5328-5332.

Singh-Ranger, G.; Mokbel, K. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. *Eur J Surg Oncol* **2002***, 28*, 729-737.

Skrzypczak-Jankun, E.; Amzel, L. M.; Kroa, B. A.; Funk, M. O., Jr. Structure of soybean lipoxygenase L3 and a comparison with its L1 isoenzyme. *Proteins* **1997***, 29*, 15-31.

Skrzypczak-Jankun, E.; Borbulevych, O. Y.; Jankun, J.; Selman, S. H.; Zhou, K.; McCabe, N. P. Soybean lipoxygenase-3 in complex with 4-nitrocatechol. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004***, 60*, 613-615.

Skrzypczak-Jankun, E.; Bross, R. A.; Carroll, R. T.; Dunham, W. R.; Funk, M. O., Jr. Three-dimensional structure of a purple lipoxygenase. *J Am Chem Soc* **2001***, 123*, 10814-10820.

Skrzypczak-Jankun, E.; McCabe, N. P.; Selman, S. H.; Jankun, J. Curcumin inhibits lipoxygenase by binding to its central cavity: theoretical and X-ray evidence. *Int J Mol Med* **2000***, 6*, 521-526.

Skrzypczak-Jankun, E.; Zhou, K.; McCabe, N. P.; Selman, S. H.; Jankun, J. Structure of curcumin in complex with lipoxygenase and its significance in cancer. *Int J Mol Med* **2003***, 12*, 17-24.

Sloane, D. L.; Leung, R.; Craik, C. S.; Sigal, E. A primary determinant for lipoxygenase positional specificity. *Nature* **1991***, 354*, 149-152.

Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* **2000***, 69*, 145-182.

Smith, W. L.; Garavito, R. M.; DeWitt, D. L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* **1996***, 271*, 33157-33160.

Smith, W. L.; Marnett, L. J. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* **1991***, 1083*, 1-17.

Smith, W. L.; Song, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 115-128.

Solomon, S. D.; McMurray, J. J.; Pfeffer, M. A.; Wittes, J.; Fowler, R.; Finn, P.; Anderson, W. F.; Zauber, A.; Hawk, E.; Bertagnolli, M. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* **2005***, 352*, 1071-1080.

Spek, A. L. **1997a** *HELENA: a program for data reduction of CAD-4 data*: Utrecht University, Utrecht, The Nederlands.

Spek, A. L. **1997b** *Platon: A multipurpose crystallographic tool*: Utrecht University, Utrecht, The Nederlands.

Steele, V. E.; Holmes, C. A.; Hawk, E. T.; Kopelovich, L.; Lubet, R. A.; Crowell, J. A.; Sigman, C. C.; Kelloff, G. J. Lipoxygenase inhibitors as potential cancer chemopreventives. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1999***, 8*, 467-483.

Steinhilber, D. 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr Med Chem* **1999***, 6*, 71-85.

Su, C.; Oliw, E. H. Manganese lipoxygenase. Purification and characterization. *J Biol Chem* **1998***, 273*, 13072-13079.

Subbaramaiah, K.; Dannenberg, A. J. Cyclooxygenase 2 : a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* **2003***, 24*, 96-102.

Taketo, M. M. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I). *J Natl Cancer Inst* **1998***, 90*, 1529-1536.

Tanabe, T.; Tohnai, N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **2002***, 68-69*, 95-114.

Thuresson, E. D.; Malkowski, M. G.; Lakkides, K. M.; Rieke, C. J.; Mulichak, A. M.; Ginell, S. L.; Garavito, R. M.; Smith, W. L. Mutational and X-ray crystallographic analysis of the interaction of dihomo-gamma -linolenic acid with prostaglandin endoperoxide H synthases. *J Biol Chem* **2001***, 276*, 10358-10365.

Tomchick, D. R.; Phan, P.; Cymborowski, M.; Minor, W.; Holman, T. R. Structural and functional characterization of second-coordination sphere mutants of soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry* **2001***, 40*, 7509-7517.

Van Meerssche, M.; Feneau-Dupont, J. *Introduction à la cristallographie et à la chimie structurale*: Leuven, **1984**.

Vance, R. E.; Hong, S.; Gronert, K.; Serhan, C. N.; Mekalanos, J. J. The opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa carries a secretable arachidonate 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004***, 101*, 2135-2139.

