

JONATHAN BLANCHET

**MODÉLISATION MOLÉCULAIRE DE LA 17BÊTA-  
HYDROXYSTÉROÏDE DÉSHYDROGÉNASE TYPE 1**  
**Liaison avec plusieurs stéroïdes et comparaison avec les  
résultats cristallographiques**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie  
pour l'obtention du grade de maîtres ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

AOÛT 2004



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*

*ISBN: 0-612-95009-3*

*Our file* *Notre référence*

*ISBN: 0-612-95009-3*

The author has granted a non-exclusive license allowing the Library and Archives Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

## Résumé

La 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase humaine type 1 est une enzyme majeure de la biosynthèse des œstrogènes qui est également impliquée dans le cancer du sein. Des études combinées de sa structure par cristallographie et par modélisation moléculaire ont permis de mieux comprendre son fonctionnement et de faciliter le développement de nouveaux inhibiteurs. Les énergies d'interaction de l'enzyme avec divers stéroïdes ont été calculées par modélisation moléculaire et de nouvelles conformations ont été simulées. Les résultats obtenus expliquent la préférence de l'enzyme pour l'estrone et le mode de liaison alternatif des androgènes. Les profils de translation montrent une similarité dans la façon dont tous les stéroïdes se déplacent dans l'enzyme et la rotation de l'estradiol dans le site actif dévoile un nouveau mode de liaison des stéroïdes. La modélisation concorde avec les données expérimentales publiées et suggère de nouvelles expériences pour une meilleure compréhension des mécanismes de liaison.

## Avant-Propos

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Sheng-Xiang Lin pour m'avoir si chaleureusement accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné un projet original, qui m'a donné le goût de faire des études graduées à une période de ma vie où je songeais à changer de domaine d'études. Grâce à lui, j'ai redécouvert ce qui m'avait tant fasciné en biochimie : le fonctionnement et la chimie des protéines. Je remercie également le Dr Boris Zhorov pour ses conseils, ses encouragements, sa patience et parce que sans lui, mon projet n'aurait jamais pu voir le jour.

Merci à tous les membres et anciens membres du groupe pour leur support et leur aide, que ce soit au labo ou dans l'analyse de mes résultats : Amélie Garneau, Arezki Azzi, Daniel Dubois, Dao Wei Zhu, Gustavo Verdier, Ho Jin Chang, Juliette Aka, Mausumi Mazumdar, Michel Losier, Ming Zhou, Rong Shi, Virginie Nahoum et Wei Qiu. Merci aussi aux autres employés et étudiants du Centre de Recherche avec qui j'ai eu à travailler et à demander conseil, plus particulièrement à Chantal Guillemette, Rock Breton, Line Cantin, Jacqueline Blackburn et Sylvie Méthot.

Un gros merci à ma famille pour leur support, leur attention et leur amour; mes sœur Mélanie et Stéphanie, mon père Jean-Yves, mon beau-père Michel et particulièrement à ma mère Lucie, dont les nombreux sacrifices qu'une mère peut faire pour ses enfants m'ont permis de me rendre aussi loin dans la vie. Merci!

Enfin, merci à tous mes amis pour le bon temps qu'on a eu ensemble pendant nos études (et surtout en dehors des études!), pour les discussions plus ou moins sérieuses ou sans but, pour leurs conseils et pour le support collectif qu'on se donne tous dans les moments plus difficiles, surtout quand les maudites expériences ne marchent pas. Un merci très particulier à ceux qui m'ont souvent reproché (avec humour) que de passer ses journées devant un ordinateur, ce n'était pas travailler. À vous, je présente ici le fruit de ma lâcheté (sans rancune).

*Pour Lucie, ma chère maman*

# Table des matières

Liste des tableaux .....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations .....	ix
<b>1.0 Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Incidence du cancer du sein au Canada en 2003.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rôle des œstrogènes dans la physiologie humaine et dans le cancer du sein.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Formation, fonction et rôle des œstrogènes .....	2
1.2.2 L'estradiol dans le cancer du sein et les traitements anti-tumoraux .....	5
<b>1.3 La 17<math>\beta</math>-HSD1 : rôles, structures et caractéristiques .....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Rôle et expression de la 17 $\beta$ -HSD1 dans le cancer du sein.....	9
1.3.2 Caractéristiques génétiques et structurales de la 17 $\beta$ -HSD1 .....	10
1.3.3 Études de la structure/fonction et de l'inhibition de la 17 $\beta$ -HSD1 .....	13
<b>1.4 Projet de recherche .....</b>	<b>17</b>
<b>2.0 Méthodologies .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Progiciel de modélisation moléculaire ZMM et paramètres de calcul.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Création des modèles de la 17<math>\beta</math>-HSD1 .....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Protocole pour la translation des stéroïdes.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 Rotation de l'estradiol et carte 2D de l'énergie.....</b>	<b>31</b>
<b>3.0 Résultats et discussion.....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Minimisations des complexes enzyme-stéroïde .....</b>	<b>33</b>
3.1.1 Minimisations des modèles de l'estradiol.....	33
3.1.2 Minimisations des complexes avec E1, DHT, DHEA et T .....	38
3.1.3 La formation des liens H dans les modèles.....	39
3.1.4 Préférence de l'enzyme pour l'estrone .....	40
3.1.5 Différences entre la structure cristallographique et les modèles .....	41
<b>3.2 Modèles des stéroïdes liés en mode alternatif.....</b>	<b>43</b>

<b>3.3 Minimisations des modèles de l'estradiol avec les résidus neutres .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 Profils d'énergie de la translation de E2, E1 et DHT .....</b>	<b>49</b>
3.4.1 Observations et comparaisons générales des profils de translation .....	49
3.4.2 Entrée du ligand dans le site actif .....	51
<b>3.5 Rotation de E2 et création des cartes énergiques 2D de la 17<math>\beta</math>-HSD1 .....</b>	<b>54</b>
<b>3.6 Orientations des chaînes latérales pendant la recherche conformationnelle .....</b>	<b>59</b>
3.6.1 Orientations observées dans d'autres structures cristallographiques.....	59
3.6.2 Nouvelles orientations des chaînes latérales.....	59
3.6.3 Conformations et rôles de Glu282 .....	61
<b>Conclusion .....</b>	<b>63</b>
<b>Références .....</b>	<b>67</b>
<b>Annexe I: Autres résultats .....</b>	<b>75</b>
<b>Annexe II: Principes de base en modélisation moléculaire .....</b>	<b>85</b>

## Liste des tableaux

**Tableau 2.1** : Paramètres de contrôle des calculs d'énergie, de la minimisation et du protocole MCM

**Tableau 2.2** : Liste des résidus composant la double-coquille

**Tableau 3.1** : Énergies d'interaction (en kcal·mol<sup>-1</sup>) entre les ligands et le récepteur dans le mode de liaison normal

**Tableau 3.2** : Contribution énergétique (en kcal·mol<sup>-1</sup>) des résidus à l'énergie d'interaction ligand-récepteur pour le mode de liaison normal

**Tableau 3.3** : Énergies d'interaction (en kcal·mol<sup>-1</sup>) entre les ligands et le récepteur dans le mode de liaison alternatif

**Tableau 3.4** : Contribution énergétique (en kcal·mol<sup>-1</sup>) des résidus à l'énergie d'interaction ligand-récepteur pour le mode de liaison alternatif

## Liste des figures

**Figure 1.1:** Illustration montrant les principales voies de la stéroïdogénèse des stéroïdes majeurs avec les principales enzymes impliquées dans chaque processus

**Figure 1.2 :** Structures chimiques du cholestérol et des principaux stéroïdes impliqués dans l'endocrinologie humaine

**Figure 1.3:** Différents modes d'action et de sécrétion des hormones

**Figure 1.4:** Structure tridimensionnelle de la 17 $\beta$ -HSD1

**Figure 1.5:** Liaison en mode alternatif de la testostérone en comparaison à la liaison avec l'estradiol

**Figure 1.6:** Vue en stéréo de la superposition des structures modélisées montrant les modes de liaison de l'estradiol tout au long du site de liaison de la 17 $\beta$ -HSD1

**Figure 2.1:** Structure et résidus du modèle en double-coquille

**Figure 2.2:** Illustration de la contrainte atome-plan pour la translation des stéroïdes

**Figure 2.3:** Contraintes de force permettant la rotation du ligand dans le site de liaison du récepteur

**Figure 3.1:** Déplacements de l'estradiol et des chaînes latérales des acides aminés dans la MCM normale

**Figure 3.2:** Orientations de la chaîne latérale de Glu282

**Figure 3.3:** Comparaison des profils d'énergie de E2, E1 et DHT en fonction de leur position dans le tunnel de liaison

**Figure 3.4:** Déplacements des stéroïdes dans le site de liaison

**Figure 3.5:** Cartes 2D de l'énergie d'interaction (en kcal·mol<sup>-1</sup>) de l'estradiol avec la 17β-HSD1 en fonction des positions de translation et de rotation du ligand dans le site actif

**Figure 3.6:** Cartes des différences (en degrés) entre les angles cibles et les angles réels de la rotation de E2

## Liste des abréviations

17 $\beta$ -HSD1 :	17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1
17 $\beta$ -HSD2 :	17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 2
2D :	Bidimensionnel
3 $\beta$ -diol :	3 $\beta$ ,17 $\beta$ -androstaniol
3D :	Tridimensionnel
4-dione :	Androstènedione
5-diol :	Androstènediol
Å :	Ångström (1 Å = 10 <sup>-10</sup> m en unité SI)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADT :	Androstérone
A-dione :	Androstaniolone
AKR :	<i>Aldo-keto reductase</i> , aldo-céto réductase
Arg, R :	Arginine
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
Asn, N :	Asparagine
Asp, D :	Acide aspartique
C :	Carbone
C18 :	Groupe méthyle en position 18 des stéroïdes
C19 :	Groupe méthyle en position 19 des stéroïdes
Cys, C :	Cystéine
DHEA :	Déhydroépiandrostérone
DHT :	Dihydrotestostérone
E1 (E1-S) :	Estrone (Estrone sulfate)
E2 (E2-S) :	Estradiol (Estradiol sulfate)
Glu, E :	Acide glutamique
Gly, G :	Glycine
H :	Hydrogène
His, H :	Histidine

HSD :	Hydroxystéroïde déshydrogénase
kb :	Kilobase
kcal :	Kilocalorie (1 kcal = 4,1840 kJ en unité SI)
$k_{cat}$ :	Constante de catalyse
kDa :	KiloDalton (1 kDa = $6,022 \times 10^{-20}$ gramme)
Leu, L :	Leucine
Lys, K :	Lysine
MC :	Monte Carlo
MCM :	Monte Carlo avec minimization d'énergie
MEC :	<i>Minimum-energy conformation</i> , conformation d'énergie minimale
Met, M :	Méthionine
N :	Azote
NAD(H) :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP(H) :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O :	Oxygène
P450 :	Cytochrome P450
P450c17 :	17 $\alpha$ -hydroxylase/17,20-lyase
P450c18 :	18-hydroxylase
P450c21 :	21-hydroxylase
P450scc :	<i>Cholesterol side chain cleavage</i> , coupure de la chaîne latérale du cholestérol
pb :	Paire de bases
PDB :	<i>Protein Data Bank</i> , Banque de données de protéines
Ph :	Phényle
Phe :	Phénylalanine
Pro :	Proline
rad :	Radian
RE :	Récepteur des œstrogènes
SDR :	<i>Short-chain dehydrogenases/reductases</i> , déshydrogénases à chaînes courtes
Ser, S :	Sérine
SHBG :	<i>Sex hormone-binding globuline</i> , globuline liant les hormones sexuelles
ST :	Sulfotransférase

T :	Testostérone
TNF- $\alpha$ :	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> , facteur nécrosant de tumeurs alpha
Tyr, Y :	Tyrosine
Val, V :	Valine
VdW :	Van der Waals

# **1.0 Introduction**

## **1.1 Incidence du cancer du sein au Canada en 2003**

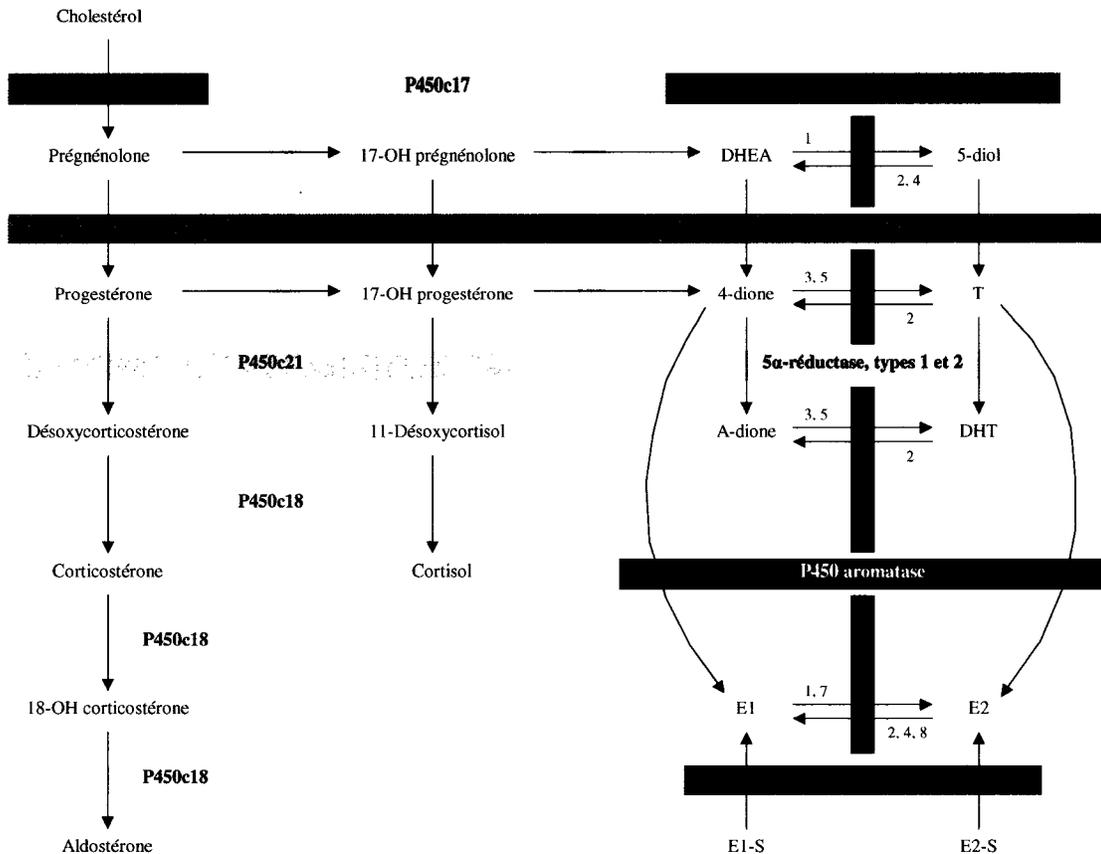
Malgré les progrès des dernières années dans le combat contre le cancer du sein, cette maladie reste toujours la plus souvent diagnostiquée chez les femmes. Selon l'Institut national du cancer du Canada (2003), le cancer du sein est le type de cancer le plus répandu et le deuxième plus meurtrier chez les femmes au Québec et au Canada. On estime que 21200 nouveaux cas, dont 5400 au Québec, auraient été diagnostiqués en 2003, alors que 5300 femmes au pays, dont 1450 dans la province, devraient en mourir au cours de cette même année. La plupart des femmes atteintes par ce cancer sont postménopausées, mais plusieurs cas surviennent aussi avant la ménopause (Brodie et Njar, 2000). Si l'incidence de ce cancer a toujours été en augmentation depuis le début des années 70, la dernière décennie a cependant été marquée par une stabilisation du taux d'incidence et par une baisse du taux de mortalité. Ces améliorations sont en bonnes parties attribuables au développement de traitements hormonaux plus efficaces, traitements dont le principe général consiste à bloquer l'action des œstrogènes dans les cellules tumorales.

## 1.2 Rôle des œstrogènes dans la physiologie humaine et dans le cancer du sein

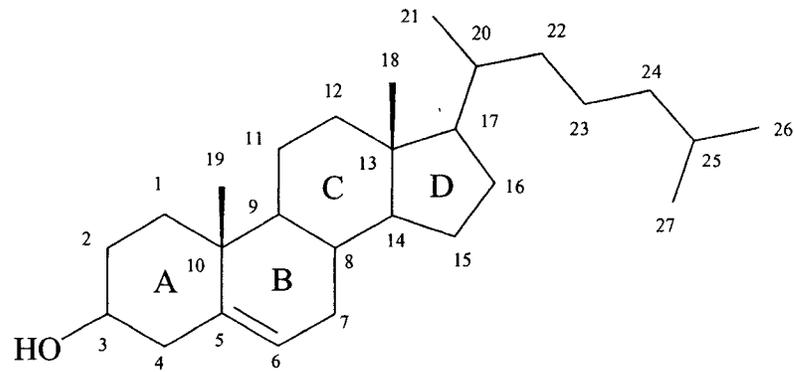
### 1.2.1 Formation, fonction et rôle des œstrogènes

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes sexuelles, synthétisées en majeure partie dans les gonades à partir du cholestérol, le précurseur de tous les stéroïdes (figure 1.1). La structure des œstrogènes est composée de 18 carbones, comparativement à 19 pour les androgènes et 21 pour tous les progestatifs, les minéralocorticoïdes et les glucocorticoïdes. De plus, le cycle A du corps stéroïdien des œstrogènes est un cycle aromatique; tous les autres stéroïdes (androgènes, progestatifs, minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes) ont un groupement méthyle en position 19 (C19) et n'ont pas de cycle aromatique (figure 1.2). Les principaux œstrogènes sont l'estrone (E1) et l'estradiol (E2). L'estrone est un œstrogène faible et il est le précurseur de l'estradiol, l'œstrogène le plus actif.

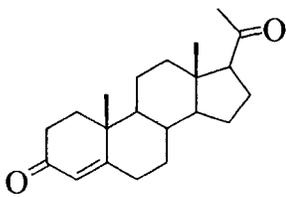
L'estradiol est l'œstrogène le plus actif parce qu'il a la plus grande affinité pour les récepteurs des œstrogènes (REs). Une fois synthétisée, l'hormone est excrétée dans le sang où elle se lie à des protéines de transport comme l'albumine ou la globuline liant les hormones sexuelles (*sex-hormone binding globulin*, SHBG) pour se rendre aux tissus cibles. Elle traverse ensuite la membrane cellulaire pour se rendre au noyau et se lier aux REs (Hammond *et al.*, 2003 et références à l'intérieur). Les REs sont des protéines cytosoliques qui, lorsqu'elles sont liées à l'estradiol, subissent un changement de conformation, pénètrent dans le noyau, se dimérisent puis se lient à l'ADN pour activer ou inhiber l'expression d'un ou de plusieurs gènes avec l'aide de corégulateurs (MacGregor et Jordan, 1998). Il existe une autre voie d'activation par l'estradiol, dite voie non-génomique, où l'hormone provoque une transduction de signal sans se lier aux REs (Kelly et Levin, 2001; Santen *et al.*, 2003). Beaucoup moins connue et étudiée, cette voie donne lieu à des phénomènes de stimulation cellulaire beaucoup plus rapides que ceux provoqués par l'activation des REs et elle pourrait impliquer des récepteurs membranaires d'œstrogènes couplés aux protéines G (Levin, 2000; Rouayrenc *et al.*, 2000).



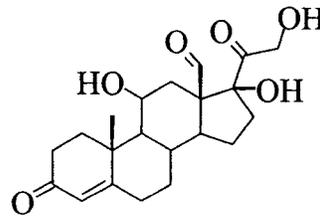
**Figure 1.1: Illustration montrant les principales voies de la stéroïdogénèse des stéroïdes majeurs avec les principales enzymes impliquées dans chaque processus.** Il existe plusieurs types de 17 $\beta$ -HSD, chacun donnant lieu à une réaction différente. Les chiffres reliés aux flèches des réactions des 17 $\beta$ -HSDs représentent les types de 17 $\beta$ -HSD principalement impliqués dans la conversion des stéroïdes du tableau. Par exemple, la 17 $\beta$ -HSD type 1 transforme E1 en E2 alors que la 17 $\beta$ -HSD type 2 transforme E2 en E1.



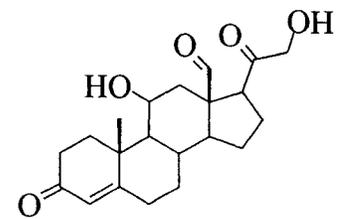
Cholestérol



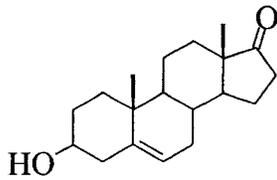
Progesterone



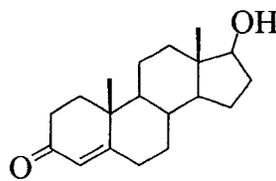
Cortisol



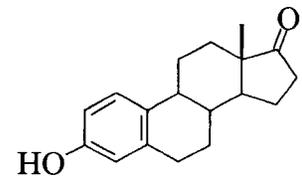
Aldostérone



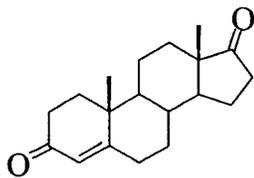
Déhydroépiandrostérone



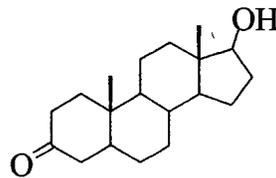
Testostérone



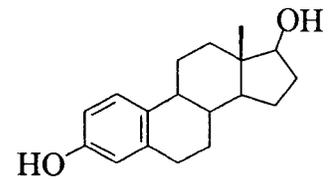
Estrone



Androstènedione



Dihydrotestostérone



Estradiol

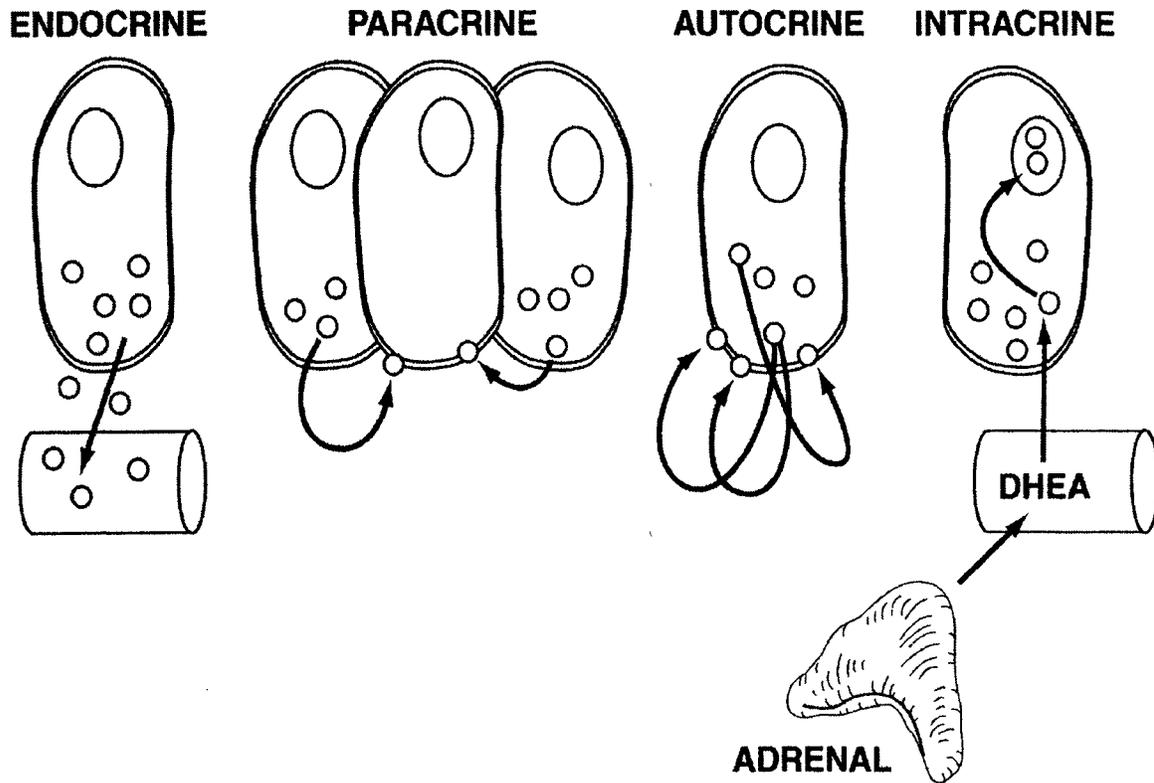
**Figure 1.2 : Structures chimiques du cholestérol et des principaux stéroïdes impliqués dans l'endocrinologie humaine.** Les stéroïdes sont composés de 4 cycles (A, B, C et D) et de différents nombres d'atomes de carbone (21, 19 et 18). Chaque atome est numéroté tel qu'illustré avec le cholestérol.

Les œstrogènes sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques dont la croissance, la reproduction, le métabolisme et certaines formes de cancer (Challis *et al.*, 2000; Alonso et Rosenfield, 2002; Meinhardt et Mullis, 2002; Frank, 2003). On les retrouve chez les hommes et les femmes, mais le rapport œstrogènes/androgènes est beaucoup plus élevé chez la femme, où il est à l'origine de phénomènes tels que le développement des traits sexuels féminins, le cycle menstruel et la grossesse. Les œstrogènes sont aussi impliqués dans la croissance et la maturation des os. À la ménopause, les ovaires cessent leur production hormonale et le taux d'œstrogènes sanguins des femmes post-ménopausées chute dramatiquement, devenant nul dans la plupart des cas (Thorson *et al.*, 1982; Miyoshi *et al.*, 2001). Cet arrêt dans la production d'hormones est reconnu pour être à l'origine de problèmes de santé tel l'ostéoporose (Manolagas *et al.*, 2002). De nombreuses études ont également démontré le rôle que pouvait avoir les œstrogènes dans le cancer du sein, particulièrement chez les femmes post-ménopausées (Bonney *et al.*, 1986; Poulin et Labrie, 1986; Thomas, 1989). En effet, à l'opposé de ce qui arrive dans leur circulation sanguine et leurs ovaires, les tissus mammaires tumoraux des femmes post-ménopausées contiennent de grandes quantités d'œstrogènes, plus particulièrement d'estradiol, qui stimulent la prolifération des cellules tumorales. Les hormones pourraient même participer à l'apparition du cancer (Santen *et al.*, 1999).

### 1.2.2 L'estradiol dans le cancer du sein et les traitements anti-tumoraux

La grande quantité d'estradiol dans les tissus mammaires est causée par une production *in situ*, c'est-à-dire que cette hormone est produite dans les cellules épithéliales cancéreuses des glandes mammaires (Purohit A et Reed MJ, 2002). Cette production fonctionne selon le concept d'intracrinologie (Labrie, 1991), un processus où les cellules tumorales utilisent des précurseurs stéroïdiens inactifs circulant dans le sang pour les transformer en hormones actives (figure 1.3). Ces précurseurs, qui sont convertis en estrone ou en estradiol, sont des œstrogènes sulfatés, des androgènes comme la testostérone (T), mais surtout la dihydroépiandrostanedione (DHEA), une hormone C19 produite dans les glandes surrénales. Les principales enzymes impliquées dans ce processus sont la stéroïde sulfatase, l'œstrogène sulfotransférase et, plus particulièrement, la P450 aromatasase et la

17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 (17 $\beta$ -HSD1) (Reed et Purohit, 1997). Les rôles de ces deux dernières enzymes sont respectivement de convertir les stéroïdes androgènes en œstrogènes et de convertir l'estrone en estradiol. Ces deux enzymes sont donc responsables de la biosynthèse *in situ* des œstrogènes actifs chez les femmes post-ménopausées.