Vane, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **1971***, 231*, 232-235.

Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1998a***, 38*, 97-120.

Vane, J. R.; Botting, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* **1998b***, 104*, 2S-8S; discussion 21S-22S.

Vickers, P. J. 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP). *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995***, 12*, 185-194.

Wallace, J. L. Selective COX-2 inhibitors: is the water becoming muddy? *Trends Pharmacol Sci* **1999***, 20*, 4-6.

Wenzel, S. E. New approaches to anti-inflammatory therapy for asthma. *Am J Med* **1998***, 104*, 287-300.

Wenzel, S. E.; Kamada, A. K. Zileuton: the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Ann Pharmacother* **1996***, 30*, 858-864.

Wermuth, C. G. The practice of medicinal chemistry; Academic Press Inc.: Cambridge, **1996**.

Werz, O.; Burkert, E.; Fischer, L.; Szellas, D.; Dishart, D.; Samuelsson, B.; Radmark, O.; Steinhilber, D. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *Faseb J* **2002a***, 16*, 1441-1443.

Werz, O.; Klemm, J.; Samuelsson, B.; Radmark, O. 5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000***, 97*, 5261-5266.

Werz, O.; Steinhilber, D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors--lessons from cellular enzyme regulation. *Biochem Pharmacol* **2005***, 70*, 327-333.

Werz, O.; Szellas, D.; Steinhilber, D.; Radmark, O. Arachidonic acid promotes phosphorylation of 5-lipoxygenase at Ser-271 by MAPK-activated protein kinase 2 (MK2). *J Biol Chem* **2002b***, 277*, 14793-14800.

Willoughby, D. A.; Moore, A. R.; Colville-Nash, P. R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* **2000***, 355*, 646-648.

Wong, E.; Bayly, C.; Waterman, H. L.; Riendeau, D.; Mancini, J. A. Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His513 --> Arg and Ile523 --> val mutation. *J Biol Chem* **1997***, 272*, 9280-9286.

Woods, J. W.; Coffey, M. J.; Brock, T. G.; Singer, II; Peters-Golden, M. 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J Clin Invest* **1995***, 95*, 2035-2046.

Wouters, J.; Ooms, F. Small molecule crystallography in drug design. *Curr Pharm Des* **2001***, 7*, 529-545.

Xie, W. L.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1991***, 88*, 2692-2696.

Xu, D.; Xu, Y.; Uberbacher, E. C. Computational tools for protein modeling. *Curr Protein Pept Sci* **2000***, 1*, 1-21.

Yamamoto, S.; Katsukawa, M.; Nakano, A.; Hiraki, E.; Nishimura, K.; Jisaka, M.; Yokota, K.; Ueda, N. Arachidonate 12-lipoxygenases with reference to their selective inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **2005***, 16*, 16.

Yoshimoto, T.; Yamamoto, S. Arachidonate 12-lipoxygenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* **1995***, 12*, 195-212.

Young, R. N. Inhibitors of 5-lipoxygenase : a therapeutic potential yet to be fully realized? *Eur J Med Chem* **1999***, 34*, 671-685.

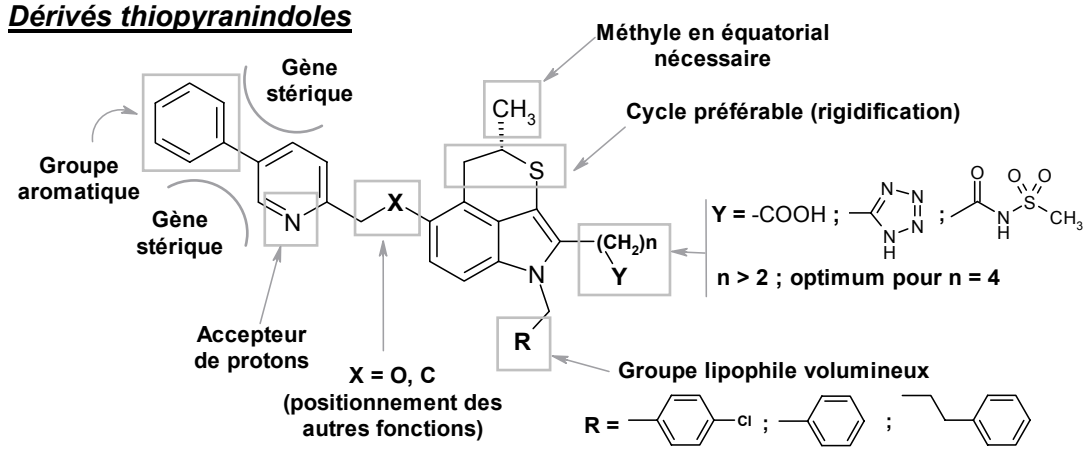
Zhang, Y. Y.; Lind, B.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Iron content of human 5-lipoxygenase, effects of mutations regarding conserved histidine residues. *J Biol Chem* **1993***, 268*, 2535-2541.

Zhang, Y. Y.; Radmark, O.; Samuelsson, B. Mutagenesis of some conserved residues in human 5-lipoxygenase: effects on enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992***, 89*, 485-489.

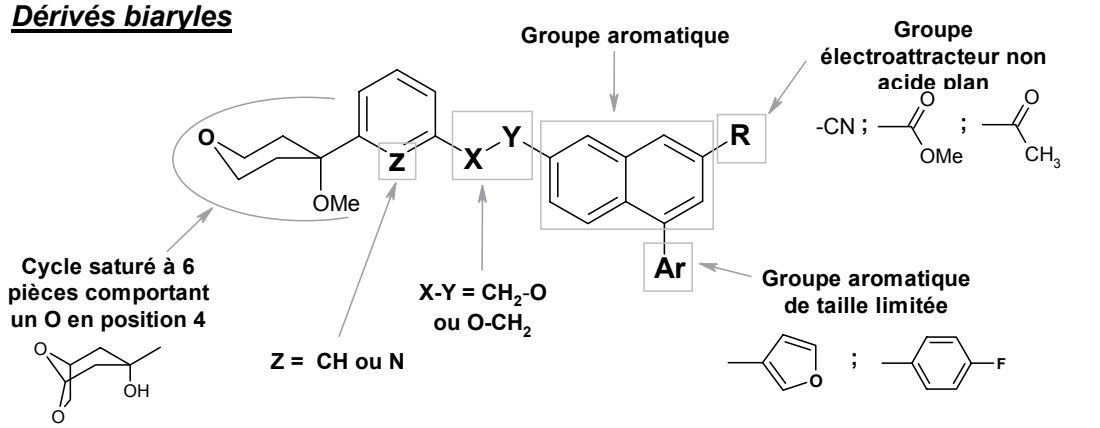
Zingarelli, B.; Cook, J. A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation. *Shock* **2005***, 23*, 393-399.