**Figure 1.3: Différents modes d'action et de sécrétion des hormones.** L'activité endocrine classique consiste à la sécrétion d'hormones actives par une glande pour porter un signal à des cellules éloignées via la circulation sanguine. L'activité paracrine consiste à envoyer un signal hormonal (hormones actives) à des cellules voisines, sans emprunter la circulation sanguine et l'activité autocrine consiste à une auto-stimulation hormonale de la cellule. L'activité intracrine consiste à la formation de stéroïdes actifs à partir de précurseurs inactifs (provenant des glandes surrénales) à l'intérieur même de la cellule cible, sans sécrétion (tirée de Labrie, 1991).

Une autre source importante d'œstrogènes *in situ* viendrait des macrophages des glandes mammaires, mais peu de travaux ont été faits à ce sujet. Lors du développement d'un cancer du sein, les macrophages constituent environ 50% de la masse du carcinome mammaire (Mor *et al.*, 1998). Ces cellules immunitaires produisent des œstrogènes entrant surtout dans l'autorégulation de la production des cytokines, mais la quantité d'œstrogènes actifs produite par une telle masse dans le carcinome serait suffisante pour affecter la prolifération des cellules épithéliales avoisinantes (Purohit et Reed, 2002). De plus, certaines cytokines sécrétées par les macrophages, dont le facteur nécrosant de tumeurs alpha (TNF- $\alpha$ ), auraient un autre rôle à jouer dans le cancer du sein en raison de leur influence sur la régulation de l'aromatase. La présence de macrophages dans les tissus cancéreux pourrait donc favoriser la prolifération des tumeurs par divers mécanismes.

Les traitements présentement utilisés contre le cancer du sein consistent à bloquer l'action des œstrogènes, soit en les empêchant de s'attacher à leur récepteur, soit en empêchant leur production dans les tissus mammaires. Le médicament le plus utilisé est le tamoxifène, un anti-œstrogène faible se liant aux REs ayant des effets agonistes et antagonistes (Brodie et Njar, 2000). Dans le cas du cancer du sein, cet anti-œstrogène est un antagoniste empêchant l'estradiol de se lier aux REs alors qu'il est un agoniste dans les autres tissus, ayant entre autres des effets bénéfiques sur le système osseux des femmes post-ménopausées puisqu'il remplace les œstrogènes sanguins (Lonning *et al.*, 2001). Ce médicament est officiellement utilisé contre les cancers du sein avancés depuis une dizaine d'année et son utilisation est la cause directe de la réduction du taux de mortalité relié à ce cancer (Brodie et Njar, 2000). Cependant, le tamoxifène devient inutile après environ 5 ans de traitement, les tumeurs développant une résistance à l'anti-œstrogène. À cause de ses propriétés mixtes, il peut également avoir des effets œstrogéniques ou anti-œstrogéniques indésirables dans les autres tissus, en stimulant par exemple le cancer de l'endomètre (Graham *et al.*, 2000). Le second traitement, plus récent, consiste en divers inhibiteurs de la P450 aromatase, l'enzyme responsable de la conversion de certains androgènes (androstènedione et testostérone) en œstrogènes (estrone et estradiol, respectivement). Deux inhibiteurs, l'anastrozole et le letrozole, ont entre autres démontré une plus grande

efficacité que le tamoxifène dans la régression des tumeurs et ils sont beaucoup plus sécuritaires que le tamoxifène, car ils ne donnent pas lieu à des effets œstrogéniques indésirables (Santen et al., 2003; Goss, 2003; Goss *et al.*, 2003). Les inhibiteurs d'aromatase sont utilisés dans des traitements mixtes avec le tamoxifène, soit en remplacement de l'anti-œstrogène après le traitement standard de cinq ans ou en alternance avec celui-ci.

### 1.3 La 17 $\beta$ -HSD1 : rôles, structures et caractéristiques

#### 1.3.1 Rôle et expression de la 17 $\beta$ -HSD1 dans le cancer du sein

La 17 $\beta$ -HSD1 est également une cible intéressante pour le développement de traitements contre le cancer du sein en raison de son rôle important dans la synthèse de l'estradiol. Cette enzyme se retrouve dans les gonades et les tissus périphériques comme le placenta, le foie, les tissus adipeux, l'endomètre et le sein. Elle est hautement spécifique aux œstrogènes et elle catalyse la réduction de l'estrone en estradiol, transformant l'œstrogène inactif en œstrogène actif (Martel *et al.*, 1992). Des études montrent que les concentrations d'estradiol dans le cancer du sein sont les mêmes chez les femmes pré- et post-ménopausées, mais que les ratios estradiol/estrone sont plus élevés chez les femmes post-ménopausées (Miyoshi *et al.*, 2001). De plus, l'ARNm de la 17 $\beta$ -HSD1 est souvent présent en plus grande quantité chez les femmes post-ménopausées, suggérant un rôle important de l'enzyme dans la régulation de leurs niveaux d'estradiol intratumoraux.

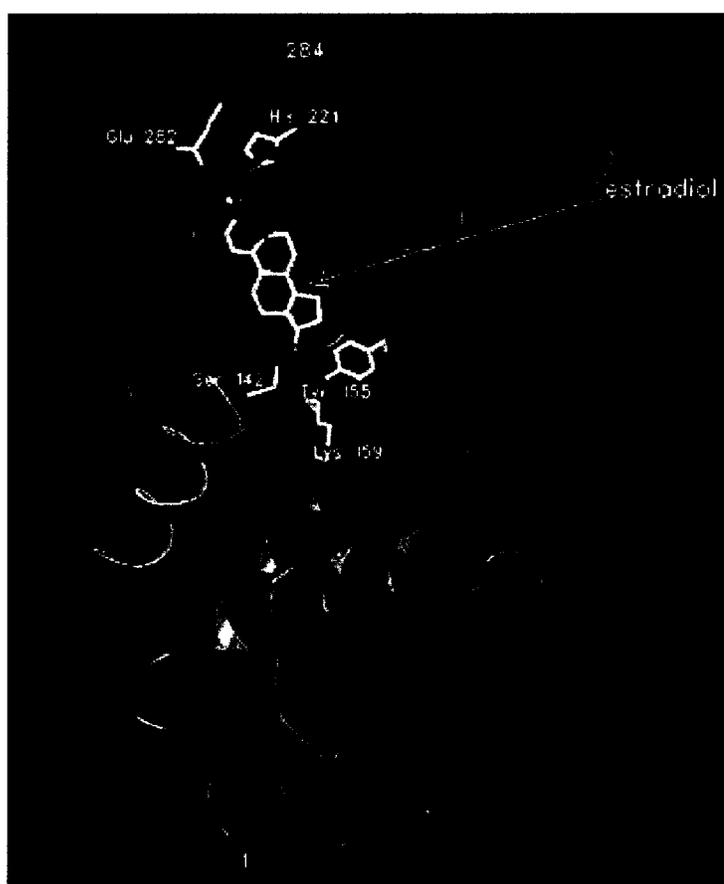
Même si l'expression de la 17 $\beta$ -HSD1 n'est pas toujours plus élevée dans tous les cas de cancers hormono-dépendants, on remarque une baisse anormale de l'expression de la 17 $\beta$ -HSD de type 2 dans tous les cancers du sein. La 17 $\beta$ -HSD2 est une enzyme catalysant l'oxydation de l'estradiol en estrone, la réaction inverse de la 17 $\beta$ -HSD1 (Gunnarsson *et al.*, 2001). En absence d'une activité suffisante de la 17 $\beta$ -HSD2, les taux d'estradiol deviennent beaucoup plus élevés dans les tissus. La corrélation entre les niveaux d'expression de ces deux enzymes et l'incidence du cancer du sein démontrent bien le rôle important qu'elles ont dans le maintien des niveaux normaux d'estradiol dans les tissus mammaires (Gunnarsson *et al.*, 2001). Le rôle de la 17 $\beta$ -HSD1 dans la dernière étape de la synthèse de l'estradiol en fait donc une cible intéressante pour le développement d'inhibiteurs, surtout qu'il s'agit d'une enzyme très étudiée.

### 1.3.2 Caractéristiques génétiques et structurales de la 17 $\beta$ -HSD1

La 17 $\beta$ -HSD1 est connue et étudiée depuis les années 50 (Ryan et Engel, 1953), mais les progrès majeurs ont surtout eu lieu depuis la fin des années 80 avec l'amélioration des techniques de clonage. Ainsi, au cours des 16 dernières années, 11 isoenzymes, dont 8 chez l'humain, ont été découvertes et caractérisées (Luu-The, 2001 ; figure 1.1). Les 17 $\beta$ -HSDs, dont le type 1, font partie de la famille des déshydrogénases à chaînes courtes (SDR, pour *short-chain dehydrogenases/reductases*), à l'exception du type 5, qui est catégorisée dans la famille des aldo-céto réductases (AKR) (Luu-The, 2001; Oppermann *et al.*, 2001). Ces isoenzymes ont toutes un rôle important dans la biosynthèse des stéroïdes, autant au niveau des gonades que dans les tissus périphériques (Penning, 1997). Deux gènes situés dans la région q11-q12 du chromosome 17, EDH17B1 et EDH17B2, codent pour la 17 $\beta$ -HSD1, mais seul EDH17B2 est fonctionnel puisque EDH17B1 est un pseudogène (Luu-The *et al.*, 1989). EDH17B2 se divise en six exons et cinq introns, totalisant 3250 pb. Il peut être transcrit en deux types d'ARNm en raison d'un épissage alternatif dépendant de la localisation cellulaire. La forme majeure mesure 1,3 kb et est exprimée dans le placenta et les ovaires. L'autre transcrit mesure 2,2 kb et est exprimé dans la prostate, les surrénales, les glandes mammaires et plusieurs autres tissus (Luu-The *et al.*, 1989). Les 900 pb supplémentaires du transcrit de 2,2 kb sont situées en 5' de la séquence et sont non codantes. La protéine produite par ces transcrits est un homodimère cytosolique dont chaque sous-unité de 34,5 kDa est composée de 327 acides aminés (Luu-The *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 1992).

La 17 $\beta$ -HSD1 a été la première enzyme stéroïdogénique humaine dont la structure tridimensionnelle (3D) a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Ghosh *et al.*, 1995; Azzi *et al.*, 1996 ; Breton *et al.*, 1996). Brièvement, la structure est formée de 6 hélices alpha entourant 7 barreaux bêta parallèles et ne possède aucun pont disulfure (figure 1.4). Comme les autres SDR, la 17 $\beta$ -HSD1 est caractérisée par un repliement de Rossmann (*Rossmann fold*), site de liaison du cofacteur nicotinamide adénosine NAD(P)(H), et par une séquence catalytique conservée Ser-(X)<sub>12</sub>-Tyr-(X)<sub>3</sub>-Lys, composée des résidues Ser142, Tyr155 et Lys159 (Ghosh *et al.*, 1995; Oppermann *et al.*, 2001). Le site de liaison du

substrat prend la forme d'un long tunnel étroit qui s'enfonce profondément au cœur de l'enzyme. Ce tunnel est majoritairement composé de résidus hydrophobes et aromatiques qui entourent le substrat, les principaux étant Val143, Leu149, Pro187, His221, Val225, Phe259 et Leu262 (Azzi *et al.*, 1996). Les contacts de Van der Waals (VdW) et les forces hydrophobes forment les interactions majeures entre le substrat et l'enzyme. Les résidues Ser142, Tyr155, His221 et Glu282 peuvent former des liens hydrogènes avec les groupements hydroxyle de l'estradiol, orientant et stabilisant le substrat dans le site de liaison (figure 1.4). Le site de liaison est refermé par une boucle flexible, composée des résidus 187 à 200 et elle est difficilement définie dans les structures 3D à cause de sa grande flexibilité.



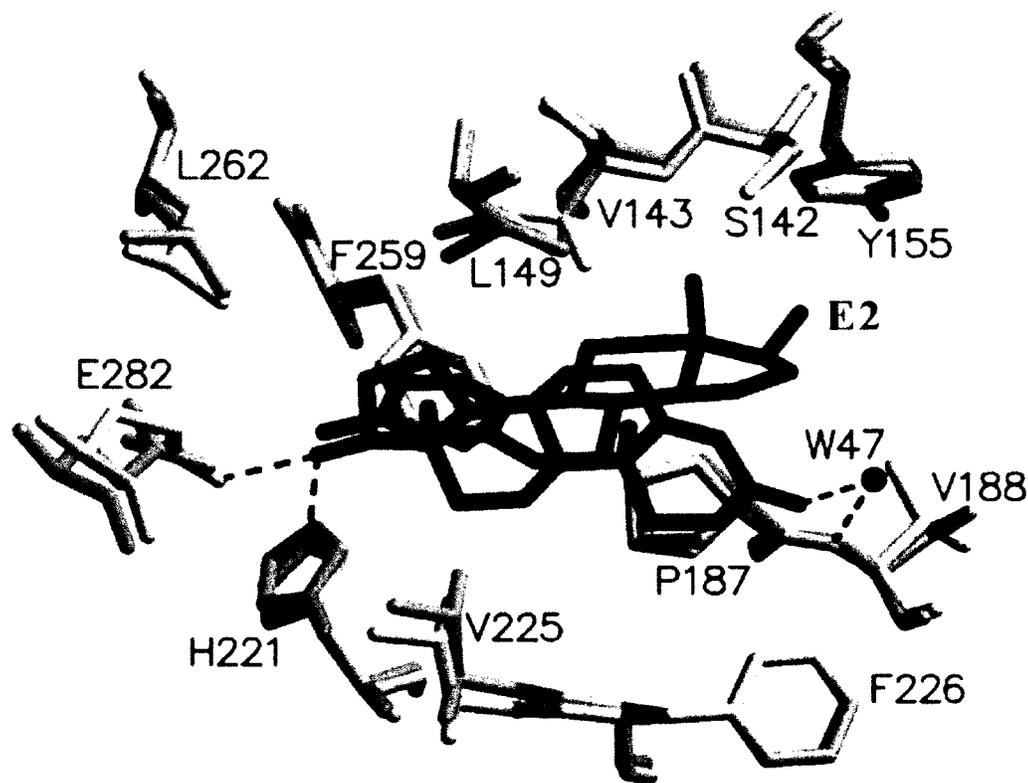
**Figure 1.4: Structure tridimensionnelle de la 17 $\beta$ -HSD1.** (Tiré de Azzi *et al.*, 1996)

Dans les structures 3D déterminées, il est cependant possible de voir les deux conformations principales de la boucle, soit sa conformation ouverte (Azzi *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2000) et sa conformation fermée (Mazza *et al.*, 1998; Sawicki *et al.*, 1999 ; Qiu *et al.*, 2002). Dans cette dernière, les résidues Phe192 et Met193 interagissent également avec le substrat. La structure 3D des 40 derniers acides aminés (partie carboxy-terminale) de l'enzyme n'a jamais été résolue par cristallographie, montrant que cette partie est également très flexible. Son rôle n'a pas encore été déterminé. La délétion de la partie C-terminale n'a montré aucun effet sur l'activité catalytique de l'enzyme (Puranen *et al.*, 1997a), mais elle pourrait prendre part à l'ancrage de l'enzyme à la membrane ou au cytosquelette *in vivo* (Ghosh *et al.*, 1995; Gangloff, 2002).

L'enzyme peut utiliser le NAD(H) et le NADP(H) comme cofacteur, mais à cause de la présence des résidus Ser11, Arg37 et Lys195, il lie préférentiellement le NADPH parce que ces résidus interagissent favorablement avec le phosphate 2' du dinucléotide. Ces interactions supplémentaires font en sorte que l'enzyme a beaucoup plus d'affinité pour les cofacteurs triphosphates que les cofacteurs diphosphates (Zhu *et al.*, 1993; Mazza *et al.*, 1998; Jin et Lin, 1999). À cause d'un ratio très élevé NADP(H)/NADP<sup>+</sup> dans le cytoplasme, cette préférence oriente l'activité catalytique de l'enzyme vers la réduction de l'estrone puisque le NADPH est beaucoup plus disponible et facile à utiliser par l'enzyme *in vivo*. *In vitro*, l'enzyme peut catalyser la réduction et l'oxydation des œstrogènes, dépendant du cofacteur ajouté lors de la réaction (Luu-The *et al.*, 1995).

La flexibilité du site de liaison a été démontrée par la cristallisation de complexes avec plusieurs substrats dans différentes conformations. La 17 $\beta$ -HSD1 a été cristallisée en complexe avec l'équiline, le DHT, le DHEA et la testostérone (Sawicki *et al.*, 1999; Han *et al.*, 2000; Gangloff *et al.*, 2003). La structure obtenue avec la testostérone montre entre autres un mode de liaison alternatif où le stéroïde est inversé, avec l'atome O3 se dirigeant vers le cofacteur au lieu de se diriger vers His221 et Glu282 (Gangloff *et al.*, 2003) (figure 1.4). Des études cinétiques ont de plus montré que, selon le cofacteur utilisé, l'enzyme peut catalyser la transformation de DHT en androstanedione (A-dione) ou en 3 $\beta$ ,17 $\beta$ -

androstanediol ( $3\beta$ -diol). Ceci signifie que l'enzyme peut catalyser l'oxydation en position 17 et la réduction  $3\beta$  pour ce stéroïde. D'autres structures de la  $17\beta$ -HSD1, avec A-dione, 4-dione et DHEA liés en mode inversé, ont été également déterminées (Shi et Lin, 2004; Rong Shi, résultats non publiés).



**Figure 1.5: Liaison en mode alternatif de la testostérone (vert et jaune) en comparaison à la liaison avec l'estradiol (pourpre et bleu).** (Tiré de Gangloff *et al.*, 2003)

### 1.3.3 Études de la structure/fonction et de l'inhibition de la $17\beta$ -HSD1

Ces structures, en combinaison avec des études de mutagenèse dirigée et de cinétique enzymatique, ont permis de déterminer le rôle de plusieurs résidus dans le

mécanisme catalytique. Les résidus Ser142, Tyr155 et Lys159, qui composent la séquence catalytique conservée des SDR, forment une triade catalytique dans laquelle la tyrosine transfère son proton à l'atome O17 de l'estrone (Ghosh *et al.*, 1995). La Ser142 contribue à la stabilisation du substrat dans le site de liaison par la formation d'un lien hydrogène avec l'atome O17 alors que la Lys159 contribue à la stabilisation du cofacteur en formant des liens hydrogène avec le cycle ribose du nicotinamide (Breton *et al.*, 1996). La Lys159 servirait également à réduire le pKa de la tyrosine, facilitant le transfert de son proton au cours de la réaction (Ghosh *et al.*, 1995). La mutagenèse dirigée de la Tyr155 et de la Lys159 a montré que l'absence d'un de ces résidus abolissait complètement l'activité enzymatique (Puranen *et al.*, 1994 ; Puranen *et al.*, 1997b). La mutation de la Ser142 en glycine réduit considérablement l'activité enzymatique alors qu'un changement pour une cystéine l'abolit complètement (Huang *et al.*, 2001). Ceci s'expliquerait par le fait qu'avec la glycine, l'atome O17 du stéroïde perd son lien H avec la sérine, mais il peut quand même accepter le proton de la tyrosine. Avec la cystéine, l'atome de soufre du résidu est trop gros et empêcherait le stéroïde d'être en bonne position pour accepter le proton de la tyrosine et l'hydride du cofacteur.

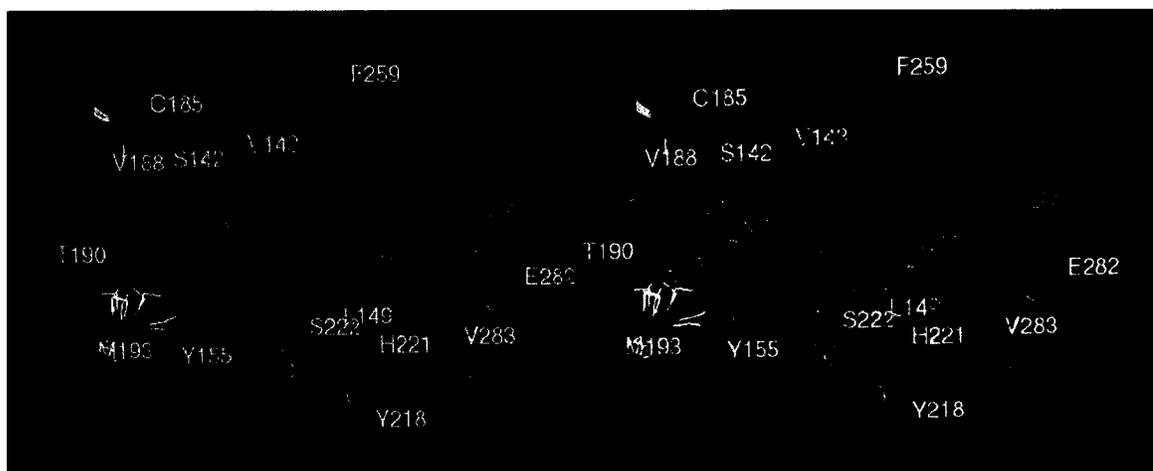
D'autres résidus, dont l'importance se situe surtout au niveau de la liaison et de la spécificité aux œstrogènes, ont été identifiés par ces études. L'His221 et la Glu282 servent à stabiliser le substrat dans le site actif en formant des liaisons H avec l'atome O3 du stéroïde (Ghosh *et al.*, 1995 ; Azzi *et al.*, 1996; Breton *et al.*, 1996). Cependant, une certaine confusion règne autour du rôle de Glu282, car des études cinétiques et de mutagenèse dirigée tendent à montrer qu'il n'a pas une grande importance dans le mécanisme catalytique (Puranen *et al.*, 1997b; Huang *et al.*, 2001). Pourtant, il s'agit d'un résidu conservé dans tous les sites de liaisons des protéines liant les œstrogènes (Nahoum *et al.*, 2003) et certaines structures cristallographiques montrent clairement l'existence d'un lien hydrogène stabilisateur (Azzi *et al.*, 1996; Sawicki *et al.*, 1999). La Leu149 et la Val225 ont un rôle critique dans la discrimination entre les œstrogènes et les androgènes : leur chaîne latérale forme une structure en sandwich qui donne à l'enzyme une grande affinité pour le cycle aromatique des œstrogènes, mais qui provoque un encombrement

stérique défavorable pour le groupement méthyle C19 des androgènes (Han *et al.*, 2000 ; Nahoum *et al.*, 2003).

Depuis plusieurs années, la 17 $\beta$ -HSD1 est l'objet d'études visant à lui trouver un inhibiteur qui permettrait de bloquer ou de réduire la production d'estradiol et ainsi réduire la prolifération des cellules cancéreuses du sein. Les meilleurs inhibiteurs conçus avant la détermination 3D de l'enzyme consistent en un noyau estradiol avec une chaîne bromo-alkylée en position 16- $\alpha$  ou 16- $\beta$  (Tremblay et Poirier, 1998; Poirier, 2003). Cependant, ces molécules peuvent également se lier aux REs et produire des effets œstrogéniques indésirables. Depuis la détermination de la structure 3D, la recherche s'oriente plus vers le développement d'inhibiteurs hybrides, mélangeant à la fois les propriétés et les structures du substrat et du cofacteur (Qiu W *et al.*, 2002; Brown WM *et al.*, 2003). Les résultats obtenus jusqu'à maintenant sont prometteurs, les molécules testées montrant une bonne activité inhibitrice et aucune activité œstrogénique.

Une étude de modélisation moléculaire de la 17 $\beta$ -HSD1, faite selon la méthode de Monte Carlo avec minimization d'énergie (MCM), a montré que l'estradiol peut adopter plusieurs conformations de liaison d'énergie minimale dans le site actif, ces modes ne pouvant pas être observés dans les structures cristallographiques (Zhorov et Lin, 2000). La modélisation est en accord avec les données structurales, montrant que la position de l'estradiol dans le site actif est située dans un minimum énergétique, mais d'autres minima montrent que dans un contexte dynamique, le substrat ne resterait pas toujours au même endroit. Cette étude a de plus permis d'observer le mouvement possible des chaînes latérales des acides aminés lors de la liaison du substrat au site et de calculer la contribution énergétique de chacun des résidus du site avec l'estradiol. Enfin, pour étudier l'interaction de l'estradiol avec l'enzyme le long du site actif, des paramètres spéciaux permettant le déplacement automatique du ligand dans l'enzyme ont été créés spécialement pour ce travail. Ce protocole de translation du ligand a permis de déterminer une entrée possible du substrat dans le site actif, soit à l'embouchure des résidus His221 et Glu282 (figure 1.5). La flexibilité de la chaîne latérale de ces résidus leur permettrait d'agir comme une double-porte pouvant s'ouvrir pour laisser le stéroïde entrer et se refermer ensuite sur le substrat

pour le stabiliser par des liens H. La capacité de la modélisation moléculaire à simuler la dynamique des protéines et à calculer de façon quantitative les énergies d'interaction enzyme-substrat en fait un outil très intéressant pour la compréhension du mécanisme catalytique des protéines au niveau atomique.



**Figure 1.6: Vue en stéréo de la superposition des structures modélisées montrant les modes de liaison de l'estradiol tout au long du site de liaison de la 17 $\beta$ -HSD1. (Tiré de Zhorov et Lin, 2000)**

## 1.4 Projet de recherche

Comme mentionné plus haut, la  $17\beta$ -HSD1 a la capacité de lier plusieurs œstrogènes, en plus de pouvoir lier les androgènes dans un mode alternatif. Quels sont les facteurs faisant en sorte que ces stéroïdes ont plusieurs modes de liaison? Y a-t-il une préférence énergétique pour un mode ou l'autre? Les œstrogènes ont-ils aussi ce mode alternatif malgré l'absence d'une pseudo-symétrie comparativement aux androgènes? Par ailleurs, aucune structure complexée avec l'estrone, le substrat ayant la plus grande affinité pour la  $17\beta$ -HSD1, n'a encore été déterminée. Or, une telle structure pourrait donner des précisions sur le processus catalytique ainsi que sur la préférence de l'enzyme pour E1. Cependant, il est difficile, long et dispendieux d'obtenir de bonnes structures cristallographiques de cette enzyme avec tous les stéroïdes connus pour le lier et il est encore plus difficile d'avoir un contrôle sur le mode de liaison adopté par le substrat.

Les travaux de Zhorov et Lin (2000) mentionnés plus haut ont été faits avec l'estradiol, dans un modèle où la boucle flexible est dans une conformation ouverte, où le cofacteur est absent et où les effets de la solvation n'ont pas été pris en compte. Le protocole de translation qu'ils ont élaboré permet entre autres de simuler le déplacement des substrats au sein du site actif. Les résultats seront-ils les mêmes si certains de ces paramètres sont changés? Comment l'estradiol se liera-t-il tout au long du site de liaison en présence du cofacteur et avec la boucle refermée sur le site actif? Est-ce que les autres stéroïdes se lieront et se déplaceront de la même façon? Si non, quelles seront les différences majeures? Existe-t-il d'autres modes de liaison alternatif jamais observés expérimentalement ?