Données de relations structure-activité

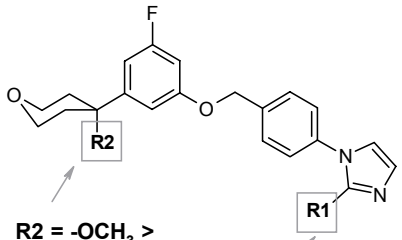
Dérivés thiopyranindoles



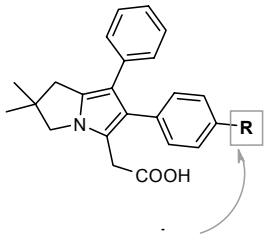
Dérivés biaryles



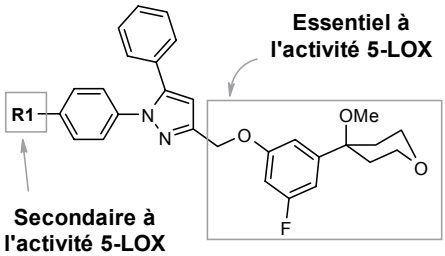
Dérivés imidazoles



Dérivés dihydropyrrolizines

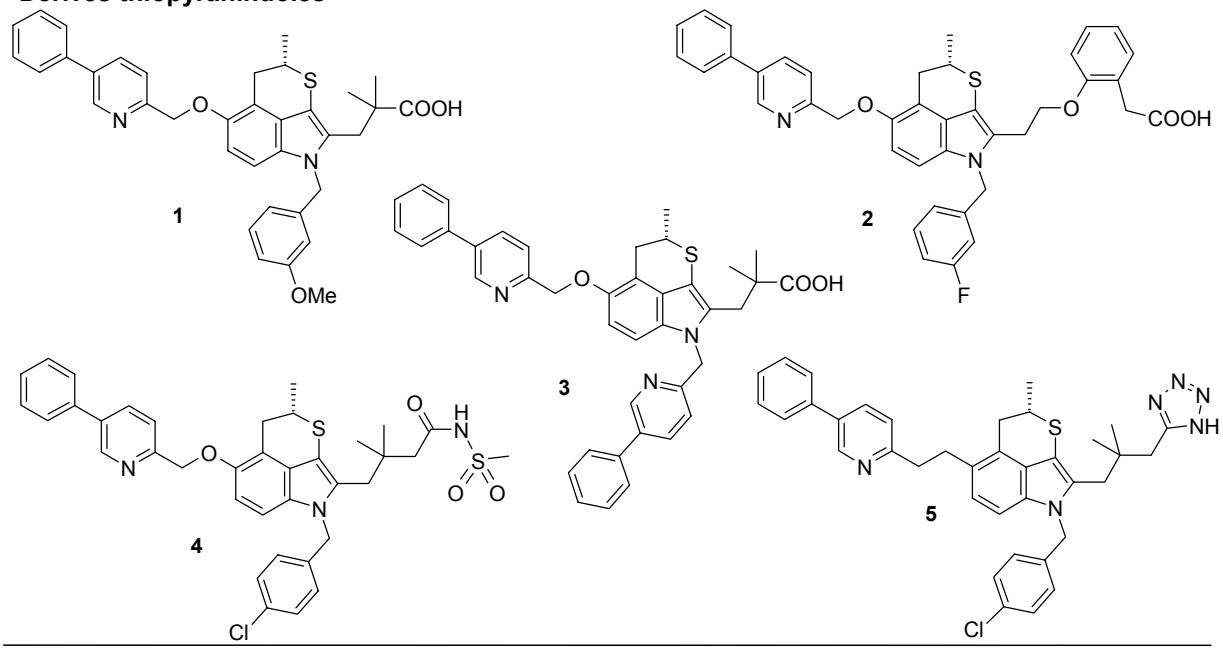


Dérivés pyrazoles

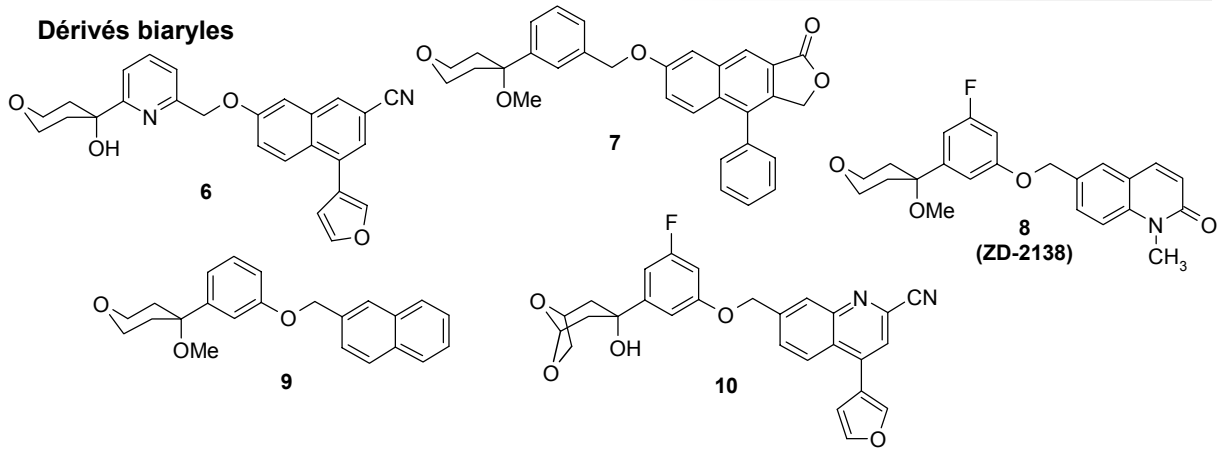


Structure des composés sélectionnés pour l'élaboration du modèle de pharmacophore

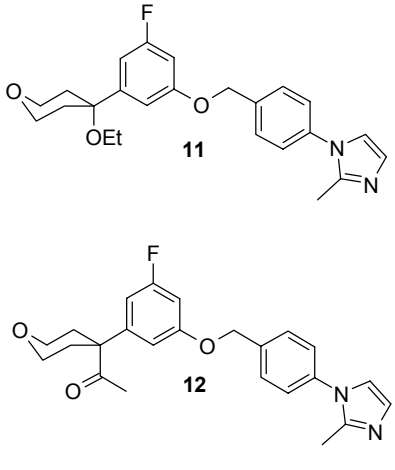
Dérivés thiopyranindoles



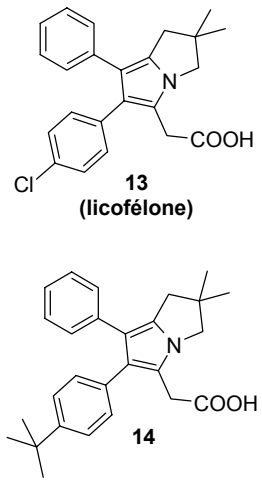
Dérivés biaryles



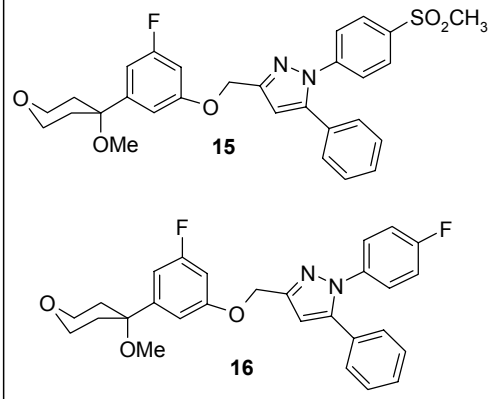
Dérivés imidazoles



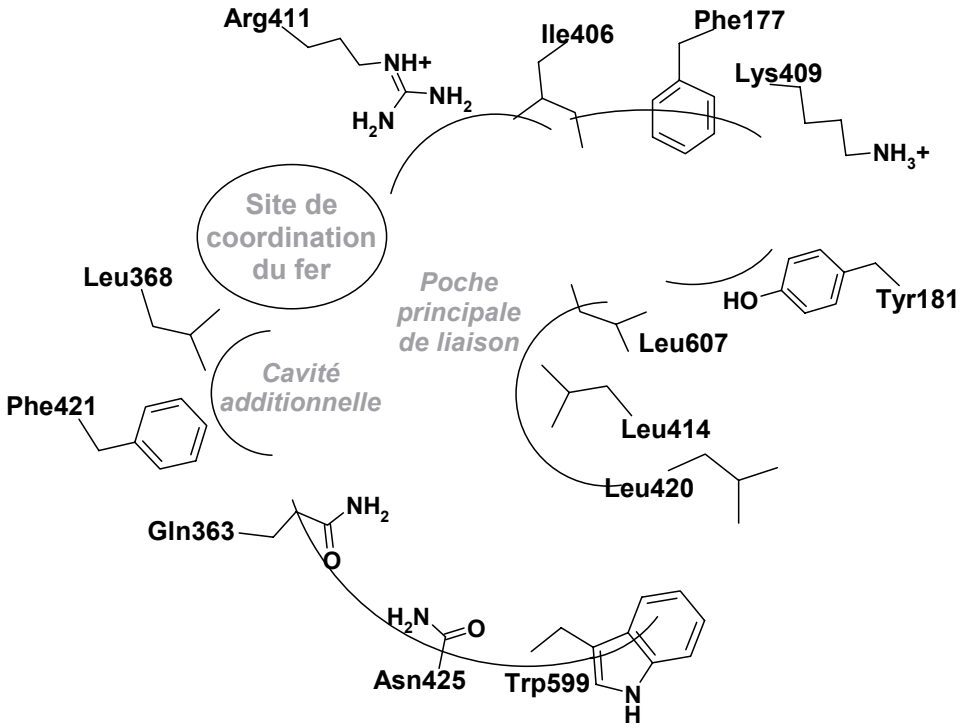
Dérivés dihydropyrrolizines



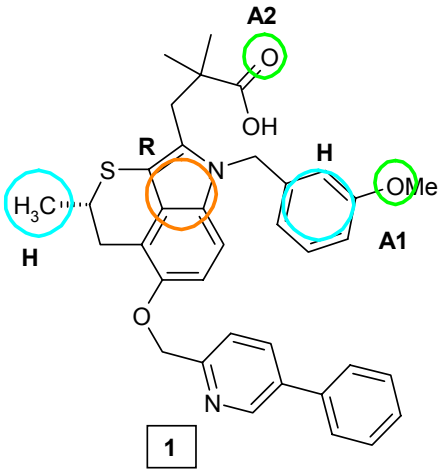
Dérivés pyrazoles



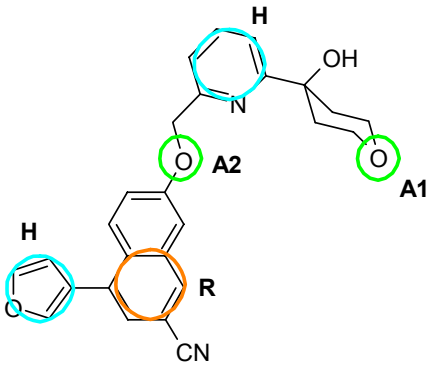
Représentation schématique du site actif 5-LOX



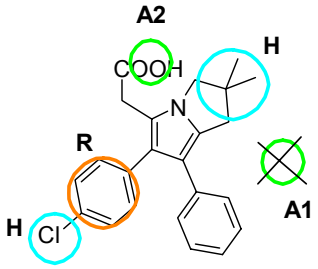