Mon projet de maîtrise consiste à faire la modélisation moléculaire de la  $17\beta$ -HSD1 en utilisant le protocole de MCM afin de répondre à ces questions sans avoir à générer de nouvelles structures cristallographiques. Avec l'arrimage moléculaire, il est possible de créer des modèles de l'enzyme avec différents substrats, entre autres avec E1, E2, T, DHT et DHEA. Il est également possible de créer des modèles avec ces stéroïdes dans le mode de liaison alternatif puis de comparer les différences structurales et énergétiques de chaque mode pour chaque stéroïde. De plus, la modélisation permettra de suggérer le rôle de

certaines résidus du site actif en déterminant leur contribution énergétique à la liaison de chaque stéroïde. Le protocole de translation du substrat utilisé par Zhorov et Lin (2000) sera également réutilisé avec de nouveaux paramètres et trois stéroïdes pour observer les différences dans le déplacement de chacun dans le site actif. Enfin, un nouveau protocole, semblable à celui utilisé pour la translation du substrat, sera testé. Le protocole en question permet la translation et la rotation du substrat dans le site actif, donnant lieu à une carte en deux dimensions de l'énergie de liaison du substrat en fonction des coordonnées de translation et de rotation. Entre autres, cette carte devrait permettre de déterminer s'il y a d'autres modes de liaison alternatifs possibles.

## 2.0 Méthodologies

### 2.1 Progiciel de modélisation moléculaire ZMM et paramètres de calcul

Les calculs de modélisation moléculaire sont exécutés avec le progiciel ZMM (Zhorov, 1983 ; Zhorov et Ananthanarayanan, 1996). ZMM a la particularité de faire la recherche de structures optimales dans l'espace des coordonnées généralisées (ou coordonnées internes) du modèle à l'étude au lieu d'utiliser les coordonnées cartésiennes. Les coordonnées généralisées sont les angles de torsion, les angles de liaison (ou la déformation des angles de liaison), la longueur des liaisons, la position des molécules libres comme les ligands et les ions (définie par les coordonnées cartésiennes de l'atome source de la molécule) et l'orientation spatiale de ces molécules libres (définie par les angles Euler du système local de coordonnées, centré sur l'atome source). Selon les besoins de la simulation, ces coordonnées généralisées peuvent être maintenues rigides, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas altérées au cours de la simulation et ne prennent pas part au calcul de l'énergie. Ainsi, l'utilisateur peut enlever du calcul les parties du complexe à l'étude qui ne sont pas jugées essentielles, réduisant le temps nécessaire pour effectuer les simulations. La plupart des progiciels de modélisation moléculaire, tel que CHARMM et AMBER (Brooks *et al.*, 1983 ; Weiner *et al.*, 1984), fonctionnent dans l'espace des coordonnées cartésiennes des atomes. Pour la minimisation d'énergie d'un grand système, beaucoup de coordonnées cartésiennes variables se déplacent collectivement. Par exemple, la rotation d'un cycle benzène autour du lien C-Ph avec les coordonnées cartésiennes nécessite le mouvement de 33 variables (11 atomes, chacun ayant trois coordonnées), tandis qu'avec les coordonnées généralisées, cette rotation nécessite seulement la variation d'un angle de torsion. La méthode avec les coordonnées généralisées permet d'économiser beaucoup de temps et de ressources informatiques si une petite partie d'un système est considérée flexible.

Le protocole de Monte Carlo avec minimisation (MCM) (Li et Scheraga, 1987) est employé pour la recherche de conformations optimales (Zhorov et Ananthanarayanan, 1996 ; Zhorov et Lin, 2000). Au début de la simulation, l'énergie du modèle est minimisée

par une méthode de minimisation standard, soit celle de la plus grande pente ou du gradient conjugué, dépendant de l'énergie initiale du modèle (voir annexe II.B.2 pour plus de détails). Une nouvelle conformation du modèle est ensuite générée en choisissant aléatoirement quelques coordonnées généralisées de la conformation minimisée et en changeant leur valeur aléatoirement. L'énergie de cette nouvelle conformation est alors minimisée jusqu'à ce que le gradient d'énergie atteigne une valeur  $< 1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{rad}^{-1}$  ou jusqu'à ce que le procédé itératif atteigne une limite de 200 itérations. La conformation d'énergie minimale résultante (MEC, *minimum-energy conformation*) est alors soumise au critère de Metropolis (Metropolis *et al.*, 1953) en la comparant à la conformation précédente. Elle est acceptée si son énergie  $E$  est inférieure à l'énergie de la conformation précédente  $E_p$  ou si un nombre aléatoire  $n \in [0,1] < \exp((E-E_p)/RT)$ . Si la nouvelle conformation est rejetée, le processus aléatoire recommence à partir de la conformation précédente, sinon le processus aléatoire recommence à partir de la nouvelle conformation et ainsi de suite jusqu'à ce qu'un critère de terminaison soit rempli (voir plus bas). Toutes les MEC se trouvant à moins de  $7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  de la MEC la plus basse en énergie sont compilées dans une liste interne. Généralement, seule la MEC de plus basse énergie (soit la dernière MEC générée) pour une trajectoire de MCM est analysée. Une MCM est terminée si 2000 minimisations d'énergie consécutives ne réussissent pas à diminuer l'énergie de la meilleure MEC trouvée ou n'ajoutent aucune nouvelle MEC à la liste interne. Si ces critères ne sont pas satisfaits en 50000 minimisations d'énergie, la trajectoire MCM est arrêtée. Cependant, pour le système à l'étude, la plupart des trajectoires ont pris entre 4000 et 12000 minimisations d'énergie pour être complétées, avec quelques unes allant jusqu'à 24000 minimisations. Les autres paramètres de calcul sont décrits dans le tableau 2.1. Les atomes du système et leurs interactions sont définis et calculés en utilisant le champ de force AMBER (Weiner *et al.*, 1984 ; voir annexe II.A pour plus de détails), avec une distance de coupure de  $8 \text{ \AA}$  et une fonction de décalage (Brooks *et al.*, 1985). Les calculs sont effectués par un ordinateur multiprocesseur R12000 Origin de Silicon Graphics (SGI).

**Tableau 2.1**  
**Paramètres de contrôle**  
**des calculs d'énergie, de la minimisation et du protocole MCM**

Paramètres	Valeurs
<b>Calculs de l'énergie</b>	
Force diélectrique dépendante de la distance	$\epsilon = r$
Constante de force pour la contrainte des liens H	200 kcal·mol <sup>-1</sup> ·Å <sup>-1</sup>
Contrainte atome-plan pour la translation des stéroïdes	100 kcal·mol <sup>-1</sup> ·Å <sup>-1</sup>
Contrainte de force pour la rotation du ligand	500 kcal·mol <sup>-1</sup> ·rad <sup>-1</sup>
Constante de force de restriction des C <sub>α</sub>	10 kcal·mol <sup>-1</sup> ·Å <sup>-1</sup>
Distance de décalage de restriction des C <sub>α</sub>	1 Å
Constante de force pour la fermeture des boucles	300 kcal·mol <sup>-1</sup> ·rad <sup>-1</sup>
Distance de coupure des interactions atome-atome	8 Å
Distance de décalage de la coupure atome-atome	1 Å
<b>Minimisation de l'énergie</b>	
Critère de convergence du gradient	0.2 kcal·mol <sup>-1</sup> ·rad <sup>-1</sup>
Variation minimale pour la terminaison	10 <sup>-5</sup> rad·itération <sup>-1</sup>
Durée maximale pour la terminaison d'une minimisation	200 itérations
Énergie de seuil	300 kcal·mol <sup>-1</sup>
Délais pour comparer l'énergie au seuil	15 itérations
Abaissement d'énergie requis pour changer la méthode de la plus grande pente vers le gradient conjugué	12 kcal·mol <sup>-1</sup> ·itération <sup>-1</sup>
Limite du pas maximal	1 rad·itération <sup>-1</sup>
Périodicité de la mise-à-jour de la liste des interactions	50 itérations
<b>Protocole de Monte Carlo plus minimisation</b>	
Température de simulation (T)	600 K
Probabilité que $n$ coordonnées sont perturbées dans un cycle	2 <sup>-<math>n</math></sup>
Taille maximale du pas pour la rotation des angles de torsion	180 °
Taille maximale du pas pour la rotation du ligand	60 °
Taille maximale du pas pour la translation du ligand libre	4 Å
Longueur maximale d'une trajectoire de MCM	50000 cycles
Critère de terminaison "aucune diminution d'énergie"	2000 ou 1000 cycles*
Critère de terminaison "aucun ajout de MEC dans la liste"	2000 ou 1000 cycles*
Nombre de trajectoires calculées pour chaque position	5 ou 3 cycles*

\* Les minimisations et les translations se terminent après 2000 cycles alors que les rotations se terminent après 1000 cycles. Chaque translation est calculée 5 fois, chaque rotation 3 fois. Voir le texte pour plus de détails.

Dans certains cas, pour éviter que le protocole ne fasse trop dévier les atomes de leur conformation initiale, des contraintes sont imposées par une fonction de pénalité énergétique quasi-parabolique (Zhorov et Ananthanarayanan, 1996). Par exemple, les  $C_\alpha$  des structures sont restraints à leur position initiale observée dans la structure cristallographique, de sorte qu'ils peuvent se déplacer de cette position de 1 Å sans pénalité. S'ils se déplacent plus loin que cette distance, un terme d'énergie pénalisant, paraboliquement proportionnel au déplacement supplémentaire, est ajouté à l'énergie totale de la minimisation. Ainsi, plus le déplacement est grand, plus la nouvelle conformation risque d'être rejetée par le critère de sélection. L'énergie pénalisante  $E_r$  est calculé selon  $E_r = \mathbf{s}(\mathbf{r}) * \mathbf{f}(\mathbf{r})$ , où  $\mathbf{s}(\mathbf{r})$  est une fonction commutatrice et  $\mathbf{f}(\mathbf{r})$  est la fonction de pénalité.

$$\mathbf{s}(\mathbf{r}) = \begin{bmatrix} 1 & \text{si } r \leq d_l - x \\ [(d_l + x - r)^2(d_l + x - 3(d_l - x) + 2r)]/(2x)^3 & \text{si } d_l - x < r \leq d_l + x \\ 0 & \text{si } d_l + x < r \leq d_h - x \\ [(d_h - x - r)^2(x - d_h + 3(d_h + x) + 2r)]/(2x)^3 & \text{si } d_h - x < r \leq d_h + x \\ 1 & \text{si } d_h + x < r \end{bmatrix}$$

$$\mathbf{f}(\mathbf{r}) = C(r - d_h/2 - d_l/2)^2$$

où  $r$  = distance entre les atomes ou entre l'atome et ses coordonnées de restriction;  
 $d_l$  et  $d_h$  = distances limites minimale et maximale entre lesquelles  $r$  peut se situer sans donner lieu à une pénalité énergétique ( $d_l < r < d_h$ ). Ces limites sont déterminées par l'utilisateur lorsque la contrainte est une distance entre deux atomes. Dans le cas où un atome est contraint à sa position initiale (comme pour les  $C_\alpha$ ),  $d_l = 0$ ;

$x$  = distance tampon de commutation, égale à 0,2 Å

$C$  = constante de force, en  $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-1}$  (voir tableau 2.1)

## 2.2 Création des modèles de la 17 $\beta$ -HSD1

Les coordonnées cartésiennes des atomes servant à créer le modèle de référence de ce travail sont prises à partir de la structure cristallographique du complexe ternaire 17 $\beta$ -HSD1:E2:NADP<sup>+</sup> (Mazza *et al.*, 1998 ; code 1A27 dans la *Protein Data Bank*, PDB). La structure cristallographique choisie est la plus appropriée à la modélisation de ce travail en raison de sa résolution relativement élevée (1,90 Å), de la présence du substrat et du cofacteur dans le site actif et parce que la boucle flexible de l'enzyme (résidus 187-200) est bien définie et en conformation fermée. Pour réduire le nombre de résidus impliqués dans les calculs, un modèle comprenant seulement les résidus du site de liaison est créé. Le modèle prend donc la forme d'une double-coquille de résidus entourant l'estradiol et le NADP<sup>+</sup> (Zhorov et Lin, 2000). La première coquille est composée de résidus flexibles qui ont au moins un atome à l'intérieur de 6 Å de l'estradiol ou du NADP<sup>+</sup>. La deuxième coquille est composée de résidus rigides dont au moins un atome se situe à l'intérieur de 10 Å d'un des substrats et qui n'appartiennent pas déjà à la coquille flexible. Le statut « flexible » s'applique particulièrement aux chaînes latérales et signifie que les angles de torsion du résidu peuvent être modifiés sans contrainte. Cependant, la position globale du résidu ne change pas à cause de la contrainte de force sur le C $\alpha$  qui le maintient en place. Pour cette raison, les simulations de ce travail ne tiennent pas compte de la flexibilité de la boucle flexible, qui reste en conformation fermée pendant les recherches conformationnelles. Les résidus rigides, contrairement aux résidus flexibles, ont des angles de torsion et de liaison fixes et ne comportent pas d'atomes d'hydrogène. La coquille rigide sert en fait à limiter la liberté de mouvement des résidus flexibles.

D'autres résidus ne faisant pas parti de cette double-coquille ont été ajoutés au modèle pour s'assurer que le stéroïde soit entouré par la double-coquille à toutes les positions de la simulation de la translation. Pour ce faire, une simulation rapide et non raffinée de la translation a été effectuée (voir section 2.3 pour la méthode). Le procédé utilisé plus haut pour créer la double-coquille a été utilisé pour chaque position de E2 le long du site de liaison et les résidus supplémentaires observés dans ces sélections ont été ajoutés à la liste de la première double-coquille. Le résultat final donne un modèle en double-coquille couvrant le site de liaison sur toute sa longueur (figure 2.1) et les résidus

du modèle sont listés dans le tableau 2.2. Veuillez prendre note que dans le reste du texte de ce travail, les termes « substrat » et « enzyme » seront remplacés par « ligand » et « récepteur » lorsqu'il sera question de décrire les modèles. Par exemple, on parlera d'interactions ligand-récepteur plutôt que d'enzyme-substrat ou de la translation du ligand (ou du stéroïde) dans le récepteur (ou dans le site de liaison du récepteur).

**Tableau 2.2**

**Liste des résidus composant la double-coquille**

___1	ARTVVLITGC	SSGIGLHLAV	RLASDPSQSF	KVYATLRDLK
	-----xxfff	ffffffxxx-	-----	---xxxxfx
__41	TQRLWEAAR	ALACPPGSLE	TLQLDVRDSK	SVAAAARERVT
	fxxxx-----	-----	xxxxffffffx-	xx--x-----
__81	EGRVDVLVCN	AGLGLLGP	ALGEDAVASV	LDVNVVGTVR
	-----xxff	ffffffx---	-x--xxxxfx	xxffxxxx-x
_121	MLQAFLPDMK	RRGSGRVLVT	GSVGGLMGLP	FNDVYCASKF
	fx--x-----	-----xff	ffffffxfff	xfxxfxxfx
_161	ALEGLCESLA	VLLLPGVHL	SLIECGPVHT	AFMEKVLGSP
	xfx-----	-----	-xxxxffff	ffffffxx--
_201	EEVLDRTDIH	TFHRFYQYLA	HSKQVFREAA	QNPEEVAEVF
	-----	---xxxxffx	fffxffxfff	xfxxfx-xf
_241	LTALRAPKPT	LRYFTTERFL	PLLRMLDDP	SGSNYVTAMH
	x-----	-----ffx	xfxxfx----	---xfxxfff
_281	REVFG			
	xfxxx			

**Légende:**

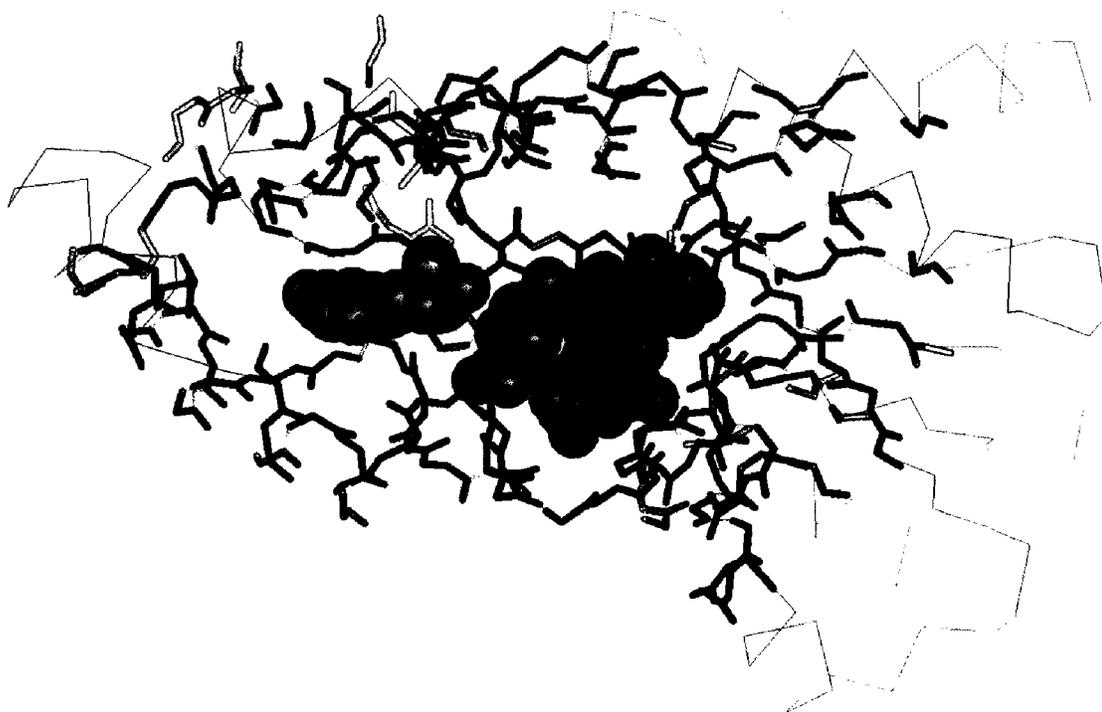
– : Résidus n'étant pas inclus dans le modèle

x : Résidus faisant parti de la coquille rigide

f : Résidus faisant parti de la coquille flexible

**Résidus rouges :** Résidus ayant la plus grande contribution à l'énergie de Van der Waals des interactions ligand-récepteur (Leu149, Pro187, Val225, Phe259)

**Résidus bleus :** Résidus de la catalyse enzymatique et de la stabilisation du ligand (Ser142, Tyr155, Lys159, His221, Glu282)



**Figure 2.1: Structure et résidus du modèle en double-coquille.** Les ligands autour desquels le modèle a été déterminé sont représentés par leur rayon de Van der Waals et colorés en bleu, les atomes de la chaîne principale des résidus de la couche flexible sont en vert et ceux de la couche rigide sont en rouge. Le reste des résidus de la structure cristallographique, dont le tracé des carbones alpha est en violet, ne sont pas inclus dans le modèle. Quelques résidus n'ont pas été inclus dans la figure pour plus de clarté.

Vu la nature lipophile des stéroïdes, les forces hydrophobes constituent les interactions majeures entre le ligand et le récepteur. Cependant, les stéroïdes peuvent former des liens hydrogènes avec leurs groupements cétone et hydroxyle, leur imposant l'orientation appropriée pour le processus catalytique. Comme les interactions électrostatiques peuvent jouer un rôle important dans l'avancement du substrat au site actif, dans son positionnement et dans la réaction (Wade *et al.*, 1998), les résidus ionisables (Arg,

Asp, Glu et Lys) sont considérés dans leur état chargé. Dans la protéine *in vivo*, des contre-ions stabilisent la structure de la protéine en neutralisant les résidus chargés (Momany *et al.*, 1975; Ibragimova et Wade, 1998), mais puisque la position des contre-ions n'est pas connue, ils n'ont pas été inclus dans le modèle. Afin de s'assurer que cette omission ne perturbe pas trop les résultats de ce travail et pour explorer l'impact de l'ionisation sur les interactions ligand-récepteur, des calculs additionnels ont été exécutés avec les résidus ionisables sous leur forme neutre avec un modèle supplémentaire de l'estradiol.

Les histidines de la couche flexible (His189, His221 et His280) sont toutes considérées comme étant neutres. Puisque la forme tautomérique Nε2-H de l'histidine semble être plus commune dans les protéines que la forme Nδ1-H (McDonald et Thornton, 1994), l'hydrogène du cycle imidazole a été placé sur l'azote Nε2 pour ces trois histidines. Cette configuration permet entre autres à His221 de former un lien H avec le ligand, faisant de His221 un donneur alors que Glu282 peut accepter l'hydrogène du groupement hydroxyle du stéroïde. Des modèles avec d'autres formes tautomériques de His189 et de His280 ont été créés et minimisés, mais ceci n'a pas affecté l'énergie d'interaction ligand-récepteur (résultats non montrés). Les molécules d'eau de la structure cristallographique ne sont pas prises en considération et sont enlevées du modèle malgré l'importance qu'elles peuvent avoir dans la réaction catalytique en tant que pharmacophore. En gardant les molécules d'eau, il aurait été préférable d'en rajouter d'autres dans le modèle afin de simuler la présence du solvant, ce qui aurait considérablement augmenté la taille du système et le temps de calcul. Les effets de la solvatation ont plutôt été pris en considération en employant une méthode implicite (Lazaridis et Karplus, 1999). Les charges partielles pour les ligands et les cofacteurs ont été calculées avec la méthode CNDO/2.

Pour chaque modèle, les différents ligands sont automatiquement positionnés à leur site de liaison selon une méthode d'arrimage moléculaire incluse dans ZMM. Puisque les stéroïdes ont des squelettes tétracycliques semblables, la stratégie d'arrimage consiste à superposer les atomes des ligands à leur homologue de l'estradiol de la structure cristallographique initiale. Le même procédé est employé pour positionner le cofacteur. Ce dernier est NADP<sup>+</sup> ou NADPH, dépendant si le groupe chimique du stéroïde se

rapprochant du cofacteur est respectivement un hydroxyle ou une cétone. La création des modèles pour le mode de liaison alternatif des stéroïdes a utilisé le même procédé, mais la structure de base a été modifiée en inversant manuellement l'orientation de l'estradiol dans la structure 1A27 à l'aide du logiciel MVM, l'interface graphique de ZMM (Dr Denis Tikhonov, résultats non publiés). Pour faire l'arrimage, le modèle est d'abord minimisé une première fois en ignorant toutes les interactions atome-atome et en contraignant les atomes du ligand amarré à leurs atomes homologues de l'estradiol dans la structure cristallographique. Ce procédé a déplacé les stéroïdes d'un point de départ arbitraire à la position cible. Ensuite, le complexe ternaire est MC-minimisé selon la méthode décrite plus haut avec des angles de torsion variables pour les résidus et le cofacteur et avec des angles de torsion et de liaison variables pour le stéroïde.

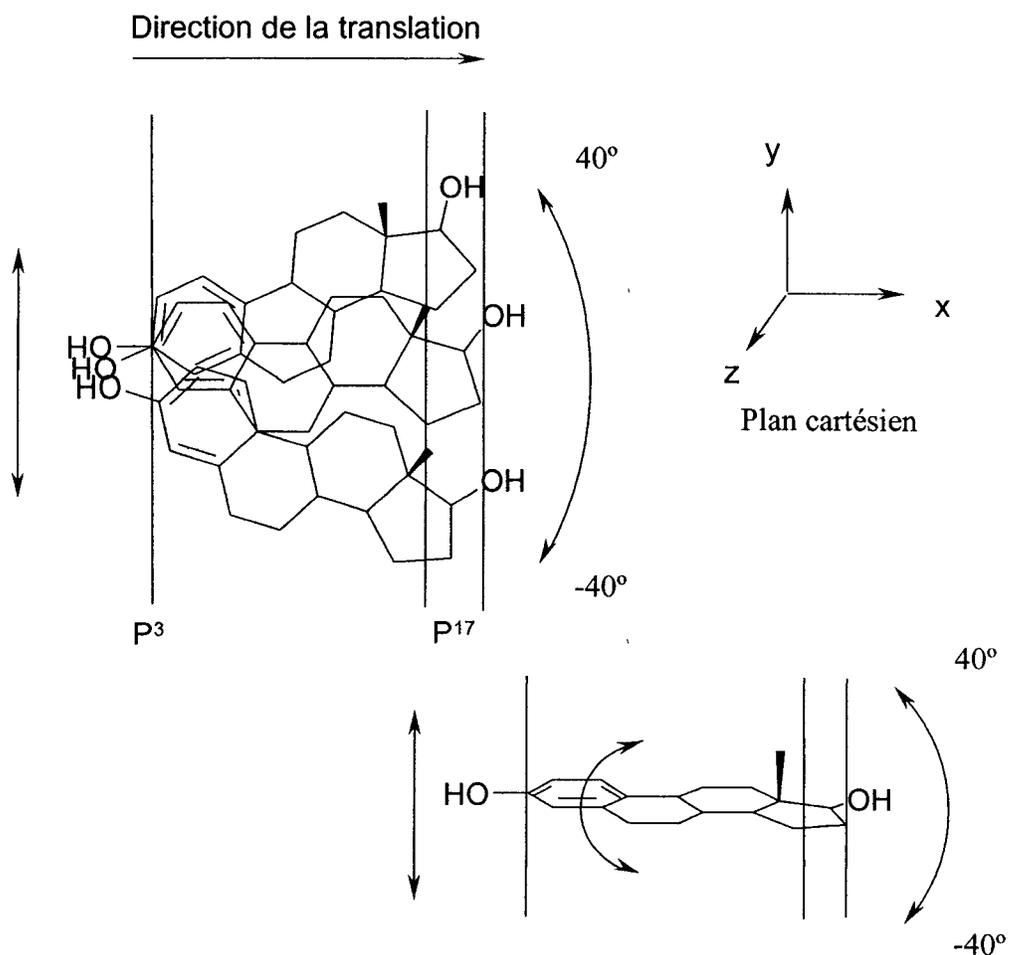
### 2.3 Protocole pour la translation des stéroïdes

Le procédé employé pour déplacer les stéroïdes le long du tunnel de liaison selon un mouvement de translation est très semblable à celui utilisé par Zhorov et Lin (2000). La position de translation du stéroïde dans le tunnel est caractérisée par le paramètre  $d_s$  indiquant un déplacement du stéroïde. Les valeurs positives et négatives de  $d_s$  correspondent respectivement au déplacement du stéroïde vers le cofacteur et vers les résidus His221-Glu282. Le déplacement  $d_s = 0$  correspond à la position du stéroïde dans la structure cristallographique. Chaque stéroïde a été déplacé plusieurs fois dans chaque direction du tunnel avec un pas de 1 Å : du point d'entrée vers le cofacteur (positions -5 à 5, « avant »), du cofacteur vers l'entrée (position 5 à -5, « arrière »), de la position cristallographique au cofacteur (positions 0 à 5, « mi-avant ») et de la position cristallographique à l'entrée (positions 0 à -5, « mi-arrière »).

Pour amener le stéroïde à chaque position de translation, une contrainte spéciale a été créée dans ZMM. Considérons le stéroïde comme un bateau avec les extrémités 3 et 17 à la poupe (CO3) et à la proue (CO17), les méthyles (C18 et C19) étant les mâts et la face  $\beta$  du stéroïde étant le pont. Les atomes C3 et C17 du ligand ont été contraints à des plans (P3 et P17 respectivement) normaux à l'axe passant par les atomes C3-C17 de l'estradiol dans la structure cristallographique (figure 2.2). Les atomes sont libres de bouger sur la surface du plan, mais une pénalité énergétique de  $100 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{\AA}^{-1}$  (tableau 2.1) est incluse au calcul si les atomes sortent des plans. La poupe de la molécule ne peut sortir du plan, alors que la proue peut s'éloigner du plan de 1,8 Å sans être pénalisée par la contrainte énergétique. La liberté de 1,8 Å permet au stéroïde de se déplacer d'environ  $40^\circ$  par rapport à l'axe longitudinal initial. Pour le mode de liaison normal, l'atome proue est C17 pour les translations avant et C3 pour les translations arrière. Pour le mode de liaison alternatif, l'atome proue est C3 pour les translations avant et C17 pour les translations arrière.