Inhibiteurs sélectionnés pour l'étude du mode d'interaction avec la 5-LOX et superposition des points du deuxième pharmacophore (RAAHH)



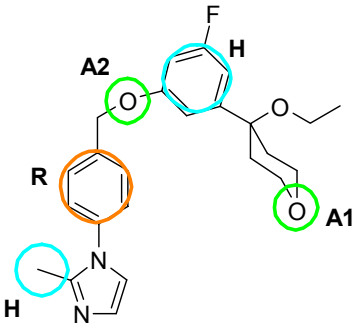
1



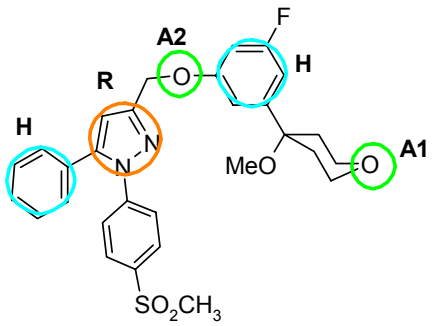
6



13 (licofélone)

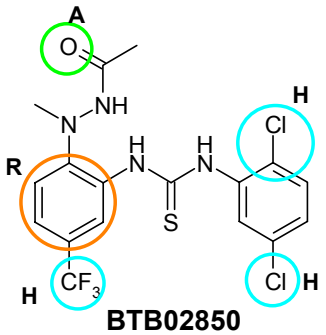


11

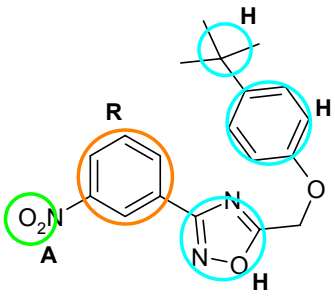


15

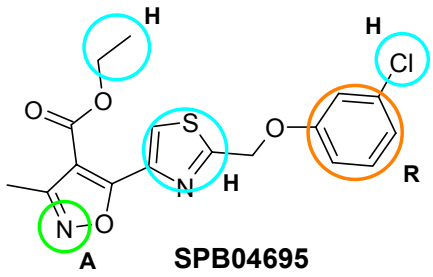
Composés *Maybridge* sélectionnés
à l'aide du premier modèle de pharmacophore (RAHHH)