Au début d'un calcul de translation, les plans sont déplacés le long de l'axe C3-C17 par la distance  $d_s$  pré-définie dans les paramètres de la simulation ( $d_s$  est alors égal à -5, 5 ou 0, dépendant du type de translation effectué) puis le complexe est MC-minimisé, forçant le stéroïde à se déplacer dans le site de liaison jusqu'à ce que les atomes atteignent leur plan

respectif, abaissant ainsi la pénalité énergétique imposée par la contrainte. L'utilisation des plans, combinée à une plus grande liberté pour le positionnement de l'atome proue, permet au stéroïde de se déplacer le long du tunnel, de ce fait laissant assez de liberté pour qu'il puisse s'ajuster à la courbure du site de liaison. Il peut aussi tourner sur lui-même le long de cet axe, comme si le « bateau » pouvait tanguer ou même chavirer (conformation renversée). Une fois le déplacement effectué, la MCM continue afin d'optimiser les interactions entre le ligand et le récepteur, particulièrement en réajustant l'orientation des chaînes latérales et du ligand. Chaque position du déplacement est MC-minimisée cinq fois avec des nombres aléatoires de départ différents; la conformation ayant donné la plus basse énergie parmi ces cinq simulations est conservée pour être analysée et incluse dans le profil d'énergie en fonction du déplacement. Lorsque la trajectoire de MCM de cette position est terminée, le processus recommence pour la position  $d_s+1$  (ou  $d_s-1$  pour les translations vers l'arrière). Chaque déplacement se fait à partir de la conformation initiale ( $d_s = 0$ ), de sorte que la géométrie obtenue pour le point  $d_s = x$  de la trajectoire de translation n'est pas conservée au point suivant.

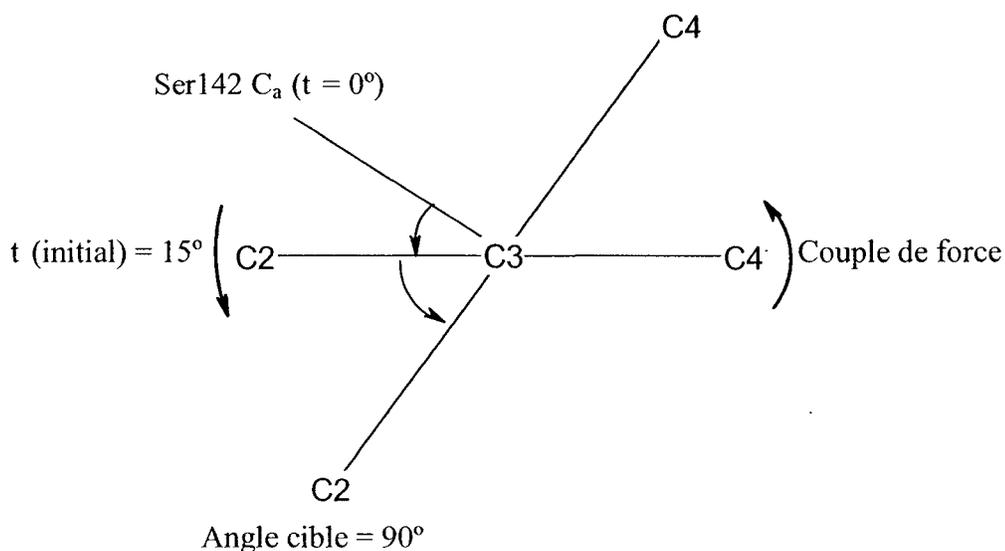
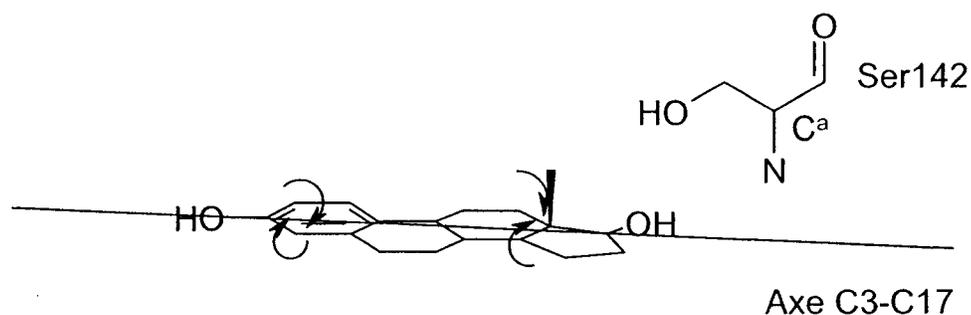


**Figure 2.2: Illustration de la contrainte atome-plan pour la translation des stéroïdes.** D'un point de vue Cartésien, la contrainte atome-plan permet aux atomes contraints de se bouger librement le long des axes y et z (c'est-à-dire à la surface des plans de contrainte). L'axe des abscisses correspond à l'orientation de l'axe longitudinal de l'estradiol dans la structure cristallographique. L'atome C17 (atome proue, voir dans le texte) peut se déplacer de 1,8 Å le long de l'axe des abscisses, ce qui donne au ligand la liberté de former un angle d'environ 40° avec l'axe longitudinal initial, le tout lui permettant de s'ajuster à la courbure du tunnel de liaison. La contrainte permet également au ligand de diminuer sa longueur et de se plier s'il rencontre une résistance au cours de sa translation (voir figure 3.4, E2 bleu clair). Il peut aussi tourner sur son axe et se déplacer latéralement (le long des plans). Pour chaque position  $d_s$ , les plans sont déplacés le long de l'axe des abscisses et la contrainte force le ligand à aller entre eux durant la MCM.

## 2.4 Rotation de l'estradiol et carte 2D de l'énergie

Pour la création de la carte de l'énergie de liaison du substrat en fonction de ses coordonnées de translation et de rotation, de nouveaux paramètres permettant la rotation du stéroïde dans le site actif ont été créés dans ZMM par le professeur Boris Zhorov (communications personnelles). Ces paramètres imposent une contrainte énergétique de rotation, qui applique un couple de force sur deux atomes également distancés d'un axe de rotation (figure 2.3). La pénalité d'énergie de la contrainte augmente avec la déviation entre l'angle de rotation virtuel  $\tau$  et l'angle de rotation cible, de sorte que la MC-minimisation amène le ligand à l'angle cible sous peine de grandement augmenter l'énergie du système. Pour mesurer la valeur de  $\tau$ , les coordonnées d'un atome relativement fixe du système sont utilisées comme référence. Bref, le protocole fonctionne d'une façon semblable au protocole de translation décrit plus haut; le ligand est d'abord déplacé à sa position  $d_s$ , ensuite la contrainte de rotation force le ligand à tourner sur l'axe pour atteindre l'angle cible au cours de la MCM puis cette dernière se poursuit pour que le modèle s'ajuste à la nouvelle conformation du ligand jusqu'à ce qu'une condition de terminaison soit remplie.

Ici, le couple de force est appliqué aux paires d'atomes C2-C4 et C12-C14, les atomes de ces paires étant équidistants à l'axe C3-C17. Le  $C_\alpha$  de Ser142 est utilisé comme point de référence à la mesure de l'angle rotationnel du stéroïde dans le tunnel de liaison. L'angle cible varie de 0 à 360° avec des pas de 15° et chaque étape est MC-minimisée trois fois plutôt que cinq comme pour la translation. D'ailleurs, la trajectoire est terminée si 1000 minimisations n'ont pas abaissé l'énergie du système, comparativement à 2000 pour les autres calculs (voir section 2.1 et tableau 2.1). Ces mesures ont été prises parce que la création d'une telle carte, avec un  $d_s$  allant de -5 à 2, requiert [ $8$  (*translation*)  $\times$   $25$  (*rotation*)  $\times$   $3$  (*MCM*)] = 600 trajectoires de MCM, ce qui est très long à calculer. Pour certains angles, le stéroïde peut être tordu à cause d'interactions stériques défavorables avec le récepteur, indiquant que les orientations correspondantes sont énergétiquement difficiles à atteindre ou tout simplement impossibles.



**Figure 2.3: Contraintes de force permettant la rotation du ligand dans le site de liaison du récepteur.** Pour l'estradiol, l'axe de rotation passe par les coordonnées cristallographiques des atomes C3 et C17 de la molécule. L'axe ainsi formé est équidistant des paires d'atomes C2-C4 et C12-C14, chaque paire faisant parti d'un axe perpendiculaire à l'axe de rotation. Le carbone  $\alpha$  de la sérine 142 est utilisé comme point de référence de la rotation pour un angle virtuel  $t = 0$ , de sorte que dans sa position cristallographique, E2 a un  $t = 15^\circ$ . Un couple de force est appliqué aux paires d'atomes (flèches), le couple se traduisant par une contrainte énergétique forçant  $t$  à adopter un angle cible sous peine d'augmenter l'énergie du système.

## 3.0 Résultats et discussion

### 3.1 Minimisations des complexes enzyme-stéroïde

#### 3.1.1 Minimisations des modèles de l'estradiol

La structure MC-minimisée de l'enzyme avec l'estradiol (modèle 1, tableaux 3.1 et 3.2) est en accord avec la structure cristallographique de départ (1A27) en dépit de quelques différences. Le cofacteur et la plupart des chaînes latérales ont gardé leurs positions observées dans la structure cristallographique alors que E2 est légèrement déplacé de sa position initiale. Plus précisément, le cycle aromatique du stéroïde est déplacé vers His221 par 0,5 Å et son cycle D est éloigné de Ser142 par 2,0 Å vers un espace vide près de la boucle flexible, se rapprochant ainsi des résidus Met193, Leu196, Tyr218 et Ser222. E2 s'est également distancé du cofacteur par ~1,0 Å (figures 3.1 et 3.2). L'énergie d'interaction totale de E2 avec 17β-HSD1 dans la structure minimisée est -18,3 kcal·mol<sup>-1</sup>. Il y a une certaine ressemblance entre cette orientation et celle de la testostérone dans l'enzyme (figure 1.5), où T n'est pas en position catalytique, mais dont la liaison est très stable (Gangloff *et al.*, 2003). Les plus grandes contributions d'énergie viennent des contacts de Van der Waals (VdW) avec les résidus Leu149, Val225, Pro187, Phe259 et Val143 (tableau 3.2). Parmi les résidus du site actif qui pourraient former des liens hydrogènes avec le stéroïde, seulement Glu282 le fait. Même s'ils ne forment pas de liens H, les résidus Ser142, His221 et Tyr155 réussissent néanmoins à stabiliser la liaison du ligand par des interactions électrostatiques favorables.

Les structures cristallographiques ainsi que d'autres données expérimentales démontrent clairement que les liens hydrogènes sont essentiels pour la liaison de l'estradiol et la réaction catalytique (Azzi *et al.*, 1996 ; Puranen *et al.*, 1997a ; Huang *et al.*, 2001). Les calculs exécutés pour la minimisation du modèle 1 n'ont formé qu'un seul lien hydrogène entre le ligand et le récepteur. Ceci peut être dû à deux raisons : (I) les complexes minimisés avec deux liens H ou plus n'ont pas été trouvés dans la recherche

conformationnelle par MCM ou (II) de tels complexes ont une énergie plus élevée que celle déterminée. Pour distinguer entre ces possibilités, les liens H suivants ont été biaisés dans des calculs subséquents par une contrainte : E2\_O3...Nε2\_His221, E2\_O3...Oε1\_Glu282, E2\_O17...Oγ\_Ser142 et E2\_O17...OH\_Tyr155. La contrainte force les atomes visés à être distants l'un de l'autre par 2,0 à 3,2 Å et n'implique pas les atomes d'hydrogène, laissant le protocole de MCM déterminer quels atomes sont les donneurs et les accepteurs des liens H.

Le modèle MC-minimisé avec les contraintes de liens H (modèle 2) a gardé l'estradiol dans la même position que dans la structure cristallographique, excepté pour le cycle A qui est légèrement plus près de His221 pour former un lien H fort. E2, dans ce modèle, forme les quatre liens H observés dans certaines structures cristallographiques et l'énergie d'interaction ligand-récepteur est seulement 1,5 kcal·mol<sup>-1</sup> plus élevée que l'énergie du modèle 1 (tableau 3.1). Ensuite, le complexe contraint est MC-minimisé une autre fois sans les contraintes de liaisons hydrogènes pour voir si elles seront conservées. Cette recherche de MCM a donné le modèle 3, dans lequel le ligand retourne presque à la même position que dans le modèle 1: le cycle D s'est éloigné de Ser142 tandis que le cycle A est resté plus près de His221. Les liens H du stéroïde avec Glu282 et Tyr155 ont été préservés dans le modèle 3, alors que ceux avec Ser142 et His221 ont été perdus. En dépit de cette perte, ces deux derniers résidus contribuent favorablement à l'énergie d'interaction stéroïde-enzyme, comme dans le modèle 1. Dans les modèles 1 et 3, Ser142, Val143, et Gly144 contribuent plus favorablement à l'interaction ligand-récepteur que dans le modèle 2, suggérant que ces résidus sont impliqués dans le déplacement de E2 vers la boucle flexible pendant la recherche de MCM. Dans la conformation où le stéroïde forme les quatre liens H, il se rapproche de ces trois résidus et ce rapprochement crée des interactions stériques non favorables, augmentant l'énergie de VdW de ces interactions.

**Tableau 3.1**  
**Énergies d'interaction (en kcal·mol<sup>-1</sup>) entre**  
**les ligands et le récepteur dans le mode de liaison normal**

Modèles	Total	Électro	VdW	H	Solv
<b>E2 (chargé)</b>					
1 Normal	-18,3	-4,5	-23,2	-0,7	10,0
2 Liens H	-16,8	-5,5	-21,9	-2,0	12,7
3 Relaxation	-19,2	-4,0	-24,2	-1,1	10,1
<b>E1</b>					
4 Normal	-17,4	-3,3	-24,3	-0,4	10,6
5 Liens H	-19,9	-7,5	-23,7	-1,7	13,0
6 Relaxation	-18,2	-2,8	-24,8	-0,7	10,2
<b>DHT</b>					
7 Normal	-11,8	-0,5	-18,2	-0,2	7,1
8 Liens H	-9,9	-0,8	-18,5	-1,2	10,6
9 Relaxation	-12,5	-2,2	-19,0	-0,5	9,2
<b>DHEA</b>					
10 Normal	-11,8	0,0	-18,7	0,0	6,8
11 Liens H	-11,8	-5,4	-16,2	-1,6	11,4
12 Relaxation	-10,8	-2,4	-17,0	-0,6	9,3
<b>T</b>					
13 Normal	-10,7	0,4	-19,6	-0,1	8,6
14 Liens H	-13,0	-0,7	-22,2	-1,4	11,3
15 Relaxation	-12,3	-0,3	-21,0	-0,7	9,7
<b>E2 (neutre)</b>					
16 Normal	-15,5	-1,2	-24,3	-0,2	10,2
17 Liens H	-16,4	-3,6	-23,6	-2,2	12,9
18 Relaxation	-16,4	-1,9	-25,1	-1,6	12,2

**Légende**

Total : Énergie d'interaction totale entre le ligand et le récepteur

Électro : Énergie d'interactions électrostatique entre le ligand et le récepteur

VdW : Énergie d'interactions Van der Waals entre le ligand et le récepteur

H : Énergie des liaisons hydrogènes entre le ligand et le récepteur

Solv : Énergie libre de désolvatation du ligand

Normal : Minimisation de la structure sans contrainte

Liens H : Minimisation de la structure en forçant la formation de liens hydrogènes

Relaxation : Minimisation sans contrainte de la structure obtenue avec « Liens H »

**Tableau 3.2**  
**Contribution énergétique des résidus (en kcal·mol<sup>-1</sup>)**  
**à l'énergie d'interaction ligand-récepteur pour le mode de liaison normal**

Modèles	V143	G144	L149	V225	F259	S142	Y155	H221	E282
<b>E2 (chargés)</b>									
1 Normal	-1,00	-0,30	-2,88	-2,05	-1,62	-0,92	-0,43	-0,56	-2,14
2 Liens H	-0,74	0,44	-2,47	-1,90	-1,88	-0,36	-0,44	-1,25	-2,28
3 Relaxation	-1,34	-0,15	-2,21	-2,07	-1,77	-0,66	-1,46	-1,02	-2,08
<b>E1</b>									
4 Normal	-0,93	-0,27	-2,77	-1,30	-1,48	-0,30	-0,70	-0,37	-2,91
5 Liens H	-0,83	0,43	-2,55	-1,88	-2,09	-1,00	-1,46	-1,16	-3,23
6 Relaxation	-1,06	-0,11	-2,49	-1,93	-1,67	-0,69	-2,08	-1,04	-0,18
<b>DHT</b>									
7 Normal	-1,13	-0,53	-0,65	0,00	-1,78	-0,68	-1,16	-0,58	2,31
8 Liens H	-0,51	0,93	-1,08	-0,22	-1,70	0,00	-1,33	-1,31	3,33
9 Relaxation	-1,06	0,00	-0,89	-0,78	-1,47	-0,75	-1,12	-0,62	1,24
<b>DHEA</b>									
10 Normal	-1,12	-0,36	-1,32	-1,51	-1,58	0,00	-0,48	-0,31	1,01
11 Liens H	-0,43	0,70	1,01	1,01	-1,99	-0,20	-1,97	-1,35	-1,57
12 Relaxation	-1,25	-0,22	0,76	-0,81	-1,44	-0,78	-0,23	-0,44	-1,20
<b>TES</b>									
13 Normal	-1,05	-0,52	0,00	-1,44	-1,13	-0,51	-0,63	-0,14	1,44
14 Liens H	-0,64	0,32	-0,33	-1,42	-1,70	-0,29	-1,42	-2,04	4,13
15 Relaxation	-1,09	0,00	-0,53	-1,28	-0,88	-0,69	-0,22	-2,07	2,68
<b>E2 (neutres)</b>									
16 Normal	-0,90	-0,52	-1,98	-1,67	-1,98	-0,81	-0,96	0,00	0,66
17 Liens H	-0,94	0,40	-2,81	-1,99	-1,78	-0,51	-1,29	-1,46	-0,79
18 Relaxation	-1,35	0,37	-2,84	-1,94	-1,75	0,22	-1,35	-1,18	-0,72

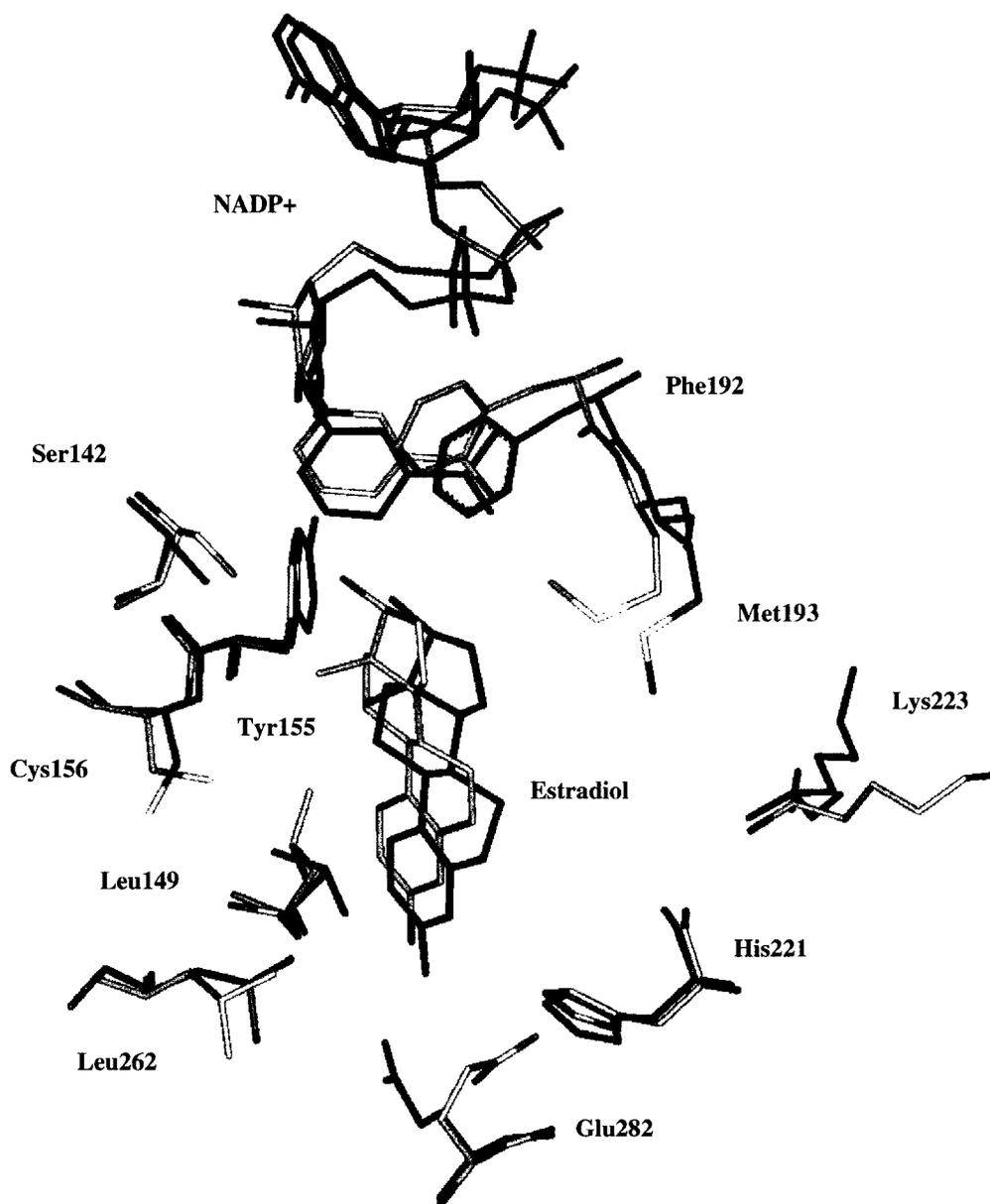
### Légende

Valeurs rouge : Résidus formant une liaison hydrogène avec le stéroïde.

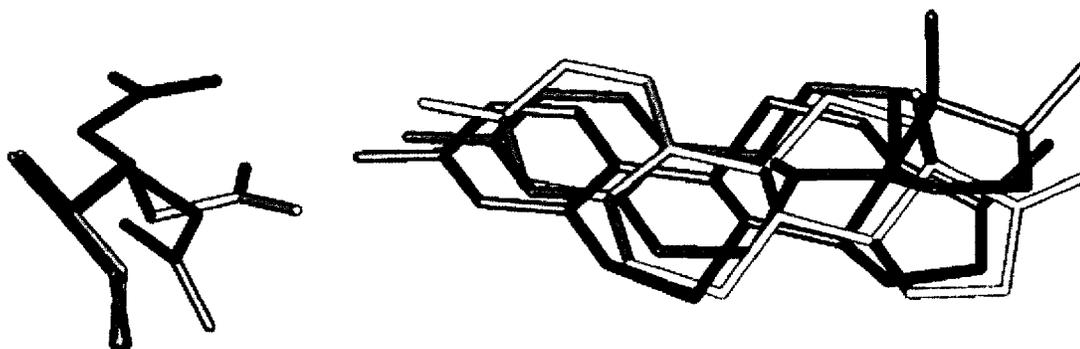
Normal : Minimisation de la structure sans contrainte

Liens H : Minimisation de la structure en forçant la formation de liens hydrogènes

Relaxation : Minimisation sans contrainte de la structure obtenue avec « Liens H »



**Figure 3.1: Déplacements de l'estradiol et des chaînes latérales des acides aminés dans la MCM normale (modèle 1).** La superposition de la structure cristallographique (orange) et du modèle MCM (vert) montre clairement le déplacement de E2 vers l'entrée du site de liaison (Glu282, His221) et vers la boucle flexible (Met193). On peut également observer la plupart des changements des chaînes latérales pour Leu149, Cys156, Met193, Lys223, Leu262 et Glu282 mentionnés plus bas (section 3.6).



**Figure 3.2: Orientations de la chaîne latérale de Glu282.** Le modèle orange a été pris dans la structure cristallographique initiale 1A27 (Mazza *et al.*, 1998), le bleu dans la MCM sans contrainte avec l'estradiol (modèle 1) et le jaune dans la MCM sans contrainte avec l'estrone (modèle 4). La chaîne latérale de Glu282 est considérée en dehors du site de liaison dans le modèle orange. On la considère à l'intérieur du site actif quand elle se dirige vers le stéroïde, comme observé avec le modèle jaune. Ce sont les deux conformations généralement observées dans toutes les structures cristallographiques de la 17 $\beta$ -HSD1. Le modèle bleu représente une troisième conformation, seulement observée dans les simulations de ce travail. À noter également l'orientation de l'estrone (jaune), qui est déplacé comme l'estradiol du modèle 1 comparativement au ligand de la structure cristallographique (orange) (voir sections 3.1.1 et 3.1.2).

### 3.1.2 Minimisations des complexes avec E1, DHT, DHEA et T

Les modèles minimisés avec les autres stéroïdes ont plusieurs ressemblances avec ceux de E2. Dans les modèles avec E1, DHT, DHEA et T, le cycle D est décalé vers la boucle flexible mais les ligands ne sont pas éloignés du cofacteur. Glu282 est partiellement ou presque totalement exposé au solvant dans tous les modèles excepté celui avec E1, où la chaîne latérale du résidu se tourne vers l'intérieur du site actif et forme un lien H avec le stéroïde (figure 3.2). Tous les stéroïdes ont été MC-minimisés avec des contraintes de liaison H et ensuite re-minimisé sans contrainte. Dans les modèles contraints, la

comparaison de chacun des stéroïdes montre que seulement E1 et E2 ont formé quatre liens H avec l'enzyme (tableau 3.2, modèles 2, 5, 8, etc.). En raison de l'interaction électrostatique favorable de  $-7,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , E1 dans le modèle 5 a l'énergie d'interaction la plus forte parmi tous les stéroïdes considérés dans ce travail. Après la MCM sans contrainte (modèle 6), E1 garde des liens H avec Tyr155 et His221 seulement.

### 3.1.3 La formation des liens H dans les modèles

Pour presque tous les stéroïdes considérés dans ce travail, les conformations des ligands avec des liens H, observées dans les structures cristallographiques, ne sont pas les conformations les plus basses en énergie trouvées dans les modélisations. Entre autres, les minimisations faites sans forcer la formation des liens H éloignent toujours le cycle D de Ser142 en poussant le stéroïde vers la boucle flexible (figure 3.1). Quand le lien H avec Ser142 est imposé par les contraintes, seuls E1, E2 et T peuvent former ce lien. Tous les stéroïdes, sauf E1, peuvent donner leur hydrogène à Ser142 à cause de leur groupement hydroxyle. Cependant, la sérine est un meilleur donneur d'hydrogène qu'un accepteur (McDonald et Thornton, 1994) et son interaction avec un accepteur serait donc beaucoup plus efficace.

Lors de la re-minimisation (modèles 3, 6, 9, etc.), les stéroïdes gardent des liaisons H avec un ou deux résidus, habituellement avec Tyr155, His221 ou Glu282, mais ils en gardent rarement trois ou quatre. Chacun des quatre liens H peut être imposé par des contraintes, mais quand ces contraintes sont enlevées, les stéroïdes perdent un ou deux liens H. Ces résultats ressemblent à ceux d'une précédente étude sur les pharmacophores du récepteur des œstrogènes, selon laquelle les atomes d'oxygènes de l'estradiol forment généralement chacun un seul lien H parce que les géométries du site de liaison et du ligand ne seraient pas favorables à la formation de quatre liens H dans cette protéine (Anstead *et al.*, 1997). Les liaisons H sont les seules interactions non-covalentes qui ont une directionnalité et, pour cette raison, les positions des atomes d'oxygène des stéroïdes par rapport aux atomes donneurs-accepteurs des résidus du site actif sont très importantes pour l'optimisation des liaisons hydrogènes (Grishkovskaya *et al.*, 2002). Il pourrait donc être

possible que les stéroïdes, à l'exception de E1 (voir ci-dessous, section 3.1.4), n'aient pas un positionnement optimal pour la formation des liens H.

Outre la disposition inappropriée des atomes d'oxygène, la perte des liaisons H dans les modèles pourrait refléter le fait que l'enzyme doit augmenter l'énergie du système pour faciliter le passage vers l'état de transition. Les énergies présentées dans ce travail sont les interactions ligand-récepteur. Or, le protocole de MCM trouve les conformations les plus basses pour l'énergie totale du complexe, mais pas le minimum de l'énergie d'interaction ligand-récepteur. L'analyse des énergies totales des conformations (résultats non présentés) montre qu'elles sont toujours plus élevées pour les modèles contraints (modèles 2, 5, 8, etc.) que pour les autres. Ceci serait conforme au rôle catalytique des enzymes. En plus de diminuer l'énergie de transition en augmentant l'affinité de l'état de transition au site actif, les enzymes élèvent également l'énergie initiale du système pour faciliter le transfert du substrat en produit. Ce phénomène s'observe surtout en regardant plus précisément les résultats obtenus avec E1 (section 3.1.4). De plus, la structure cristallographique pourrait représenter un état d'énergie plus élevé, plus près de la conformation de transition (Ma *et al.*, 2002), expliquant ainsi pourquoi les conformations MC-minimisées varient toujours de la conformation initiale de la structure cristallographique (voir section 3.1.5).

### 3.1.4 Préférence de l'enzyme pour l'estrone

Aucune structure cristallographique n'a été obtenue jusqu'à maintenant avec E1, le substrat le plus réactif de l'enzyme, et les modèles de ce stéroïde fournissent des informations intéressantes sur l'affinité et la spécificité de liaison de la 17 $\beta$ -HSD1. Parmi tous les stéroïdes modélisés, E1 a obtenu la plus basse énergie d'interaction dans sa conformation avec les quatre liens H contraints, alors que les autres modèles contraints montraient une élévation de l'énergie d'interaction. En d'autres termes, E1 a plus de facilité que les autres stéroïdes à adopter une conformation optimale pour la formation de quatre liaisons H avec les résidus Ser142, Tyr155, His221 et Glu282. Ces résultats montrent que E1 est le stéroïde avec le meilleur positionnement des atomes d'oxygène pour former des liaisons hydrogènes avec l'enzyme. Il est également le seul stéroïde pouvant former un fort

lien H avec Ser142 parce que le groupement cétone joue le rôle d'accepteur. Ce résultat est en accord avec une autre étude théorique portant sur les pharmacophores de la 17 $\beta$ -HSD1, où seulement E1 peut faire un lien H avec Ser142 (Hoffren *et al.*, 2001).

L'aisance de E1 à former des liens H avec l'enzyme pourraient expliquer, en partie, le  $k_{cat}$  plus élevé de la 17 $\beta$ -HSD1 pour l'estrone comparativement aux  $k_{cat}$  de l'estradiol et des androgènes. Les valeurs de  $k_{cat}$  sont 2,9 et 2,0 s<sup>-1</sup> pour les réactions E1-NADPH et E2-NADP<sup>+</sup> respectivement (Jin et Lin, 1999). Les résultats de Gangloff *et al.* (2001) donnaient des  $k_{cat}$  de 1,5, 0,47 et 0,2 s<sup>-1</sup> pour les réactions E1-NADPH, DHEA-NADP<sup>+</sup> et DHT-NADPH respectivement. Tout en restant dans un ordre de valeurs semblables, les  $k_{cat}$  publiés par Han *et al.* (2001) sont de 5,8, 4,4, 0,33 et 0,16 s<sup>-1</sup> pour E1, E2, DHEA et DHT respectivement. Les énergies d'interaction ligand-récepteur obtenues dans les trajectoires de MCM avec les contraintes de liens H sont -19,9, -16,8, -11,8 et -9,9 kcal·mol<sup>-1</sup> pour E1, E2, DHEA et DHT respectivement. La corrélation entre les  $k_{cat}$  et les énergies d'interaction est notable. L'imposition des quatre liaisons H par des contraintes dans ces modélisations était une tentative de simulation de la conformation du stéroïde dans la structure cristallographique, qui est très près de la conformation catalytique. Cette conformation est instable *in vitro* et *in silico*. Les résultats de ce travail montrent que cette énergie de « l'état de transition » enzyme-substrat corrèle mieux avec  $k_{cat}$  que l'énergie d'une MCM normale.

### 3.1.5 Différences entre la structure cristallographique et les modèles

La conformation de chaque modèle, obtenue dans les modélisations présentées dans ce travail, varie de la conformation initiale. Plusieurs autres calculs ont été faits avec des nombres aléatoires de départ différents, générant plusieurs modèles différents pour un même stéroïde. Deux de ces calculs sont présentés à l'annexe I. Le fait de changer le nombre aléatoire de départ fait en sorte que le protocole de MCM adopte une trajectoire différente pour chaque calcul, donnant lieu à des modèles différents. Ces différences reflètent ainsi le fait que les conformations des protéines se déplacent toujours d'un minimum local à l'autre sur une surface d'énergie raboteuse (James et Tawfik, 2003). Ces modèles ne sont pas présentés ici, mais une observation globale de chacun révèle qu'ils ont

tous certaines caractéristiques semblables pour un même stéroïde (et même pour différents stéroïdes), ces caractéristiques étant observées et décrites dans ce travail. Cette convergence des observations de plusieurs trajectoires de MCM démontre l'efficacité de la méthode à trouver les minima locaux d'une conformation de base. Par exemple, parmi les calculs non présentés, certains modèles avec E1 contraint gardaient le stéroïde exactement dans la même orientation lors de la re-minimisation de l'énergie sans contrainte, montrant que la contrainte avait placé le modèle dans une conformation minimale et que E1 était plus stable que les autres stéroïdes dans cette conformation (voir annexe I). Bref, lors de l'étude de la structure d'une protéine, il serait préférable de procéder en regardant le plus de conformations possible pour cette protéine, car une seule image ne révèle que peu d'informations quant à sa dynamique, un aspect très important pour l'activité des protéines (Carlson et McCammon, 2000). La création de plusieurs modèles avec le protocole de MCM peut aider à contrer le manque de structures disponibles pour une protéine.

### 3.2 Modèles des stéroïdes liés en mode alternatif

Le mode alternatif dont il est question ici consiste à l'inversion de l'orientation du stéroïde de sorte que les positions de O3 et O17 sont interchangées (figure 1.5). E2 et E1 dans ce mode ont une énergie d'interaction ligand-récepteur plus élevée que dans le mode de liaison normal, alors que les différents modes de liaison de DHT et de DHEA ont une énergie semblable. La testostérone a une meilleure énergie d'interaction dans le mode alternatif que dans le mode normal, mais la différence d'énergie entre ces deux modes est plus petite que la différence d'énergie entre les modes de E1 et E2. Les énergies d'interaction des stéroïdes liés en mode normal sont -18,3, -17,4, -11,8, -11,8 et -10,7 kcal·mol<sup>-1</sup> pour E2, E1, DHT, DHEA et T respectivement tandis que pour le mode alternatif, les énergies sont -14,1, -12,4, -10,9, -12,6 et -13,2 kcal·mol<sup>-1</sup> pour le même ordre des stéroïdes (tableaux 3.1 et 3.3). La contribution des résidus à l'énergie de liaison est montrée dans les tableaux 3.2 et 3.4. Comme prévu selon les observations précédentes (Han *et al.*, 2000 ; Nahoum *et al.*, 2003), Leu149 et Val225 interagissent fortement avec les cycles aromatiques de E1 et E2 liés en mode normal, mais interagissent défavorablement avec leur mode de liaison alternatif. Pour les androgènes, peu importe leur mode de liaison, la contribution énergétique de ces résidus est plus faible de 0,8 à 3,0 kcal·mol<sup>-1</sup> par rapport aux œstrogènes en mode normal. Glu282 interagit toujours mal avec les groupements cétone, déstabilisant DHT et T en liaison normale et E1 et DHEA dans le mode alternatif (voir section 3.6.3). Ser142, Gly144 et Tyr155 interagissent faiblement avec les stéroïdes inversés, laissant croire qu'ils pourraient eux aussi avoir un rôle dans la discrimination du mode de liaison alternatif. Encore une fois, la position non-optimale de O3 comparativement à O17 pourrait expliquer la faible interaction des stéroïdes en mode alternatif avec Ser142 et Tyr155. En plus, Gly144, qui interagit habituellement bien avec le C18 des œstrogènes, interagit moins bien avec les œstrogènes inversés à cause d'une cavité créée près de ce résidu par l'absence d'un groupement méthyle attaché au cycle A. Gly144 interagit également moins bien avec les androgènes inversés parce que le C19 est plus éloigné du résidu que l'est le C18 dans le mode de liaison normal, diminuant la force d'interaction entre Gly144 et le groupement méthyle C19.

La comparaison des modèles avec les stéroïdes dans leurs modes de liaison normal et alternatif montrent qu'ils adoptent tous une orientation semblable dans le tunnel de liaison, cette orientation étant celle de l'estradiol avec la déviation de son cycle D vers la boucle flexible (figure 3.1). Chaque stéroïde a quand même ses particularités, comme les androgènes qui doivent être légèrement tournés pour diminuer les interactions défavorables entre leur C19 et les résidus Leu149 et Val225. D'ailleurs, l'énergie de liaison des androgènes est généralement plus haute que celle des œstrogènes par 6-9 kcal·mol<sup>-1</sup>. La faible énergie de liaison des androgènes était prévisible, compte tenu des résultats expérimentaux précédemment obtenus (Han *et al.*, 2000 ; Gangloff *et al.*, 2003). La modélisation montre que la hausse de l'énergie d'interaction est provoquée non seulement par des interactions de Van der Waals défavorables, mais également par des interactions électrostatiques défavorables (tableaux 3.1 et 3.3).

La différence d'énergie des modes de liaisons normal et alternatif est petite pour les androgènes (habituellement moins de 1,5 kcal·mol<sup>-1</sup>), mais elle est de 4-5 kcal·mol<sup>-1</sup> pour E1 et E2. Ces résultats sont conformes au fait que des œstrogènes liés à la 17β-HSD1 en mode alternatif n'ont jamais été observés expérimentalement. Cependant, les énergies de liaison obtenues par ces calculs suggèrent que la liaison alternative des œstrogènes est également possible, mais moins souvent qu'elle se produit probablement pour des androgènes. Il est intéressant de voir que les interactions électrostatiques et Van der Waals de l'enzyme avec les androgènes favorisent leur liaison en mode alternatif, ce qui pourrait expliquer la prédominance de ce mode de liaison des androgènes dans les structures cristallographiques (Gangloff *et al.*, 2003 ; Shi et Lin, 2004). C'est également en accord avec les données de cinétique enzymatique de Gangloff *et al.* (2003), lesquelles montrent que la DHT peut lier dans les modes normal et alternatif. D'ailleurs, la modélisation montre que la testostérone a de meilleures énergies d'interaction lorsqu'en mode alternatif, fait qui est conforme également aux données cristallographiques de Gangloff *et al.* (2003).

**Tableau 3.3**  
**Énergies d'interaction (en kcal·mol<sup>-1</sup>) entre**  
**les ligands et le récepteur dans le mode de liaison alternatif**

Modèles	Total	Électro	VdW	H	Solv
<b>E2 inversé</b>					
19 Normal	-14,1	-4,0	-18,3	-1,0	9,1
20 Lien H	-13,1	-6,0	-16,9	-2,0	11,8
21 Relaxation	-11,0	-1,9	-18,3	-0,3	9,6
<b>E1 inversé</b>					
22 Normal	-12,4	-0,5	-19,6	-0,5	8,2
23 Lien H	-11,4	-0,6	-20,9	-1,5	11,5
24 Relaxation	-12,0	1,1	-22,1	-0,9	10,0
<b>DHT inversé</b>					
25 Normal	-10,9	-2,2	-16,8	-0,5	8,2
26 Lien H	-10,1	-5,7	-15,2	-1,3	12,1
27 Relaxation	-12,4	-5,8	-15,4	-1,5	10,3
<b>DHEA inversé</b>					
28 Normal	-12,6	-1,3	-19,4	-0,3	8,4
29 Lien H	-7,7	-0,9	-16,6	-1,0	10,8
30 Relaxation	-12,2	-1,6	-19,5	-0,7	9,6
<b>T inversé</b>					
31 Normal	-13,2	-1,3	-20,3	-0,5	8,9
32 Lien H	-13,9	-5,9	-18,4	-1,4	11,9
33 Relaxation	-14,3	-2,7	-21,0	-0,9	10,4

**Légende**

Total : Énergie d'interaction totale entre le ligand et le récepteur

Électro : Énergie d'interactions électrostatique entre le ligand et le récepteur

VdW : Énergie d'interactions Van der Waals entre le ligand et le récepteur

H : Énergie des liaisons hydrogènes entre le ligand et le récepteur

Solv : Énergie libre de désolvation du ligand

Normal : Minimisation de la structure sans contrainte

Liens H : Minimisation de la structure en forçant la formation de liens hydrogènes

Relaxation : Minimisation sans contrainte de la structure obtenue avec « Liens H »

**Tableau 3.4**  
**Contribution énergétique des résidus (en kcal·mol<sup>-1</sup>)**  
**à l'énergie d'interaction ligand-récepteur pour le mode de liaison alternatif**

<b>Modèles</b>	<b>V143</b>	<b>G144</b>	<b>L149</b>	<b>V225</b>	<b>F259</b>	<b>S142</b>	<b>Y155</b>	<b>H221</b>	<b>E282</b>
<b>E2 inversé</b>									
<b>19</b> Normal	-0,55	-0,57	-1,78	-0,14	-1,70	0,00	-0,49	-1,33	-2,42
<b>20</b> Liens H	0,46	-0,38	-1,21	1,04	-2,71	-0,72	-0,16	-1,29	-2,15
<b>21</b> Relaxation	-0,41	-0,36	-1,54	0,92	-2,38	-0,19	0,13	-0,15	-1,87
<b>E1 inversé</b>									
<b>22</b> Normal	-0,42	-0,32	-1,12	-0,58	-1,76	-0,17	-0,21	-0,79	0,00
<b>23</b> Liens H	-0,75	-0,50	-1,49	-0,36	-2,71	-0,55	0,00	0,34	1,86
<b>24</b> Relaxation	-0,26	-0,30	-1,32	-0,44	-1,80	0,00	-0,77	-0,49	1,13
<b>DHT inversé</b>									
<b>25</b> Normal	-0,71	0,00	0,00	0,51	-1,13	0,00	-0,37	-0,27	-2,55
<b>26</b> Liens H	0,00	-0,33	0,60	1,26	-2,46	0,37	-1,11	0,21	-2,12
<b>27</b> Relaxation	-0,71	-0,18	0,12	1,36	-2,35	0,00	-1,62	-0,35	-2,16
<b>DHEA inversé</b>									
<b>28</b> Normal	-0,56	-0,60	-1,74	-1,05	-1,18	0,00	-0,59	-0,52	0,83
<b>29</b> Liens H	-1,31	0,54	-0,61	-0,64	-2,24	0,59	-0,80	0,58	2,51
<b>30</b> Relaxation	-1,05	-0,30	-0,43	-0,51	-2,31	-0,55	-1,35	-1,56	2,13
<b>TES inversé</b>									
<b>31</b> Normal	-0,85	-0,45	-0,17	0,61	-2,35	0,00	-0,31	-1,50	-0,81
<b>32</b> Liens H	-0,89	-0,21	0,74	0,73	-2,99	0,00	-1,54	-1,08	-2,31
<b>33</b> Relaxation	-0,28	-0,38	-0,60	1,00	-2,18	-0,12	-1,73	-1,24	-2,15

### Légende

Valeurs rouge : Résidus formant une liaison hydrogène avec le stéroïde

Normal : Minimisation de la structure sans contrainte

Liens H : Minimisation de la structure en forçant la formation de liens hydrogènes

Relaxation : Minimisation sans contrainte de la structure obtenue avec « Liens H »

On observe les modes de liaison alternatifs ou multiples de plus en plus dans les protéines et les enzymes. La 17 $\beta$ -HSD1 n'est pas la première protéine stéroïdogénique ayant un mode alternatif. En effet, on suspecte fortement les anticorps anti-stéroïdes de lier différents stéroïdes en modes alternatifs inversés comme observé avec la 17 $\beta$ -HSD1 (Apostolakis *et al.*, 1997) et les structures cristallographiques de la SHBG montrent que les œstrogènes et les androgènes lient à la protéine dans une orientation renversée, c'est-à-dire qu'il y a un changement des faces  $\alpha$  et  $\beta$  (Grishkovskaya *et al.*, 2002). Même chose pour la DHEA sulfotransférase (DHEA-ST), où les deux substrats principaux de l'enzyme (ADT et DHEA) lient l'enzyme dans des conformations renversées (Rehse *et al.*, 2000 ; Chang *et al.*, 2004). Malgré le fait qu'on observe à peine les modes de liaison multiples expérimentalement, ils doivent être considérés dans la conception de médicaments. Pour certaines protéines, plusieurs inhibiteurs ayant une structure semblable à celle du ligand naturel sont connus pour lier le site actif dans une orientation différente (Apostolakis *et al.*, 1997 ; Lange *et al.*, 2002). Le mode alternatif est peut-être moins important dans la conception de médicaments pour la 17 $\beta$ -HSD1, étant donné qu'elle est fortement spécifique aux œstrogènes et que le mode de liaison alternatif est loin d'être énergétiquement favorisé, mais il pourrait être très important de considérer ces modes alternatifs dans la conception d'inhibiteurs stéroïdaux pour les protéines spécifiques aux androgènes puisque la pseudo-symétrie est davantage prononcée chez les stéroïdes C19.

### 3.3 Minimisations des modèles de l'estradiol avec les résidus neutres

Des résultats semblables au modèle 1 ont été obtenus avec le modèle 16, qui a été minimisé de la même façon, mais avec des résidus neutres, c'est-à-dire que les résidus Arg, Asp, Glu et Lys sont dans leur état non-ionisé (tableau 3.1). Comme dans le modèle 1, l'estradiol est décalé du cofacteur par 0,5 Å et le cycle D est déplacé vers la boucle flexible par 1,1 Å. Les énergies d'interaction sont semblables entre les modèles 1 et 16 excepté l'énergie électrostatique, qui est meilleure dans le modèle 1, donnant au total une meilleure énergie d'interaction pour ce modèle. L'énergie totale des interactions pour le modèle 16 est  $-15,5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  comparée à  $-18,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  dans le modèle 1 (tableau 3.1). Les modèles 17 et 18, qui sont analogues aux modèles 2 et 3, ont aussi été créés et MC-minimisés. Le modèle 18 forme les mêmes liens H que le modèle 3. Cependant, aucun lien H n'a été observé dans le modèle 17 et Glu282 interagit défavorablement avec E2. Comme dans le modèle 1, Ser142 et His221 contribuent aussi à l'énergie de liaison dans le modèle 16, mais moins que les résidus hydrophobes formant des contacts de van der Waals (tableau 3.2).

En dépit du manque de contre-ions dans le modèle avec les résidus chargés, les résultats obtenus sont semblables à ceux du modèle avec les résidus neutres, montrant que l'utilisation de résidus chargés ne changent pas significativement les résultats. L'inconvénient principal de l'emploi des résidus chargés est que les énergies d'interactions électrostatiques avec ces résidus sont exagérées, comme c'est le cas entre Glu282 et les stéroïdes. En raison de sa charge, Glu282 a une interaction plus prononcée que His221 avec le ligand. Dans des calculs précédents, His221 avait une contribution plus élevée à l'énergie ligand-récepteur (Zhorov et Lin, 2000). Les modèles avec les résidus neutres montrent également une meilleure interaction avec His221 qu'avec Glu282 (Tableau 3.2). Les résultats de ce travail montrent que les calculs avec les résidus ionisés donnent une meilleure corrélation avec les expériences que des calculs avec les résidus neutres. Si on tient compte des interactions exagérées d'un tel modèle et qu'on les analyse avec modération, ce travail montre qu'il est préférable d'utiliser un modèle avec des résidus chargés.

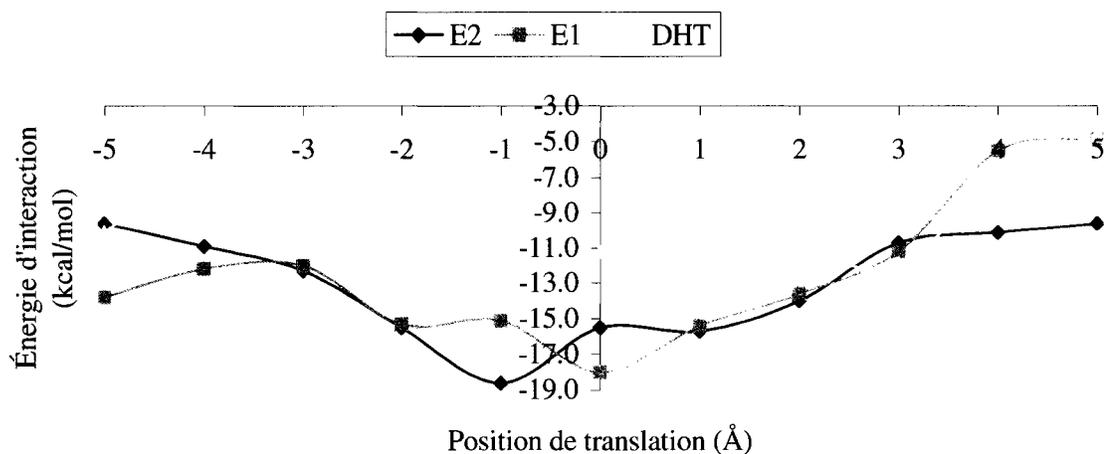
### 3.4 Profils d'énergie de la translation de E2, E1 et DHT

#### 3.4.1 Observations et comparaisons générales des profils de translation

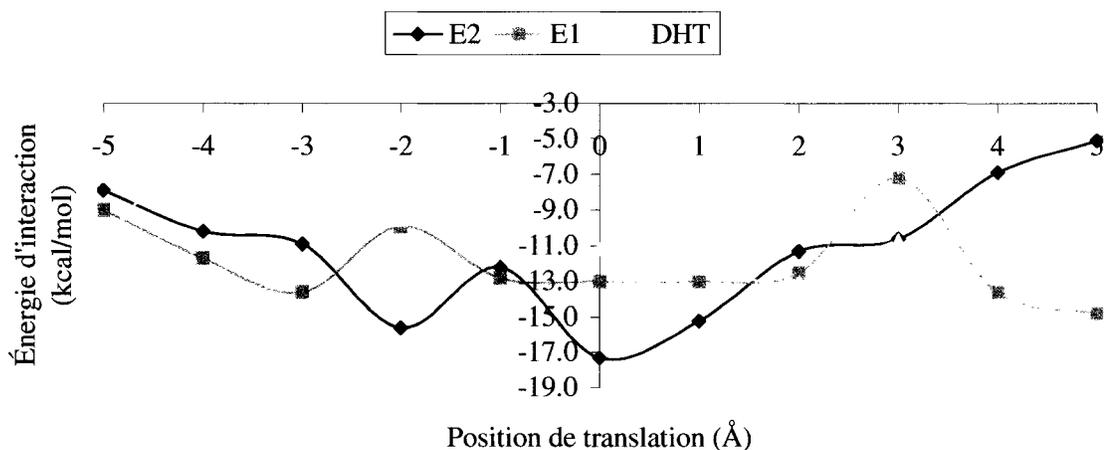
Les trajectoires de translation des stéroïdes testés sont très semblables, autant dans le mode de liaison normal et alternatif, mais leur profil énergétique sont cependant différents (figures 3.3a et 3.3b). Les stéroïdes ont des orientations et des comportements semblables le long du site de liaison (positions -3 jusqu'à 3), mais les extrémités de la trajectoire (positions -5, -4, 4 et 5) sont différentes. E1 et E2 dans leur mode de liaison normal ont généralement une meilleure énergie de liaison que la DHT, particulièrement pour les positions -3 jusqu'à 3 (figures 3.3a). Leur minimum d'énergie sont aux position  $d_s = 0$  pour E1 et  $d_s = -1$  pour E2, le minimum de E2 correspondant à la position du stéroïde dans le modèle 1 (voir section 3.1.1). Au lieu de converger vers un minimum autour de la position  $d_s = 0$ , la DHT a un profil d'énergie relativement plat, allant des positions  $d_s = -3$  à  $d_s = 3$  avec deux minima à  $d_s = -1$  et  $d_s = 3$ .

Les énergie de E1 et E2 dans le mode alternatif sont plus élevées que dans le mode normal, alors que celles de DHT sont semblables dans les deux modes (figures 3.3a et 3.3b). La translation du mode alternatif donne généralement un profil d'énergie avec plus de relief que dans le mode normal (figure 3.3b). E1 en mode alternatif a un profil plat autour de  $d_s = 0$  tandis que E2 a 2 minimum, aux positions -2 et 0. E2 conserve une énergie relativement bonne parce qu'il peut former de 3 à 4 liens H avec le récepteur (voir les tableaux 3.2 et 3.4). Le mode alternatif de la DHT a un léger plateau avec un minimum à la position 2. En dépit de la pseudo-symétrie de la DHT, les minima des modes de liaison normal et alternatif ne sont pas les mêmes. Quand les profils a) et b) sont comparés (figure 3.3), ils montrent que, dans le mode alternatif, les trois stéroïdes ont un profil d'énergie relativement semblable à celui de DHT dans le mode de liaison normal, supposant que dans le mode alternatif, les œstrogènes ont des interactions semblables à celle des androgènes. Les androgènes ont des interactions similaires dans les deux modes de liaison, mais il y a quand même quelques différences.

a) Mode de liaison normal



b) Mode de liaison alternatif



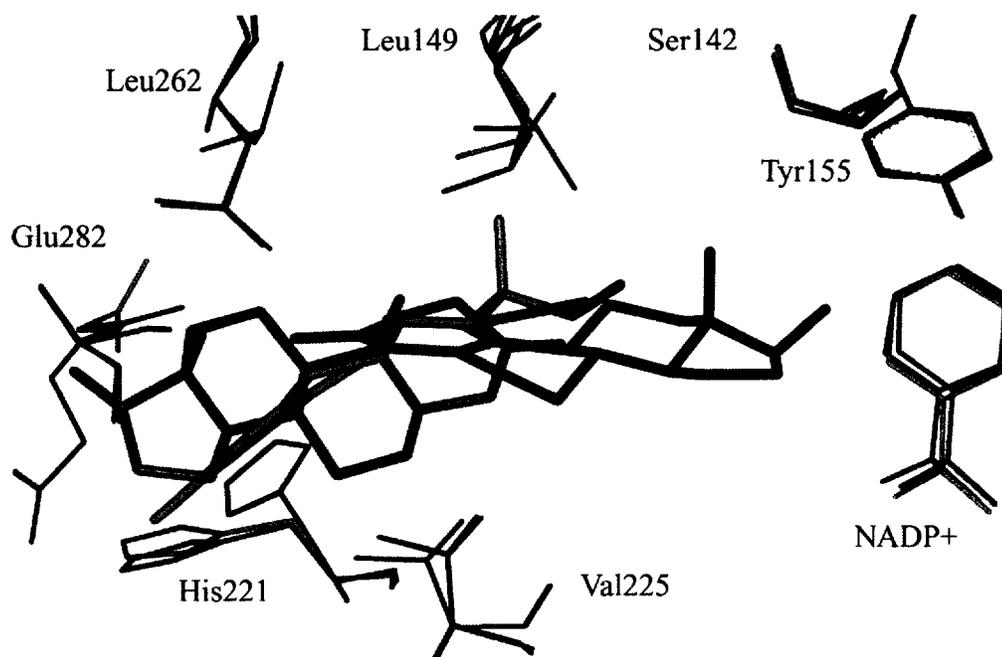
**Figure 3.3 : Comparaison des profils d'énergie de E2, E1 et DHT en fonction de leur position dans le tunnel de liaison.** a) Le profil d'énergie des stéroïdes dans le mode de liaison normal montre clairement que E1 et E2 ont plus de facilité que DHT à se déplacer dans le site de liaison. b) Dans le mode alternatif, la distinction entre les trois stéroïdes est beaucoup moins évidente à cause de leur profil d'énergie plus semblable.