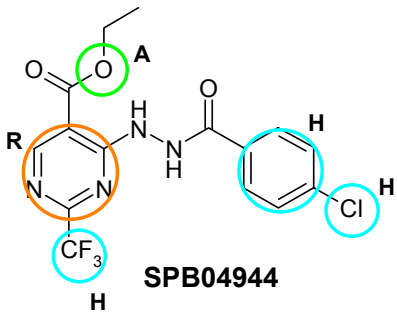
BTB02850



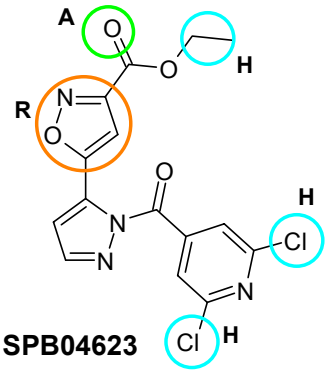
BTB02942



SPB04695

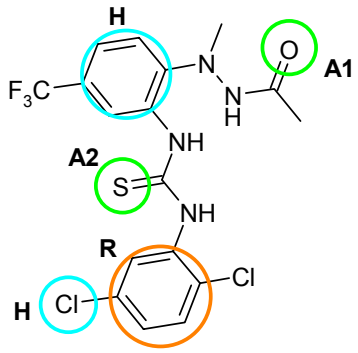


SPB04944

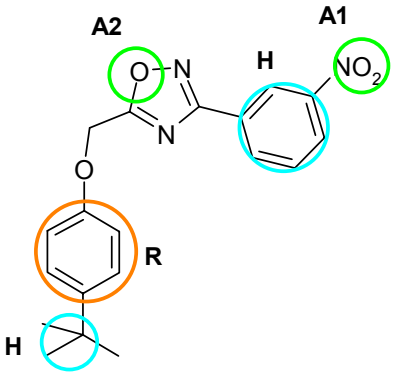


SPB04623

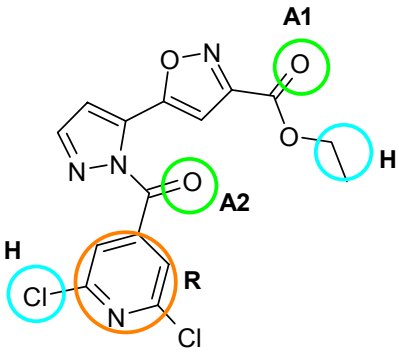
Composés *Maybridge*
reconnus par le deuxième pharmacophore (RAAHH)



BTB02850

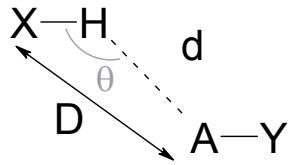


BTB02942



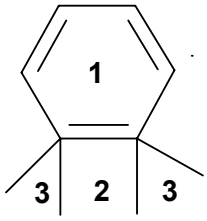
SPB04623

Caractéristiques géométriques des ponts H

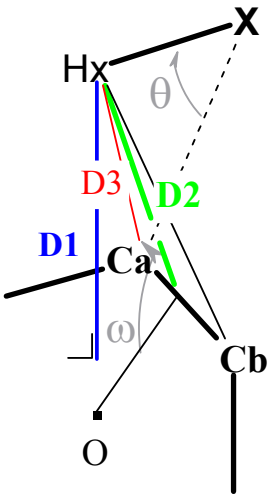


	Très fort	Fort	Faible
D (Å)	2.2-2.5	2.5-3.2	3.0-4.0
d (Å)	1.2-1.5	1.5-2.2	2.0-3.0
θ (°)	175-180	130-180	90-180

Caractéristiques géométriques des interactions CH…π



Région 1 = zone où Hx est juste au-dessus du plan
Régions 2 et 3 = zones où Hx est en-dehors de la région 1 mais peut interagir avec les orbitales p du cycle aromatique



X = C, N, S, O
Hx = hydrogène donneur
O = centre du cycle aromatique.
Ca et **Cb** = le premier et le deuxième carbone sp2, les plus proches de Hx.
ω = l'angle dièdre entre les plans OCaCb et CaHxCb
θ =l'angle Hx – X – Ca.
D1 = distance perpendiculaire entre Hx et le plan du cycle,
D2 = distance Hx – CaCb
D3 = distance Hx – Ca.

Interaction CH…π observée **<u>si</u>**, suivant la zone dans laquelle se trouve Hx :

D1, **D2** ou **D3** < 3.05 Å ; θ < 70° ; -127.5 < ω < 127.5°