En présence du cofacteur, le ligand peut très difficilement dépasser la position 3 parce que le cofacteur, qui est pratiquement immobile, bloque l'avancement du ligand. La figure 3.3 montre une augmentation de l'énergie un peu plus abrupte pour la plupart des stéroïdes. Cette montée est généralement plus évidente dans d'autres modèles (résultats non

montrés), car les résultats montrés dans ce travail sont uniquement les modèles dont l'énergie d'interaction est la plus basse (voir section 2.3). En positions 4 et 5, le cycle D du ligand (ou le cycle A pour les translations en mode alternatif) fonce dans le cycle du nicotinamide ou celui de Tyr155, créant de fortes interactions stériques défavorables menant à des énergies élevées. Il y a deux exceptions à cette observation. La première est la liaison normale de E2, dont l'énergie d'interaction en positions 4 et 5 est 3-8 kcal·mol<sup>-1</sup> inférieure à celle des autres stéroïdes à ces positions à cause de l'énergie de solvation. La deuxième exception est le mode de liaison alternatif de E1, dont la baisse d'énergie aux positions  $d_s = 4$  et  $d_s = 5$  est provoquée par un empilement du cycle aromatique du stéroïde avec le cycle nicotinamide du cofacteur, formant une interaction  $\pi$ - $\pi$  favorable.

### 3.4.2 Entrée du ligand dans le site actif

La comparaison des orientations des stéroïdes aux positions -5 et -4 montre que le ligand peut se déplacer dans site de liaison de deux façons différentes. Dans la première, déjà décrite par Zhorov et Lin (2000), le stéroïde entre dans le site de liaison entre les résidus Arg258, Leu262 et Glu282. Il suit alors la forme incurvée du tunnel, tournant autour de son axe longitudinal par  $\sim 45$ - $60^\circ$  pour s'ajuster au tunnel. Dans la deuxième, le stéroïde ne suit pas la forme incurvée du tunnel, mais va de la position -5 à 0 en ligne droite, passant entre Val283 et Val225 et beaucoup plus près de His221 que dans la première voie. Ici, le stéroïde ne tourne pas sur son axe longitudinal, mais il se plie pour entrer dans le site de liaison, c'est-à-dire que le stéroïde se tord de sorte que les cycles A et B ne sont plus en ligne avec les cycles C et D (figure 3.4). Cette conformation inhabituelle a déjà été observée dans une précédente étude de modélisation (Wiese et Brooks, 1994). Peu importe la voie, il semble toujours y avoir une petite élévation d'énergie autour des positions -4 et -3 en raison de l'interaction défavorable du C18 des stéroïdes avec Leu149 et Val225. Cependant, contrairement à ce qui a été proposé par Zhorov et Lin (2000), la présente simulation semble montrer que le ligand n'entrerait pas dans le site actif par l'entrée His221-Glu282.



**Figure 3.4: Déplacements des stéroïdes dans le site de liaison.** Le stéroïde vert est E2 du Model 1, pour servir de référence à la position  $d_s = 0$ . Le stéroïde bleu-clair est à la position  $d_s = -5$  de la translation de l'estradiol, représentant l'entrée pliée du stéroïde dans le site de liaison. La pliure semble être provoquée en partie par le cycle A emprisonné entre Val225 et Val283 (résidu absent dans la figure). Le stéroïde rouge a été pris à la position -5 de la translation en mode alternatif de DHT.

Aux positions 0 à 3, les résidus Ser142, Val143 et Gly144 semblent pousser le stéroïde vers un espace vide près de la boucle flexible, comme s'il s'agissait d'une sortie pour le ligand. Suite à cette observation, une autre translation du ligand passant à travers l'ouverture de la boucle a été simulée en utilisant une structure dont la boucle est ouverte (1IOL, tirée de Azzi *et al.*, 1996). La simulation montre que le ligand pourrait facilement entrer dans le site actif par ce chemin, comme il a précédemment été suggéré par Ghosh et Vihko (2001). Ces résultats sont présentés en annexe (annexe I.C), car le modèle et les paramètres sont légèrement différents de ceux utilisés pour les autres résultats présentés ici et plusieurs autres calculs seraient nécessaires pour faire une observation plus globale. De plus, la comparaison de ce résultat avec les deux inhibiteurs publiés soutient fortement

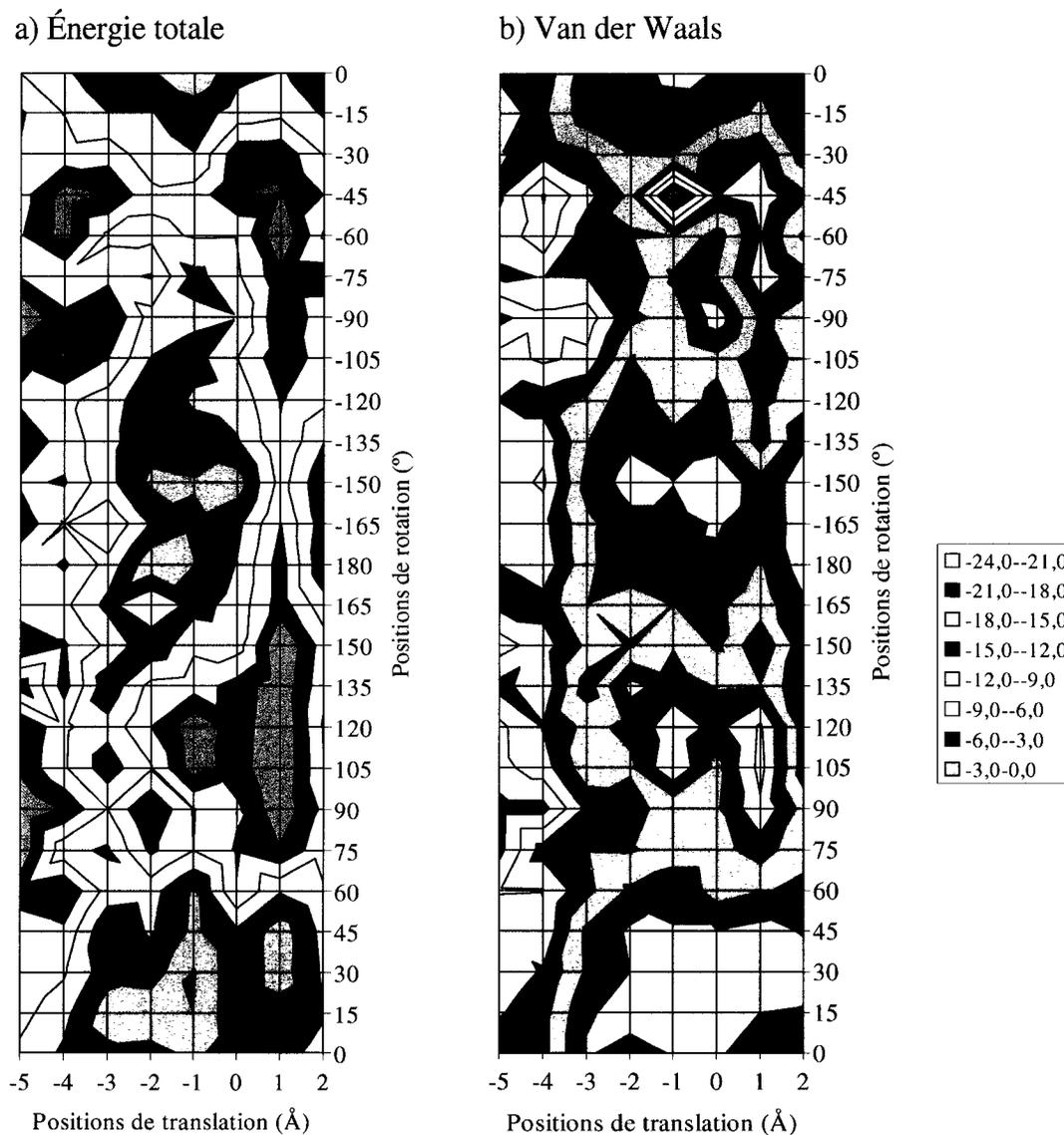
l'hypothèse que la boucle est l'entrée principale pour le substrat (Ghosh et Vihko, 2001). Quelques inhibiteurs œstrogéniques avec un long groupe alkyle à la position 7 $\alpha$  ou 16 ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) (Poirier, 2003) pourraient à peine entrer dans le site de liaison par le point d'entrée Glu282. D'ailleurs, l'enzyme avait une basse affinité pour des inhibiteurs avec un groupe alkyle à la position 7 $\alpha$ , probablement parce que cette réduction d'affinité est provoquée par la chaîne alkyle qui ne peut pas complètement entrer dans le site et empêche alors la boucle de se refermer sur le substrat. La cristallisation d'un inhibiteur hybride, combinant les structures de l'estradiol et du cofacteur (Qui *et al.*, 2002), montre aussi que l'entrée principale des stéroïdes serait la boucle puisque la partie « cofacteur » de l'inhibiteur ne pourrait pas entrer en passant entre His221 et Glu282. En plus, l'entrée des stéroïdes par la boucle empêcherait le C18 des œstrogènes d'interagir avec Leu149 et Val225 en entrant dans le site actif. Le cycle aromatique irait directement se « stationner » dans la structure sandwich formée par les deux résidus.

Le protocole de translation du ligand dans le site actif permet de voir d'autres positions de liaison en plus de voir comment le ligand peut entrer dans le site actif. L'arrimage moléculaire se contente habituellement de placer le ligand à l'étude directement dans le site actif, sans savoir comment le ligand peut se rendre là à partir du solvant. Pourtant, le processus de liaison est aussi important dans la conception d'inhibiteurs que la liaison elle-même (Ma *et al.*, 2002). L'avantage du protocole de MCM utilisé dans le travail de translation, comparativement à la dynamique moléculaire, est l'absence du temps dans la simulation. Les simulations de dynamique moléculaire calculent le mouvement des atomes en fonction du temps, une itération valant habituellement 1-2 femtosecondes. Même si la dynamique moléculaire peut sembler plus appropriée à ce type d'étude (c'est-à-dire à l'étude du mouvement du ligand dans le site actif de l'enzyme), il n'est pas certain qu'une simulation d'environ 1 nanoseconde (1000000 itérations) soit suffisante pour simuler l'entrée ou la sortie du ligand, à moins d'utiliser une technique spéciale de dynamique moléculaire orientée (Ludemann *et al.*, 2000a et b).

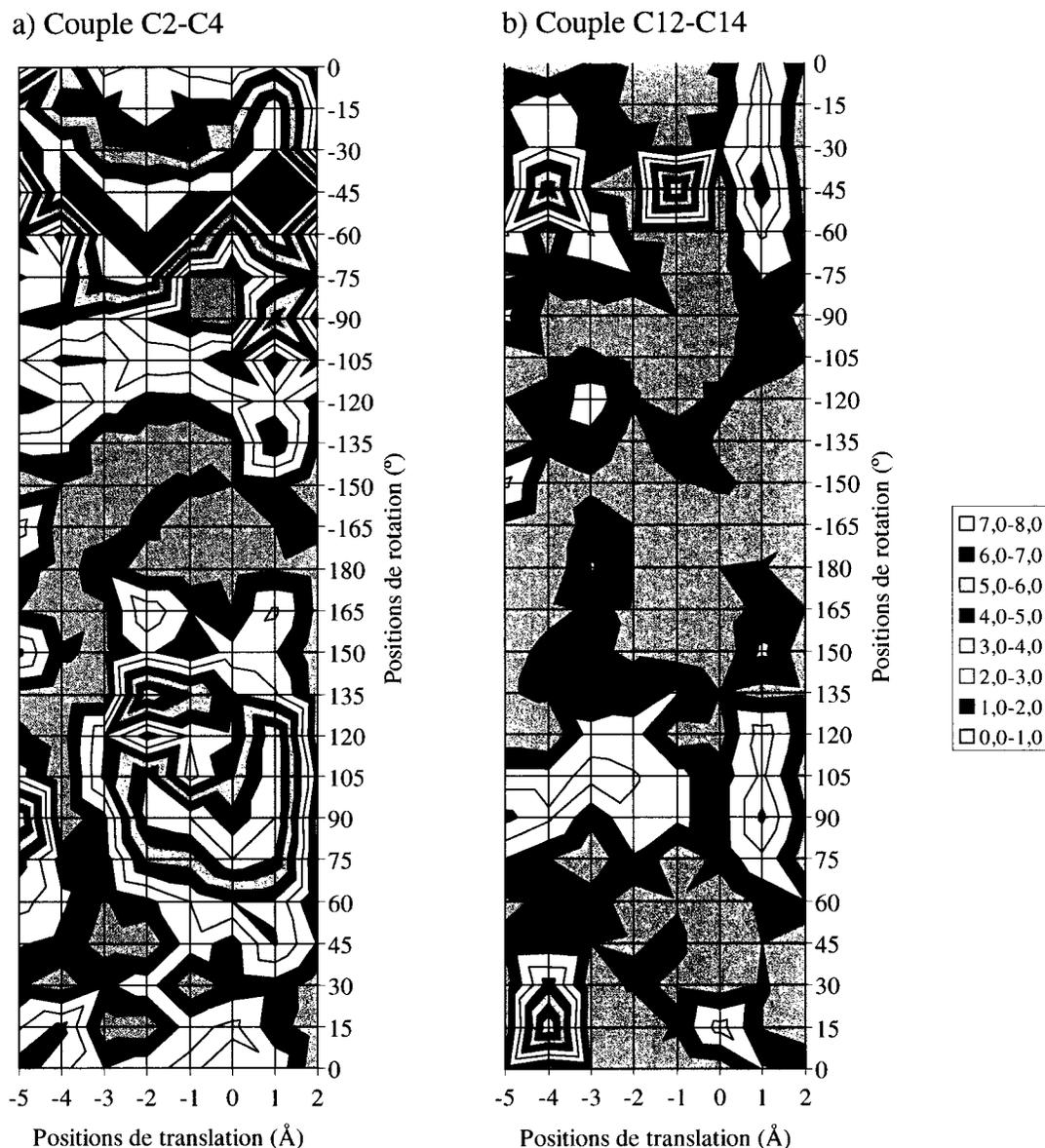
### 3.5 Rotation de E2 et création des cartes énergiques 2D de la 17 $\beta$ -HSD1

En général, les énergies d'interaction lors de la rotation du ligand sont meilleures quand il est situé entre les positions de translation -3 à 2 et entre les angles -15° à 60° et 165° à -135° (figure 3.5a). Ces deux gammes d'angles montrent que le ligand peut lier le récepteur dans une orientation inversée et peut tourner sur son axe longitudinal d'environ 75° dans le tunnel, autant dans l'orientation normale qu'inversée. La carte des interactions de Van der Waals (figure 3.5b) montre que la forme planaire du stéroïde est faiblement discriminée par l'encombrement stérique et que le stéroïde devrait facilement pouvoir lier l'enzyme dans la conformation inversée. Cependant, la carte de l'énergie d'interaction totale (figure 3.5a) montrent une barrière d'énergie de  $\sim 6-8$  kcal $\cdot$ mol $^{-1}$  à la position de translation 1 entre les angles -165 et -135. Cette différence est surtout causée par des interactions électrostatiques défavorables (résultats non montrés). La comparaison des deux cartes montrent en même temps la forte influence des interactions de van der Waals dans la liaison du ligand et le rôle des autres interactions (électrostatiques, solvation, etc...) dans l'indication et le raffinement de la bonne orientation de liaison du substrat.

Les différences entre les angles cibles des deux contraintes (C2-C4 et C12-C14) et les angles de rotation réels ont été également tracées sur d'autres cartes (figure 3.6a et 3.6b). Cela signifie que plus une valeur sur la carte est élevée, plus le stéroïde est loin de son angle cible, montrant que cet angle de rotation ne peut pas être adopté par le ligand. Généralement, il y a peu de déviations angulaires dans les gammes données ci-dessus, qui sont les conformations les plus basses en énergie. Les déviations angulaires les plus élevées correspondent généralement aux conformations les plus élevées en énergie, montrant que ces orientations sont à peine possibles en raison de la difficulté que le ligand a à se lier dans cette orientation. En outre, le cycle aromatique (contrainte C2-C4, figure 3.6a) a plus de déviations que le cycle D (contrainte C12-C14, figure 3.6b) et ces déviations sont généralement plus élevées. Ceci est probablement provoqué par la rigidité du cycle aromatique, qui limite les conformations qu'il peut adopter dans le tunnel de liaison.



**Figure 3.5 : Cartes 2D de l'énergie d'interaction (en kcal·mol<sup>-1</sup>) de l'estradiol avec la 17β-HSD1 en fonction des positions de translation et de rotation du ligand dans le site actif.** a) L'énergie totale des interactions ligand-récepteur sont surtout favorables pour les zones violette, orange et bleu (-12 à -21 kcal·cal<sup>-1</sup>). Ces zones montrent la possibilité pour E2 de tourner sur lui-même de 75° pour un mode de liaison normal (-15° à 60°) et un nouveau mode de liaison alternatif inversé (165° à -120°). b) La carte des interactions de Van der Waals ligand-récepteur a des motifs très semblables à la carte a), mais elle montre une plus grande flexibilité quant aux possibilités de liaison. La différence des énergies des cartes révèle un rôle important des forces électrostatiques dans la discrimination des positions de liaison du ligand.



**Figure 3.6 : Cartes des différences (en degrés) entre les angles ciblés et les angles réels de la rotation de E2.** a) La contrainte imposée aux atomes C2-C4 du cycle A du stéroïde n'a que rarement été capable d'amener le stéroïde à l'angle ciblé pour la rotation. Les déviations majeures sont pour les angles de 45 à 150° et les angles de -120 à -15°, qui correspondent généralement aux zones les plus basses en énergie des cartes de la figure 3.5. Cette difficulté pourrait être causée par la rigidité du cycle aromatique. b) La contrainte des atomes C12-C14 dévie relativement peu souvent des angles imposés. Comme pour a), les zones majeures de déviation correspondent généralement aux zones de haute énergie.

Parmi toutes les translations et les rotations, la position  $d_s = 2$  est très intéressante à cause du changement de l'orientation du ligand, qui commence à aller vers la boucle flexible comme décrit dans la section sur la translation (section 3.5). Cette position est encore plus intéressante dans la rotation parce qu'elle a un profil d'énergie relativement bas tout au long de la rotation sur la carte. En regardant tous les angles, il semble qu'ils pourraient tous être possibles. En outre, les cartes de déviation angulaire montrent seulement 3 angles où le ligand dévie de plus de 3 degrés pour les deux contraintes. En dépit de cette liberté, les conformations les plus basses en énergie sont les mêmes que dans les autres conformations, s'étendant entre  $-15^\circ$  et  $45^\circ$  degrés pour l'orientation de liaison normale et de  $165^\circ$  à  $-135^\circ$  pour l'orientation inversée. Cette position de translation semble avoir un grand espace dans le tunnel de liaison et elle correspond à la poche vide mentionnée précédemment.

Le protocole utilisé dans ce travail montre clairement que le tunnel de liaison de la  $17\beta$ -HSD1 n'est peut-être pas aussi étroit qu'on le croyait avec la cristallographie puisque la flexibilité des chaînes latérales du site permet la liaison de plusieurs stéroïdes. Il est difficile d'observer cette flexibilité dans une structure cristallographique statique. Les positions semblables des stéroïdes dans les multiples structures cristallographiques de la  $17\beta$ -HSD1 démontrent qu'il s'agit d'une position de liaison particulièrement favorisée et sans doute la meilleure pour la catalyse (Azzi *et al.*, 1996 ; Breton *et al.*, 1996, Mazza *et al.*, 1998 ; Sawicki *et al.*, 1999 ; Han *et al.*, 2000). Cependant, avant d'arriver à cette position, les substrats doivent se déplacer jusque là, adoptant plusieurs conformations et passant par plusieurs minima d'énergie. Il a été démontré que la dynamique des protéines est aussi importante que leurs états de liaison statique dans la conception d'inhibiteur (Ferrari *et al.*, 2003 et références à l'intérieur). Le protocole de MCM n'est peut-être pas un processus de dynamique moléculaire, mais la carte énergétique 2D dessinée ici donne une bonne image de la façon dont un substrat peut atteindre et lier son site de liaison.

Un des points les plus intéressants de cette carte est la possibilité qu'a le ligand à se lier dans une orientation inversée (figure 3.5). Expérimentalement, ceci n'a jamais été observé pour  $17\beta$ -HSD1. Cependant, un mode alternatif de stéroïde inversé a déjà été

observé pour la SHBG (Grishkovskaya *et al.*, 2002) et en comparant deux structures cristallographique de la ADT/DHEA-ST (Rehse *et al.*, 2001 ; Chang *et al.*, 2004). Les résultats de modélisation moléculaire présentés ici, avec l'absence de conformations inversées dans des données expérimentales, sont en accord sur le fait que dans la 17 $\beta$ -HSD1, ce mode de liaison se produit très rarement. Cependant, ce nouveau mode alternatif, avec le mode renversé observé précédemment (Gangloff *et al.*, 2003) devraient être considérés dans la conception d'inhibiteurs de cet enzyme.

### 3.6 Orientations des chaînes latérales pendant la recherche conformationnelle

#### 3.6.1 Orientations observées dans d'autres structures cristallographiques

Le protocole de MCM permet également aux chaînes latérales de changer leur orientation en surmontant les barrières d'énergie locales. Ainsi, certaines chaînes latérales ont adopté de nouvelles orientations et de nouveaux angles de torsion, plusieurs ayant été observés dans d'autres structures cristallographiques alors que d'autres ne l'ont jamais été. Plus précisément, les angles de torsion  $\chi_{1\_Ser222}$ ,  $\chi_{3\_Met147}$  et  $\chi_{3\_Met279}$  peuvent changer pour des valeurs observées dans d'autres structures cristallographiques. Phe226, Phe259 et Leu262 peuvent également changer leur orientation initiale pour celles observées dans d'autres structures de la 17 $\beta$ -HSD1 (Breton *et al.*, 1996 ; Han *et al.*, 2000), alors que Leu262 peut en plus adopter d'autres conformations jamais vues dans ces structures. À chaque trajectoire de MCM, la chaîne latérale de Lys223, qui se dirige vers le solvant dans la structure initiale, se rapproche du site de liaison, alors que Met193, qui se dirige vers le ligand dans la structure cristallographique, sort du site de liaison et pointe vers le solvant. La nouvelle conformation de Lys223 se dirigeant vers le site de liaison a déjà été observée dans les structures 1FDT, 1FDW et 1JTV (Breton *et al.*, 1996 ; Mazza *et al.*, 1998 ; Gangloff *et al.*, 2003) mais les conformations de Met193 sont difficiles à comparer avec les structures cristallographiques de la 17 $\beta$ -HSD1. En effet, ce résidu fait parti de la boucle flexible mal définie et il n'est pas présent dans toutes les structures. Même lorsqu'il est présent, son orientation dépend fortement de la conformation (ouverte ou fermée) de la boucle.

#### 3.6.2 Nouvelles orientations des chaînes latérales

Les nouvelles conformations de chaînes latérales qui n'ont jamais été observées dans les structures cristallographiques concernent surtout les angles  $\chi_{2\_Leu149}$ ,  $\chi_{1\_Cys156}$  et  $\chi_{1\_Met279}$ , qui ont changé par  $\sim 180^\circ$ , résultant à l'exposition des chaînes latérales Cys156 et Met279 au solvant et dans une orientation renversée de la chaîne latérale de Leu149. Des calculs dans un modèle sans ligand montrent que la barrière

d'énergie pour effectuer la rotation des angles de torsion de ces chaînes latérales par 180° est moins de 4 kcal/mol (résultats non montrés). Il se pourrait donc que ces conformations puissent être adoptées de temps en temps *in vivo* par l'enzyme. Ces changements n'affectent pas de manière significative la contribution d'énergie des résidus aux interactions ligand-récepteur, excepté pour Met279 où l'interaction est habituellement meilleure quand la chaîne latérale est à l'intérieur du site de liaison. Les chaînes latérales de His221 et Asn152 sont parfois renversés (tournées de 180°) et Asn152 adopte d'autres conformations non observées dans les structures cristallographiques.

Les chaînes latérales de plusieurs résidus changent d'orientations pendant les translations et la rotation. La plupart de ces résidus et leurs changements ont été décrits plus haut : Met147, Leu149, Asn152, Cys156, His221, Ser222, Met279, etc. Les chaînes latérales de Phe192 et de Tyr275 peuvent également changer leur orientation selon la position du ligand dans le site actif. La chaîne latérale de Phe192 se déplace quand les stéroïdes approchent le cofacteur et l'angle  $\chi_1$  Tyr275 tourne souvent de 180° aux positions -5 à -2. Ce changement d'angle de torsion déplace la chaîne latérale du résidu vers le solvant, en dehors du site de liaison. Souvent, ce changement est accompagné d'un changement de conformation de Met279, dont la chaîne latérale prend l'espace précédemment occupé par celle de Tyr275. À certaines positions de translation, la trajectoire de MCM donne une structure où le ligand est renversé, comme dans la rotation de l'estradiol.

Les changements observés dans ce travail n'affectent pas significativement l'énergie de liaison du complexe, mais il est néanmoins intéressant de pouvoir observer les nouvelles conformations, considérant qu'un bon nombre d'entre elles ont été observées pour d'autres structures cristallographiques de la 17 $\beta$ -HSD1. L'étude de ces conformations donne une vision plus dynamique de la protéine. Plusieurs études ont démontré l'importance de la flexibilité du site de liaison lors d'arrimage moléculaire afin de trouver une conformation optimale à la liaison d'un ligand non naturel (Halperin *et al.*, 2002). D'ailleurs, les structures cristallographiques à haute résolution montrent souvent plusieurs orientations alternatives pour quelques chaînes latérales (Lario *et al.*, 2003). La

modélisation des structures de basse résolution est un bon outil pour explorer les conformations alternatives des chaînes latérales des résidus.

### 3.6.3 Conformations et rôles de Glu282

Les changements de la chaîne latérale de Glu282 sont d'un intérêt particulier en raison du rôle proposé pour ce résidu dans la réaction catalytique. Glu282 a différentes conformations dans différentes structures cristallographiques. Sa chaîne latérale est très flexible. Dans la structure employée pour établir les modèles de ce travail, la chaîne latérale de Glu282 se dirige vers le solvant et ne forme pas de lien H avec le ligand. La modélisation montre que Glu282 peut former un lien H avec les groupements hydroxyle des stéroïdes même lorsque sa chaîne latérale n'est pas complètement entrée dans le site de liaison. Pour ce faire, le résidu adopte une conformation spécifique qui n'est pas vue dans les structures cristallographiques (figure 3.2). Si le lien H entre le ligand et ce résidu est imposé par une contrainte, Glu282 se déplace à l'intérieur du site et garde sa position après une autre trajectoire de MCM sans contrainte, à moins qu'il interagisse avec un groupement cétone. La troisième MCM avec E1 (modèle 6) est la seule exception observée, où le stéroïde perd son lien H avec Glu282 alors que l'interaction était favorable dans le modèle précédant (tableau 3.2). Cependant, dans d'autres modèles de E1, Glu282 garde son lien avec le stéroïde (voir exemple à l'annexe D). Quand Glu282 forme un lien H avec un stéroïde, il contribue beaucoup plus à la stabilisation ligand-récepteur que His221. Sa charge négative interagit plus fortement comme accepteur avec l'atome d'hydrogène des groupes hydroxyles des stéroïdes que le groupement N $\epsilon$ -H de His221 (qui n'est pas chargé) avec les atomes d'oxygène des stéroïdes.

Glu282 a des interactions défavorables avec les groupements cétone de T et de DHT liés dans le mode normal, mais quand ces stéroïdes sont en mode alternatif, ils peuvent former un lien H avec ce résidu, suggérant que Glu282 influence l'orientation de liaison des ligands. Glu282 est souvent considéré comme un résidu catalytique en raison du lien H stabilisateur observé dans certaines structures cristallographiques, mais des expériences de mutagenèse dirigée et de cinétique ont montré qu'il n'a aucune influence sur la réaction catalytique (Puranen *et al.*, 1997a; Huang *et al.*, 2001). D'autre part, ce résidu est conservé

dans d'autres protéines liant les œstrogènes (récepteurs, anticorps et sulfatase) et ce fait devrait être considéré (Nahoum *et al.*, 2003). Les résultats obtenus dans ce travail, combiné à d'autres résultats cristallographiques (Shi et Lin, 2004 ; Rong Shi, communications personnelles), suggèrent fortement que Glu282 aide à déterminer l'orientation du substrat dans le site actif pour la catalyse. De plus, comme ce résidu est souvent présent dans les protéines liant les œstrogènes, il pourrait s'agir d'un résidu ayant un rôle dans la spécificité à ces hormones, considérant que la directionnalité des liens H a une grande importance dans la spécificité de liaison. La présence d'une structure sandwich et d'un acide glutamique dans ces protéines sont deux facteurs qui favoriseraient la liaison des œstrogènes puisque la partie phénol de la molécule (cycle aromatique A et groupe OH) est une caractéristique unique pour ces stéroïdes.

Des expériences en laboratoire sont en cours afin de démontrer expérimentalement le rôle de Glu282 dans la spécificité de la 17 $\beta$ -HSD1 aux œstrogènes. Comme mentionné précédemment, la mutation de Glu282 en alanine n'a eu aucun effet sur l'activité catalytique de l'enzyme (Huang *et al.*, 2001). Cependant, ces expériences n'ont été faites qu'avec E1 et E2, et il serait intéressant de voir comment la mutation affecte la liaison des androgènes. Si ce résidu a réellement un rôle dans la spécificité aux œstrogènes, les androgènes devraient pouvoir lier plus facilement l'enzyme mutant que l'enzyme sauvage. De plus, si ce résidu est un facteur majeur pour la liaison des androgènes dans le mode alternatif à cause de ses interactions favorables avec les groupements hydroxyle et défavorables avec les groupements cétones, le mutant devrait pouvoir lier les androgènes aussi facilement, sinon plus, dans le mode normal que dans le mode alternatif. Brièvement, 17 $\beta$ -HSD1 sauvage et mutante en position 282 (E282A) seront d'abord surproduites dans les cellules d'insecte Sf9 grâce au système d'expression au baculovirus (Invitrogen, USA), utilisé précédemment pour l'expression de la 17 $\beta$ -HSD1 (Breton *et al.*, 1994; Breton *et al.*, 1996; Mazza *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2001). Les protéines seront ensuite isolées et purifiées sur une colonne d'affinité Blue-Sepharose CL-6B pour enfin être utilisées pour des essais et des cinétiques enzymatiques. Plusieurs androgènes seront testés parallèlement avec les enzymes sauvage et mutant, plus particulièrement la DHT à cause de sa possibilité à être catalysée à ses deux extrémités.

## Conclusion

À cause de son rôle important dans la biosynthèse *in situ* de l'estradiol, la 17 $\beta$ -HSD1 est une cible de choix dans le développement de médicaments anti-tumoraux pour combattre le cancer du sein, le cancer le plus souvent diagnostiqué et le deuxième plus mortel chez les Canadiennes. Les traitements actuels contre ce cancer consistent à bloquer l'action de l'estradiol et la formation locale de l'estrone. Il n'existe toujours aucun traitement visant à inhiber l'action de la 17 $\beta$ -HSD1, qui transforme l'estrone en estradiol. La structure-fonction de l'enzyme a largement été étudiée et notre compréhension de son fonctionnement a grandement été éclairée avec la détermination de sa structure 3D par cristallographie aux rayons X. Avec cette structure, il a été possible d'étudier ses propriétés moléculaires et chimiques plus en profondeur avec la modélisation moléculaire, une technique de simulation par ordinateur permettant d'évaluer les énergies des interactions chimiques des molécules et des atomes. Dans ce travail, les interactions de la 17 $\beta$ -HSD1 avec plusieurs stéroïdes dans divers modes de liaison ont été simulées afin de mieux comprendre sa spécificité de liaison et son processus catalytique. De plus, deux protocoles uniques de modélisation ont été utilisés pour explorer d'autres modes de liaison des stéroïdes qui n'ont pas été observés dans les structures cristallographiques: la première simule l'entrée des stéroïdes dans le site actif par leur translation et la seconde simule la rotation et la translation de l'estradiol dans le site actif afin de découvrir s'il y existe d'autres modes de liaison possible.

Les diverses structures cristallographiques publiées et les calculs exécutés dans ce travail montrent que la 17 $\beta$ -HSD1, en dépit de sa spécificité élevée pour des œstrogènes, a un site de liaison flexible qui peut lier différents stéroïdes dans diverses conformations. Les énergies d'interaction montrent clairement que l'enzyme a plus de facilité à lier les œstrogènes que les androgènes, mais les androgènes peuvent lier l'enzyme selon deux modes, soit le mode normal et un mode alternatif où le stéroïde est inversé. Ce mode alternatif avait précédemment été observé expérimentalement et les résultats de modélisation, conformément aux données expérimentales (Gangloff *et al.*, 2003), tendent à

montrer que les androgènes peuvent se lier aussi facilement dans les deux modes de liaison, avec peut-être une préférence pour le mode alternatif. Cette préférence est causée par des interactions électrostatiques plus favorables pour le mode alternatif des androgènes, surtout avec Glu282. Les androgènes actifs ont un groupement cétone en position 3 et un hydroxyle en position 17, contrairement aux œstrogènes qui ont tous un groupement hydroxyle en position 3. Glu282 sous sa forme ionisée interagit favorablement avec les groupements hydroxyle des stéroïdes, mais défavorablement avec leurs groupements cétones, favorisant ainsi la liaison des androgènes en mode inversé. Avec ces observations, il semblerait que Glu282 soit impliqué dans la spécificité de l'enzyme aux œstrogènes plutôt que dans la réaction catalytique puisqu'on retrouve ce résidu dans presque toutes les protéines liant les œstrogènes, plusieurs d'entre elles n'ayant d'ailleurs pas d'activité catalytique (Nahoum *et al.*, 2003).

D'autres part, les calculs ont également aidé à expliquer l'affinité et l'activité catalytique plus élevée de l'enzyme avec l'estrone en démontrant la difficulté que les autres stéroïdes peuvent avoir à former des liaisons hydrogènes avec les résidus catalytiques. E1 est le seul stéroïde des modèles présentés ici dont l'énergie de liaison est meilleure lorsqu'il forme des liens H avec Ser142 et Tyr155. D'ailleurs, son interaction avec Ser142 dans cette conformation est la meilleure observée, observation en accord avec le fait que la sérine est un meilleur donneur d'hydrogène qu'un accepteur et que son interaction devrait être plus forte avec un groupement accepteur comme la cétone de E1. Les androgènes, dont les  $k_{cat}$  expérimentaux sont beaucoup plus faibles que ceux de E1 et E2, n'ont pas été capables de former quatre liens H, particulièrement avec Ser142. Ce résidu serait donc un facteur déterminant dans le positionnement optimal du substrat pour la réaction catalytique.

Les protocoles de translation et de rotation, uniques au progiciel ZMM, ont fourni des informations intéressantes sur la liaison des substrats, informations qui n'auraient pu être déduites à partir des structures cristallographiques. La translation des stéroïdes a montré que malgré leurs différences structurales, ils se déplacent tous d'une façon semblable le long du site actif et ce, même avec des profils d'énergie différents. Ces profils sont en accord avec les résultats expérimentaux sur la spécificité de liaison de E1, E2 et

DHT et le profil de ce dernier montre que malgré sa pseudo-symétrie, ses minima d'énergie ne sont pas les mêmes selon qu'il est lié en mode normal ou alternatif. Cette simulation, avec l'appui d'autres simulations non présentées, semble aussi montrer que l'entrée principale des stéroïdes dans le site actif pourrait être l'ouverture de la boucle flexible. L'entrée trouvée précédemment par Zhorov et Lin (2000), où le stéroïde passe entre His221 et Glu282, pourrait plutôt être une porte de sortie pour les molécules d'eau lorsque le substrat entre dans le site actif. La recherche pseudo-systématique des différents mode de liaison par la translation et la rotation de l'estradiol dans le site actif a permis de dessiner des cartes 2D de l'énergie de liaison. Ces cartes donnent beaucoup d'informations sur la plasticité du site de liaison et sur les différents modes de liaison que le stéroïde peut adopter. Les résultats ont démontré que l'estradiol pourrait lier l'enzyme dans une orientation à l'envers, mais que ce mode est discriminé par des interactions électrostatiques défavorables pour son entrée dans le site actif. Dessiner les cartes énergétique 2D des ligands est une nouvelle méthode de la biologie informatique pour explorer un éventail de modes de liaison alternatifs et de trouver les différentes conformations ligand-récepteur liées aux minimum locaux d'énergie.

Suite à ce travail, il semble qu'un bon inhibiteur stéroïdien de la  $17\beta$ -HSD1 devrait avoir une structure semblable à celle de l'estrone afin d'optimiser la formation des liens hydrogènes. Le cycle aromatique A est essentiel, tout comme la présence d'un groupement hydroxyle en position 3, ou de tout autre groupement pouvant former des liaisons hydrogènes avec His221 et Glu282. La boucle flexible de l'enzyme devrait aussi être en mesure de se refermer sur le substrat pour augmenter le nombre d'interactions favorables. Comme indiqué dans une revue récente (Ma *et al.*, 2002), des modes de liaison multiples des substrats dans  $17\beta$ -HSD1 devraient aussi être considérés pour la conception rationnelle de médicaments parce que certaines molécules thérapeutiques pourraient avoir la capacité de lier l'enzyme cible plus efficacement dans un de ces modes. La modélisation moléculaire est un outil très efficace pour étudier ces différentes conformations, en plus de pouvoir étudier les propriétés structurales et de liaison des protéines. Cependant, il est important de se rappeler qu'il s'agit de simulations basées sur des modèles mathématiques et que seules

des expériences *in vitro* et *in vivo* peuvent définitivement confirmer les hypothèses émises par de telles simulations.

## Références

- Alonso, L.C., Rosenfield, R.L. (2002) Oestrogens and puberty. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **16**: 13-30.
- Anstead, G.M., Carlson, K.E., Katzenellenbogen, J.A. (1997) The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **62**: 268-303.
- Apostolakis, J., Plückthun, A., Caflish, A. (1998) Docking small ligands in flexible binding sites. *J Comp Chem* **19**: 21-37.
- Azzi, A., Rehse, P.H., Zhu, D.W., Campbell, R.L., Labrie, F., Lin, S.-X. (1996) Crystal structure of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase complexed with 17beta-estradiol. *Nat Struct Biol* **3**: 665-668.
- Beaulieu, E.E., Kelly, P.A. (1990) *Hormones: from molecules to disease*. Chapman and Hall, New York, 697 p.
- Bonney, R.C., Reed, M.J., Beranek, P.A., Ghilchik, M.W., James, V.H. (1986) Metabolism of [3H]oestradiol in vivo by normal breast and tumour tissue in postmenopausal women. *J Steroid Biochem* **24**: 361-4.
- Branden, C., Tooze, J. (1999) *Introduction to protein structure*. Garland, New York, 410 p.
- Breton, R., Yang, F., Jin, J.Z., Li, B., Labrie, F., Lin, S.-X. (1994) Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: overproduction using a baculovirus expression system and characterization. *J Steroid Biochem Mol Biol* **50**: 275-282.
- Breton, R., Housset, D., Mazza, C., Fontecilla-Camps, J.C. (1996) The structure of a complex of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP<sup>+</sup> identifies two principal targets for the design of inhibitors. *Structure* **15**: 905-15.
- Brodie, A.M., Njar, V.C. (2000) Aromatase inhibitors and their application in breast cancer treatment. *Steroids* **65**:171-179.
- Brooks, B.R., Bruccoleri R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., Karplus, M. (1983) CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J Comp Chem* **4**: 187-217.
- Brooks, C.L., Pettitt, B.M., Karplus, M. (1985) Structural and energetic effects of truncating long ranged interactions in ionic polar fluids. *J Chem Phys* **83**: 5897-5908.

- Brown, W.M., Metzger, L.E., Barlow, J.P., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Royer, R.E., Vander Jagt, D.L. (2003) 17-beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1: computational design of active site inhibitors targeted to the Rossmann fold. *Chem Biol Interact* **143-144**: 481-491.
- Carlson, H.A., McCammon, J.A. (2000) Accommodating protein flexibility in computational drug design. *Mol Pharmacol* **57**: 213-8.
- Challis, J.R.G., Matthews, S.G., Gibb, W., Lye, S.J. (2000) Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev* **21**: 514-550.
- Chang, H.J., Shi, R., Rehse, P., Lin, S.-X. (2004) Identifying androsterone (ADT) as a cognate substrate for human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (DHEA-ST) important for steroid homeostasis: structure of the enzyme-ADT complex. *J Biol Chem* **279**: 2689-2696.
- Ferrari, S., Costi, P.M., Wade, R.C. (2003) Inhibitor Specificity via Protein Dynamics. Insights from the Design of Antibacterial Agents Targeted Against Thymidylate Synthase. *Chem Biol* **10**: 1183-1193.
- Frank, G.R. (2003) Role of estrogen and androgen in pubertal skeletal physiology. *Med Pediatr Oncol* **41**: 217-221.
- Gangloff, A. (2002) *Études des relations structure/fonction et de l'activité 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 1 et 3 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase type 3 humaines*. Thèse de doctorat, p. 289.
- Gangloff, A., Garneau, A., Huang, Y.W., Yang, F., Lin, S.-X. (2001) Human oestrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase specificity: enzyme regulation through an NADPH-dependent substrate inhibition towards the highly specific oestrone reduction. *Biochem J* **356**: 269-276.
- Gangloff, A., Shi, R., Nahoum, V., Lin, S.-X. (2003) Pseudo-symmetry of C19 steroids, alternative binding orientations, and multispecificity in human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *FASEB J* **17**: 274-276.
- Ghosh, D., Pletnev, V.Z., Zhu, D.W., Wawrzak, Z., Duax, W.L., Panborn, W., Labrie, F., Lin, S.-X. (1995) Structure of human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure* **3**: 503-513.
- Ghosh, D., Vihko, P. (2001) Molecular mechanisms of estrogen recognition and 17-keto reduction by human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1. *Chem Biol Interact* **130-132**: 637-650.
- Graham, J.D., Bain, D.L., Richer, J.K., Jackson, T.A., Tung, L., Horwitz, K.B. (2000) Thoughts on tamoxifen resistant cancer. Are coregulators the answer or just a red herring? *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**: 255-259.

- Grishkovskaya, I., Avvakumov, G.V., Hammond, G.L., Catalano, M.G., Muller, Y.A. (2002) Steroid ligands bind human sex hormone-binding globulin in specific orientations and produce distinct changes in protein conformation. *J Biol Chem* **277**: 32086-32093.
- Goss, P.E. (2003) Emerging role of aromatase inhibitors in the adjuvant setting. *Am J Clin Oncol* **26**: S27-S33.
- Goss, P.E., Ingle, J.N., Martino, S., Robert, N.J., Muss, H.B., Piccart, M.J., Castiglione, M., Tu, D., Shepherd, L.E., Pritchard, K.I., Livingston, R.B., Davidson, N.E., Norton, L., Perez, E.A., Abrams, J.S., Therasse, P., Palmer, M.J., Pater, J.L. (2003) A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Engl J Med* **349**: 1793-1802.
- Gunnarsson, C., Olsson, B.M., Stal, O. (2001) Abnormal expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in breast cancer predicts late recurrence. *Cancer Res* **61**: 8448-8451.
- Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., Nussinov, R. (2002) Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* **47**: 409-443.
- Hammond, G.L., Avvakumov, G.V., Muller, Y.A. (2003) Structure/function analyses of human sex hormone-binding globulin: effects of zinc on steroid-binding specificity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**: 195-200.
- Han, Q., Campbell, R.L., Gangloff, A., Huang, Y.W., Lin, S.-X. (2000) Dehydroepiandrosterone and dihydrotestosterone recognition by human estrogenic 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* **275**: 1105-1111.
- Hoffren, A.M., Murray, C.M., Hoffmann, R.D. (2001) Structure-based focusing using pharmacophores derived from the active site of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Curr Pharm Des* **7**: 547-566.
- Hooft, R.W., Sander, C., Vriend, G. (1996) Positioning hydrogen atoms by optimizing hydrogen-bond networks in protein structures. *Proteins* **26**: 363-376
- Hooft, R.W., Vriend, G., Sander, C., Abola, E.E. (1996) Errors in protein structures. *Nature* **381**: 272.
- Huang, Y.W., Pineau, I., Chang, H.J., Azzi, A., Bellemare, V., Laberge, S., Lin, S.-X. (2001) Critical residues for the specificity of cofactors and substrates in human oestrogenic 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1: variants designed from the three-dimensional structure of the enzyme. *Mol Endo* **15**: 2010-2020.
- Ibragimova, G.T., Wade, R.C. (1998) Importance of explicit salt ions for protein stability in molecular dynamics simulation. *Biophys J* **74**: 2906-2911.

- Institut national du cancer du Canada. (2003) *Statistiques canadiennes sur le cancer 2003*, Toronto, Canada, pp. 26 et 28.
- James, L.C., Tawfik, D.S. (2003) Conformational diversity and protein evolution--a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci* **28**: 361-368.
- Jin, J.Z., Lin, S.-X. (1999) Human estrogenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase: predominance of estrone reduction and its induction by NADPH. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 489-493.
- Kacsoh, B. *Endocrine physiology*, McGraw-Hill – Health Professions Division, New York, 2000, 741 p.
- Kelly, M.J., Levin, E.R. (2001) Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* **12**: 152-156.
- Labrie, F. (1991) Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* **78**: C113-118.
- Lange, G., Lesuisse, D., Deprez, P., Schoot, B., Loenze, P., Benard, D., Marquette, J.P., Broto, P., Sarubbi, E., Mandine, E. (2002) Principles governing the binding of a class of non-peptidic inhibitors to the SH2 domain of src studied by X-ray analysis. *J Med Chem* **45**: 2915-2922.
- Lazaridis, T., Karplus, M. (1999) Effective energy function for proteins in solution. *Proteins* **35**: 133-152.
- Lario, P.I., Sampson, N., Vrielink, A. (2003) Sub-atomic resolution crystal structure of cholesterol oxidase: what atomic resolution crystallography reveals about enzyme mechanism and the role of the FAD cofactor in redox activity. *J Mol Biol* **326**: 1635-1650.
- Leach, A.R. (2001) *Molecular modelling: Principles and applications (2<sup>nd</sup> edition)*, Prentice Hall, London, 744 p.
- Levin, E.R. (2000) Nuclear receptor versus plasma membrane oestrogen receptor. *Novartis Found Symp* **230**: 41-50.
- Li, Z., Scheraga, H.A. (1987) Monte Carlo-minimization approach to the multiple-minima problem in protein folding. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 6611-6615.
- Lin, S.-X., Yang, F., Jin, J.Z., Breton, R., Zhu, D.W., Luu-The, V., Labrie, F. (1992) Subunit identity of the dimeric 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta. *J Biol Chem* **267**: 16182-16187.

- Lonning, P.E., Kragh, L.E., Erikstein, B., Hagen, A., Risberg, T., Schlichting, E., Geisler, J. (2001) The potential for aromatase inhibition in breast cancer prevention. *Clin Cancer Res* 7: 4423-4428 (suppl).
- Ludemann, S.K., Lounnas, V., Wade, R.C. (2000) How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms. *J Mol Biol* 303: 797-811.
- Ludemann, S.K., Lounnas, V., Wade, R.C. (2000) How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways. *J Mol Biol* 303: 813-830.
- Luu-The, V. (2001) Analysis and characteristics of multiple types of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76:143-151.
- Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Lachance, Y., Zhao, H.F., Couët, J., Leblanc, G., Labrie, F. (1990) Structure of two tandem human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase genes. *Mol Endocrinol* 4: 268-275.
- Luu-The, V., Labrie, C., Zhao, H.F., Couët, J., Lachance, Y., Simard, J., Leblanc, G., Côté, J., Bérubé, D., Gagné, R., Labrie, F. (1989) Characterization of cDNAs for human estradiol 17beta- dehydrogenase and assignment of gene to chromosome 17: Evidence of two mRNA species with distinct 5' termini in human placenta. *Mol Endocrinol* 3: 1301-1309.
- Luu-The, V., Zhang, D., Poirier, D., Labrie, F. (1995) Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55: 581-587.
- Ma, B., Shatsky, M., Wolfson, H.J., Nussinov, R. (2002) Multiple diverse ligands binding at a single protein site: a matter of pre-existing populations. *Protein Sci* 11: 184-197.
- McDonald, I.K., Thornton, J.M. (1994) Satisfying hydrogen bonding potential in proteins. *J Mol Biol* 238: 777-793.
- MacGregor, J.I., Jordan, V.C. (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogens action. *Pharmacol Rev* 50: 151-196.
- Manolagas, S.C., Kousteni, S., Jilka, R.L. (2002) Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 57: 387-409.
- Martel, C., Rhéaume, E., Takahashy, C., Trudel, C., Couët, J., Luu-The, V., Simard, J., Labrie, F. (1992) Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 597-603.

- Mazza, C., Breton, R., Housset, D., Fontecilla-Camps, J.C. (1998) Unusual charge stabilization of NADP<sup>+</sup> in 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* **273**: 8145-8152.
- Meinhardt, U., Mullis, P.E. (2002) The essential role of the aromatase/p450arom. *Semin Reprod Med* **20**: 277-284.
- Metropolis, N.A., Rosenbluth, A.W., Rosenbluth, M.N., Teller A.H., Teller, E. (1953) Equation of state Calculations by fast computing machines. *J Chem Phys* **21**: 1087-1092.
- Miyoshi, Y., Ando, A., Shiba, E., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. (2001) Involvement of up-regulation of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers. *Int J Cancer* **94**: 685-689.
- Momany, F.A., McGuire, R.F., Burgess, A.W., Scheraga, H.A. (1975) Energy parameters in polypeptides. VII. Geometric parameters, partial atomic charges, nonbonded interactions, hydrogen bond interactions, and intrinsic torsional potentials of the naturally occurring amino acids. *J Phys Chem* **79**: 2361-2381.
- Mor, G., Yue, W., Santen, R.J., Gutierrez, L., Eliza, M., Berstein, L.M., Harada, N., Wang, J., Lysiak, J., Diano, S., Naftolin, F. (1998) Macrophages, estrogen and the microenvironment of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **67**: 403-411.
- Nahoum, V., Gangloff, A., Shi, R., Lin, S.-X. (2003) How estrogen-specific proteins discriminate estrogens from androgens: a common steroid binding site architecture. *FASEB J* **17**: 1334-1336.
- Oppermann, U.C., Filling, C., Jornvall, H. (2001) Forms and function of human SDR enzymes. *Chem Biol Interact* **130-132**: 699-705.
- Penning, T.M. (1997) Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* **18**: 281-305.
- Poirier, D. (2003) Inhibitors of 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Curr Med Chem* **10**: 453-477.
- Poulin, R., Labrie, F. (1986) Stimulation of cell proliferation and estrogenic response by adrenal C19- $\delta$ -5-steroids in the ZR-75-1 human breast cancer line. *Cancer Res* **46**: 4933-4937.
- Puranen, T.J., Poutanen, M.H., Peltoketo, H.E., Vihko, P.T., Vihko, R.K. (1994) Site-directed mutagenesis of the putative active site of human 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Biochem J* **304**: 289-293.

- Puranen, T., Poutanen, M., Ghosh, D., Vihko, P., Vihko, R. (1997) Characterization of structural and functional properties of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 using recombinant enzymes and site-directed mutagenesis. *Mol Endocrinol* **11**: 77-86.
- Puranen, T., Poutanen, M., Ghosh, D., Vihko, P., Vihko, R. (1997) Origin of substrate specificity of human and rat 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1, using chimeric enzymes and site-directed substitutions. *Endocrinology* **138**: 3532-3539.
- Purohit, A., Reed, M.J. (2002) Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids* **67**: 979-983.
- Qiu, W., Campbell, R.L., Gangloff, A., Dupuis, P., Boivin, R.P., Tremblay, M.R., Poirier, D., Lin, S.-X. (2002) A concerted, rational design of type 1 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: estradiol-adenosine hybrids with high affinity. *FASEB J* **16**: 1829-1831.
- Reed, M.J., Purohit, A. (1997) Breast cancer and the role of cytokines in regulating estrogen synthesis: an emerging hypothesis. *Endocr Rev* **18**: 701-715.
- Rehse, P.H., Zhou, M., Lin, S.-X. (2002) Crystal structure of human dehydroepiandrosterone sulphotransferase in complex with substrate. *Biochem J* **364**: 165-171.
- Rouayrenc, J.F., Vignon, F., Bringer, J., Pujol, P. (2000) Les effets non-transcriptionnels des oestrogènes refont surface. *Ann Endocrinol (Paris)* **61**: 517-523.
- Ryan, K.J., Engel, L.L. (1953) The interconversion of estrone and estradiol by human tissue slices. *Endocrinology* **52**: 287-291.
- Santen, R.J., Jeng, M.H., Wang, J.P., Song, R., Masamura, S., McPherson, R., Santner, S., Yue, W., Shim, W.S. (2001) Adaptive hypersensitivity to estradiol: potential mechanism for secondary hormonal responses in breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* **79**: 115-125.
- Santen, R.J., Song, R.X., Zhang, Z., Kumar, R., Jeng, M.H., Masamura, S., Yue, W., Berstein, L. (2003) Adaptive hypersensitivity to estrogen: mechanism for superiority of aromatase inhibitors over selective estrogen receptor modulators for breast cancer treatment and prevention. *Endocr Relat Cancer* **10**: 111-130.
- Santen, R.J., Yue, W., Naftolin, F., Mor, G., Berstein, L. (1999) The potential of aromatase inhibitors in breast cancer prevention. *Endocrin Relat Cancer* **6**: 235-243.
- Sawicki, M.W., Erman, M., Puranen, T., Vihko, P., Ghosh, D. (1999) Structure of the ternary complex of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1,3,5,7-tetraen-17-one (equilin) and NADP<sup>+</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 840-845.

- Shi, R., Lin, S.-X. (2004) Cofactor hydrogen bonding onto the protein main chain is conserved in the short-chain dehydrogenase/reductase family and contributes to nicotinamide orientation. *J Biol Chem* **279**: 16778-16785.
- Thomas, D.B. (1984) Do hormones cause breast cancer? *Cancer* **53**: 595-604.
- Thorson, T., Tangen, M., Stoa, K.F. (1982) Concentration of endogenous oestradiol as related to oestradiol receptor sites in breast tumor cytosol. *Eur J Cancer Clin Oncol* **18**: 333-337
- Tremblay, M.R., Poirier, D. (1998) Overview of a rational approach to design type I 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors without estrogenic activity: chemical synthesis and biological evaluation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **66**: 179-191.
- Voet, D., Voet, J.G. *Biochemistry*, 1995, John Wiley & Sons, 1361 p.
- Wade, R.C., Gabdouliline, R.R., Ludemann, S.K., Lounnas, V. (1998) Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme-ligand binding: Insight from simulations. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 5942-5949.
- Weiner, S.J., Kollman, P.A., Case, D.A., Singh, U.C., Ghio, C., Alagona, G., Profeta, S. Jr., Weiner, P. (1984) A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. *J Am Chem Soc* **106**: 765-784.
- Wiese, T.E., Brooks, S.C. (1994) Molecular modeling of steroidal estrogens: novel conformations and their role in biological activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* **50**: 61-73.
- Zhorov, B.S. (1983) Vector method for calculating derivatives of the energy deformation of valence angles and torsion energy of complex molecules according to generalized coordinates. *J Struct Chem* **23**: 649-655.
- Zhorov, B.S., Ananthanarayanan, V.S. (1996) Structural model of a synthetic Ca<sup>2+</sup> channel with bound Ca<sup>2+</sup> ions and dihydropyridine ligand. *Biophys J* **70**: 22-37.
- Zhorov, B.S., Lin, S.-X. (2000) Monte Carlo-minimized energy profile of estradiol in the ligand-binding tunnel of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase: atomic mechanisms of steroid recognition. *Proteins* **38**: 414-427.
- Zhu, D.W., Lee, X., Breton, R., Ghosh, D., Pangborn, W., Daux, W.L., Lin, S.-X. (1993) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the complex of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase with NADP<sup>+</sup>. *J Mol Biol* **234**: 242-244.

## Annexe I: Autres résultats

Les résultats présentés plus bas ont été faits avec les mêmes paramètres de calcul que dans la section Méthodologie, mais la trajectoire de MCM est différente en raison du nombre aléatoire de départs différents. Les résultats sont donc un peu différents des résultats présentés dans le texte principal, mais leur interprétation mène aux mêmes conclusions. La première partie (I.A) présente un travail identique à celui des sections 3.1 et 3.2, alors que pour la seconde partie, les charges partielles des atomes des ligands sont modifiées et des modèles avec la mutation E282A ont aussi été faits, suite à l'hypothèse du rôle du résidu Glu282 dans la spécificité aux œstrogènes (section 3.6.3). Enfin, une troisième partie (I.C) de cette annexe montre les résultats de la translation de l'estradiol à travers la conformation ouverte de la boucle flexible, démontrant que ce chemin pourrait être le principal emprunté par les substrats pour entrer dans le site actif de la 17 $\beta$ -HSD1.

Les valeurs inscrites dans les tableaux sont en kcal·mol<sup>-1</sup> et les modèles sont identifiés comme ceci : A ou B, représentant l'ensemble des modèles faits à partir d'un même nombre aléatoire de départ, suivi de l'abréviation du stéroïde incorporé dans le modèle. Si « \_i » est incorporé dans le nom, il s'agit du modèle pour le stéroïde en mode de liaison alternatif (pour « inversé »). Enfin, les chiffres 1, 2 et 3 représentent respectivement la minimisation normale, celle avec la contrainte des liens H et la re-minimisation (voir section 3.1.1 et tableau 3.1).

## I.A Nouvelles modélisations avec un nouveau nombre aléatoire de départ

Les résultats du tableau I.A.1 sont semblables à ceux des tableaux 3.1 et 3.3. Brièvement, E1 et E2 se lient beaucoup mieux au site de liaison que DHT, T et DHEA, particulièrement lorsque les liens H sont imposés. Cependant, l'énergie de liaison de E1 lorsque les liens H sont contraints n'est pas très élevée ( $-15,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  comparativement à  $-19,9 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$  dans le modèle présenté à la section 3). Néanmoins, lors de la re-minimisation, les énergies d'interaction changent très peu et la conformation de E1 reste identique, c'est-à-dire qu'elle reste dans une orientation très rapprochée de celle observée dans la structure cristallographique. E1 semble donc être « prisonnier » d'un minimum local d'énergie, de sorte que même le protocole de MCM ne semble pouvoir trouver une meilleure conformation. À noter que dans la première minimisation (minimisation libre,  $E = -18,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), E1 est très déplacé vers la boucle flexible. Étrangement, l'interaction entre Ser142 et E1 lorsque le ligand est en « position catalytique » (modèles 2 et 3) n'est pas bonne, comparativement à ce qui était observé dans la section 3 (tableau I.A.2). En comparaison, l'énergie de liaison de E2 lors de la re-minimisation diminue de beaucoup (passant de  $-15,5$  à  $-19,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), mais E2 perd deux liens H (il ne garde qu'un lien avec Glu282) et il revient dans la conformation déplacée de la première minimisation.

Les résultats des modèles en liaison alternative montrent aussi que E1 et E2 se lient beaucoup mieux en mode normal alors que DHT et T forment une liaison plus forte dans le mode alternatif. Dans les deux derniers cas, les interactions électrostatiques semblent jouer un rôle important pour cette préférence, la contribution majeure venant de Glu282 (tableau I.A.2). DHEA se lie mieux en mode normal, probablement à cause d'interactions électrostatiques plus favorables dans ce mode : en mode normal, le groupement 3-OH de DHEA peut faire un lien H avec Glu282.

Les pages qui suivent contiennent des tableaux de résultats qui remplissent toute la page. À titre de légende, utilisez les mêmes que pour les tableaux 3.1 à 3.4 (pages 34, 35, 44 et 45), où 1 = Minimisation normale, 2 = Liens H et 3 = Relaxation.

Tableau I.A.1: Énergies d'interaction A

	Total	Électro	VdW	H	Solv
A_E2, 1	-15,7	-1,4	-21,1	0,0	6,9
A_E2, 2	-15,7	-3,9	-21,1	-1,5	10,7
A_E2, 3	-19,7	-6,1	-22,0	-0,7	9,1
A_E1, 1	-18,1	-3,9	-22,8	-0,4	8,9
A_E1, 2	-15,5	-4,2	-20,6	-1,2	10,5
A_E1, 3	-15,4	-3,9	-20,9	-1,1	10,4
A_DHT, 1	-10,2	-0,8	-17,6	-0,3	8,4
A_DHT, 2	-11,1	-0,1	-18,6	-0,8	8,4
A_DHT, 3	-10,5	-1,0	-16,0	-0,3	6,8
A_T, 1	-15,0	-2,0	-20,5	-0,1	7,7
A_T, 2	-9,3	1,3	-18,8	-0,8	9,1
A_T, 3	-13,0	0,5	-21,9	-0,4	8,8
A_DHEA, 1	-10,6	1,0	-19,4	-0,2	8,0
A_DHEA, 2	-13,8	-3,8	-18,2	-0,9	9,0
A_DHEA, 3	-14,0	-2,4	-18,5	-0,3	7,2
A_E2_i, 1	-12,8	-4,0	-17,2	-1,0	9,5
A_E2_i, 2	-15,4	-5,3	-18,3	-1,6	9,8
A_E2_i, 3	-15,4	-5,3	-18,3	-1,6	9,8
A_E1_i, 1	-14,3	-2,3	-18,5	-0,5	7,0
A_E1_i, 2	-9,0	1,2	-18,5	-0,4	8,6
A_E1_i, 3	-12,6	-1,1	-19,5	-0,5	8,5
A_DHT_i, 1	-13,9	-3,0	-20,1	-0,4	9,6
A_DHT_i, 2	-13,3	-2,7	-19,2	-0,8	9,5
A_DHT_i, 3	-12,5	-1,7	-18,7	-0,3	8,2
A_T_i, 1	-16,3	-3,5	-20,2	-0,5	7,9
A_T_i, 2	-16,1	-4,0	-20,2	-1,3	9,4
A_T_i, 3	-17,3	-5,5	-20,3	-1,4	9,9
A_DHEA_i, 1	-12,6	-2,4	-19,9	-0,7	10,4
A_DHEA_i, 2	-11,0	-0,8	-19,6	-1,0	10,5
A_DHEA_i, 3	-12,2	-1,1	-20,0	-0,9	9,8

Tableau I.A.2: Contribution des résidues A

	V143	G144	L149	V225	F259	S142	Y155	H221	E282
A_E2, 1	-0,71	-0,30	-1,40	-2,02	-1,92	-0,39	-0,69	-0,77	0,00
A_E2, 2	-0,53	0,19	-2,53	-1,29	-1,51	0,38	-1,09	-1,48	-2,23
A_E2, 3	-0,96	-0,26	-2,38	-1,84	-1,78	-0,70	-1,03	-0,95	-2,80
A_E1, 1	-1,16	-0,28	-1,91	-1,04	-1,97	-0,13	-1,01	-0,26	-3,33
A_E1, 2	-0,54	0,00	-1,46	-1,70	-1,98	0,00	-1,64	-1,30	-1,68
A_E1, 3	-0,53	-0,10	-1,56	-1,67	-1,98	0,47	-1,66	-1,29	-1,63
A_DHT, 1	0,00	-0,81	-0,73	-0,43	-1,40	-0,39	-0,85	-0,94	1,49
A_DHT, 2	-0,47	0,48	-1,23	-0,89	-2,22	0,15	-1,31	-1,61	2,63
A_DHT, 3	-0,89	0,00	-0,40	-0,14	-1,67	-0,51	-1,18	-0,92	1,58
A_T, 1	-0,78	-0,85	-0,67	-1,06	-1,59	-0,64	-1,09	-1,07	1,65
A_T, 2	-0,49	0,21	-0,89	-0,69	-1,89	0,64	-1,10	-1,86	3,02
A_T, 3	-1,50	0,00	-1,28	-1,33	-1,91	-0,35	-1,05	-1,39	3,94
A_DHEA, 1	-0,90	-0,30	-0,56	-1,33	-0,50	-0,32	-1,58	-0,41	1,27
A_DHEA, 2	-0,74	0,00	-0,43	-0,20	-1,88	0,62	-2,24	-1,39	-0,35
A_DHEA, 3	-1,22	-0,26	-0,64	-0,93	-1,85	-0,70	-1,50	-0,64	0,45
A_E2_i, 1	-0,47	-0,32	-1,16	1,59	-1,96	-0,30	-0,62	-1,26	-2,37
A_E2_i, 2	-0,97	-0,23	-1,94	0,53	-2,85	-0,71	-0,72	-1,04	-1,68
A_E2_i, 3	-0,97	-0,23	-1,94	0,53	-2,85	-0,71	-0,72	-1,04	-1,68
A_E1_i, 1	-0,62	-0,33	-1,31	-0,20	-2,23	-0,32	-0,89	-1,42	0,65
A_E1_i, 2	0,00	-0,31	-1,56	-0,82	-3,07	-0,22	-0,64	1,32	1,01
A_E1_i, 3	-0,86	-0,39	-1,56	-1,10	-1,84	0,00	0,00	-1,33	0,36
A_DHT_i, 1	-0,74	0,34	-1,24	-0,63	-1,98	0,00	-1,32	0,00	0,00
A_DHT_i, 2	-0,23	-0,27	-0,30	-0,86	-1,76	-0,30	-0,76	-1,41	-0,71
A_DHT_i, 3	-0,22	-0,34	-0,76	-0,83	-2,17	0,62	-0,76	-0,23	-1,65
A_T_i, 1	-0,52	-0,22	-1,21	-0,44	-1,55	0,00	-0,46	0,00	-2,66
A_T_i, 2	-1,20	-0,50	-0,77	0,00	-2,46	0,56	-1,81	-1,11	-2,51
A_T_i, 3	-0,96	-0,45	-1,12	-0,16	-2,93	0,32	-0,16	-1,29	-2,39
A_DHEA_i, 1	-0,32	0,00	-1,09	-0,76	-1,63	-0,24	-1,30	-0,53	0,43
A_DHEA_i, 2	-0,77	-0,29	0,20	-0,90	-2,09	0,70	-1,27	-1,24	1,18
A_DHEA_i, 3	-0,34	-0,42	-0,13	-0,73	-2,62	0,00	-1,25	-1,56	1,22

## **I.B Nouveaux modèles avec des « parallèles » mutant E282A**

Les résultats qui suivent ont été faits avec la même méthodologie que dans le texte principal, mais le réseau de liens H de la structure de base a préalablement été optimisé avec WHATIF (Hooft *et al.*, 1996a; Hooft *et al.*, 1996b) et les charges partielles sont légèrement différentes. Néanmoins, les résultats obtenus pour les modèles sauvages sont comparables aux autres : E1 et E2 se liant plus favorablement en mode normal que les androgènes, E1 ayant ici des interactions nettement meilleures que les autres modèles en plus de conserver la conformation catalytique lors de la re-minimisation (tableaux I.B.1 et I.B.2). Le mode alternatif est encore favorisé par DHT et T, sauf si Glu282 est changé pour une alanine. Les modèles ayant un « m » à côté de l'abréviation du stéroïde (exemple : E1m) sont les mutants pour la position 282. Avec ce modèle mutant, T et DHT semblent préférer le mode de liaison normal au mode de liaison alternatif, donnant un autre indice appuyant le fait que Glu282 a un rôle dans l'orientation et la sélectivité des substrats. Ces résultats n'ont cependant pas été analysés en profondeur, mais l'expérience suggérée à la fin de la section 3.6.3 devrait pouvoir confirmer ou infirmer ces résultats et l'hypothèse sur le rôle de Glu282 en tant que résidue spécifique aux protéines liant les œstrogènes.

Les pages qui suivent contiennent des tableaux de résultats qui remplissent toute la page. À titre de légende, utilisez les mêmes que pour les tableaux 3.1 à 3.4 (pages 34, 35, 44 et 45), où 1 = Minimisation normale, 2 = Liens H et 3 = Relaxation.

Tableau I.B.1 : Énergies d'interaction B, en liaison normale

	Total	Électro	VdW	H	Solv
B_E1, 1	-19,2	-4,8	-21,5	-0,7	7,8
B_E1, 2	-19,9	-5,5	-22,1	-1,4	9,1
B_E1, 3	-20,1	-5,5	-22,3	-1,4	9,1
B_E1m, 1	-15,2	-1,8	-20,0	-0,5	7,1
B_E1m, 2	-15,9	-2,6	-22,3	-0,6	9,5
B_E1m, 3	-16,8	-2,7	-23,1	-0,6	9,4
B_E2, 1	-15,7	-2,1	-21,4	-0,3	8,1
B_E2, 2	-14,2	-2,7	-20,7	-0,7	9,8
B_E2, 3	-13,1	-1,2	-20,2	-0,7	9,0
B_E2m, 1	-13,9	-0,5	-21,0	0,0	7,6
B_E2m, 2	-14,4	-1,9	-21,3	-0,6	9,4
B_E2m, 3	-15,5	-2,6	-21,6	-0,6	9,3
B_T, 1	-14,5	-1,8	-18,5	-0,5	6,3
B_T, 2	-4,7	4,3	-17,2	-0,4	8,6
B_T, 3	-13,4	-1,1	-18,1	-0,5	6,3
B_Tm, 1	-13,6	-2,5	-18,9	-0,1	7,8
B_Tm, 2	-16,6	-4,1	-20,8	-0,8	9,1
B_Tm, 3	-16,3	-2,3	-19,6	-0,3	5,9
B_DHT, 1	-13,1	-1,6	-18,1	-0,6	7,3
B_DHT, 2	-8,9	1,7	-18,2	-0,7	8,3
B_DHT, 3	-11,2	-0,9	-16,9	-0,6	7,3
B_DHTm, 1	-12,6	-2,2	-16,2	-0,2	6,0
B_DHTm, 2	-11,0	-4,0	-14,7	-0,9	8,6
B_DHTm, 3	-11,4	-3,8	-15,4	-0,9	8,6
B_DHEA, 1	-14,0	-1,4	-18,7	0,0	6,1
B_DHEA, 2	-13,4	-3,4	-17,3	-1,0	8,4
B_DHEA, 3	-15,4	-4,1	-18,3	-0,3	7,4
B_DHEAm, 1	-13,7	-1,1	-17,1	0,0	4,5
B_DHEAm, 2	-11,9	-1,5	-18,1	-0,4	8,2
B_DHEAm, 3	-14,1	-2,8	-17,0	0,0	5,7

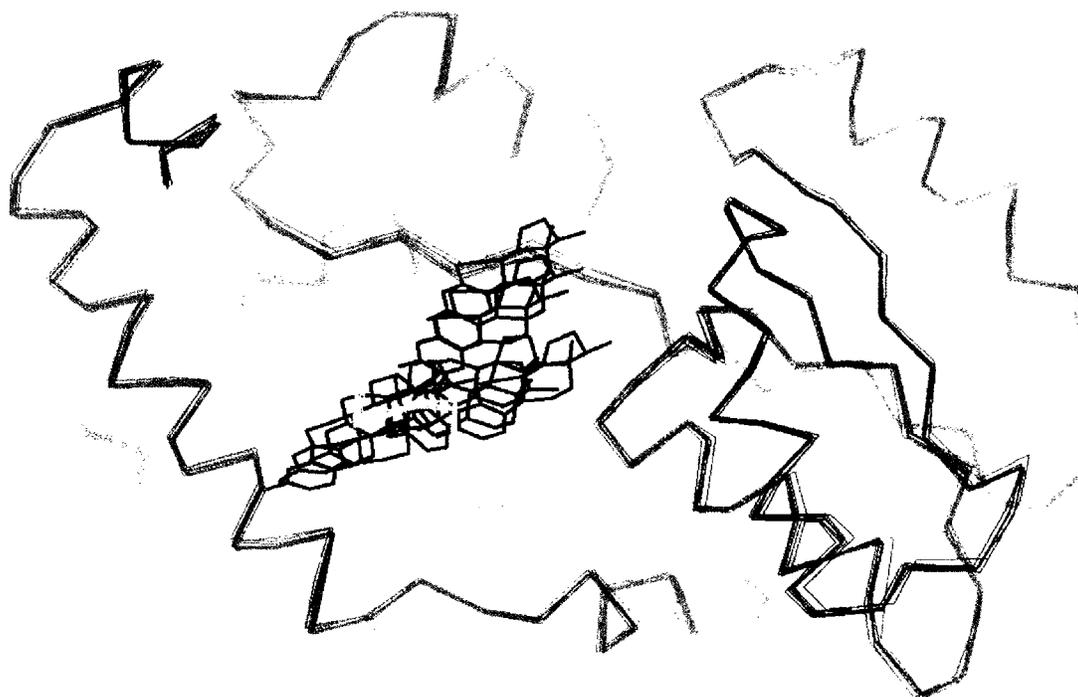
Tableau I.B.2: Énergies d'interaction B, en liaison alternative

	Total	Électro	VdW	H	Solv
B_E1_i, 1	-10,1	0,6	-21,6	-0,1	11,0
B_E1_i, 2	-10,4	0,3	-17,7	-0,6	7,5
B_E1_i, 3	-14,1	-2,9	-18,2	-0,6	7,5
B_E1m_i, 1	-15,7	-3,6	-22,2	-1,1	11,2
B_E1m_i, 2	-12,8	-2,3	-15,6	-1,2	6,3
B_E1m_i, 3	-14,1	-2,4	-16,6	-1,1	6,0
B_E2_i, 1	-14,4	-2,3	-17,6	-0,7	6,2
B_E2_i, 2	-11,6	-2,4	-15,6	-0,9	7,4
B_E2_i, 3	-12,3	-2,0	-14,9	-0,4	5,0
B_E2m_i, 1	-10,4	0,7	-21,0	0,0	9,9
B_E2m_i, 2	-9,5	-0,2	-15,6	-0,3	6,6
B_E2m_i, 3	-9,3	-0,3	-14,7	-0,1	5,8
B_T_i, 1	-16,0	-2,8	-22,2	0,0	9,1
B_T_i, 2	-15,3	-5,0	-18,9	-1,2	9,8
B_T_i, 3	-13,8	-2,1	-18,8	-0,5	7,5
B_Tm_i, 1	-13,9	-4,0	-19,6	0,0	9,6
B_Tm_i, 2	-8,4	-2,1	-12,4	-0,3	6,3
B_Tm_i, 3	-7,7	-1,3	-11,4	0,0	5,0
B_DHT_i, 1	-9,8	-3,7	-11,6	-0,5	6,0
B_DHT_i, 2	-12,3	-6,7	-13,6	-1,1	9,1
B_DHT_i, 3	-12,1	-3,7	-15,8	-0,5	7,8
B_DHTm_i, 1	-9,7	-1,3	-15,1	0,0	6,6
B_DHTm_i, 2	-10,5	-3,1	-16,8	-0,6	10,1
B_DHTm_i, 3	-13,6	-1,9	-18,8	-0,1	7,3
B_DHEA_i, 1	-13,4	-4,0	-20,3	-0,6	11,5
B_DHEA_i, 2	-10,7	0,0	-18,8	-0,4	8,6
B_DHEA_i, 3	-13,0	-0,8	-18,8	0,0	6,6
B_DHEAm_i, 1	-13,2	-2,1	-17,7	-0,5	7,2
B_DHEAm_i, 2	-11,1	-1,8	-14,7	-0,8	6,2
B_DHEAm_i, 3	-9,7	-0,5	-13,8	-0,5	5,1

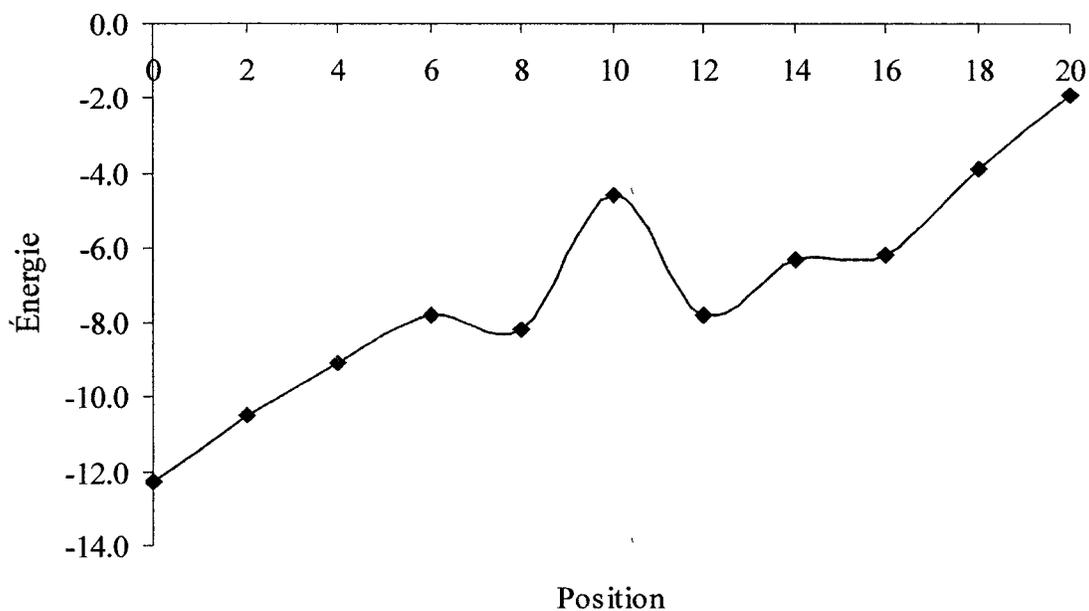
### I.C Translation de E2 par l'entrée de la boucle flexible

Cette translation a été réalisée à partir de la structure complète de 1IOL (numéro d'accès à la banque de données PDB) (Azzi *et al.*, 1996). 1IOL a été choisi parce que la boucle flexible de l'enzyme est dans sa conformation ouverte. À cause de la lenteur des calculs d'un tel modèle (enzyme complète), chaque minimisation a été effectuée une seule fois pour chaque position de translation. L'axe de translation passe par les atomes C11 et C16 (plutôt que C3-C17) et pour chaque trajectoire de MCM, E2 est déplacé de 2 Å le long de cet axe.

La figure I.C.1 montre E2 passant à travers l'ouverture de la boucle flexible, où E2 est en vert, le tracé des C $\alpha$  en violet sauf pour les résidues de la boucle flexible (187 à 200), qui est en jaune foncé. La figure I.C.2 est un graphique de l'énergie de liaison en fonction de la position de translation, 0 étant la position observée dans la structure cristallographique. Le ligand semble avoir pris deux chemins pour sortir du site de liaison. En fait, il se déplace en ligne droite jusqu'à la position 10 Å, où il entre « en collision » avec l'enzyme, générant la barrière énergétique observée dans le graphique. Dans la figure I.C.1, cette position correspond à la conformation de E2 qu'on peut voir le plus à droite de la figure. Aux positions suivantes, E2 est forcé de se déplacer un peu de sa trajectoire initiale pour pouvoir sortir du site actif. Ormis la barrière énergétique en position 10, qui pourrait être causée par un mauvais paramétrage de la simulation, la sortie de E2 est graduelle, avec ce qui pourrait être un plateau entre les positions 8 et 16 (figure I.C.2). D'autres modélisations et expériences seront nécessaires pour déterminer hors de tout doute comment les substrats entrent et sortent du site actif.



**Figure I.C.1 :Trajectoire de E2 pour sortir du site de liaison de la 17 $\beta$ -HSD1 par la boucle flexible.** Dans cette superposition d'images, E2 est en vert et le tracé des C $\alpha$  est en violet, sauf pour les résidues de la boucle flexible qui sont en jaune foncé. On remarque à un certain point un changement de direction de E2, correspondant à la barrière énergétique du profil (figure I.C.2).



**Figure I.C.2 : Profil de l'énergie de liaison (kcal·mol<sup>-1</sup>) en de E2 en fonction de sa position de translation (Å) pour sa sortie du site de liaison par la boucle flexible. L'énergie d'interaction ligand-recepteur augmente de façon régulière au fur et à mesure que E2 sort du site de liaison, sauf pour la barrière en position 10, qui pourrait n'être en fait qu'un problème de flexibilité de translation lors de la simulation.**

## **Annexe II: Principes de base en modélisation moléculaire**

La modélisation moléculaire est une discipline qui, depuis quelques années, est en expansion dans la recherche pharmaceutique et en biologie structurale. Cependant, elle est assez récente et ce n'est pas tout le monde qui est familier avec les termes employés tout au long de ce mémoire, surtout dans la section de la Méthodologie. Cette annexe a donc pour but de donner quelques explications et descriptions des principes de base de modélisation moléculaire utilisés par le progiciel ZMM. N'étant pas un expert en biophysique, en chimie théorique et en informatique, je vais décrire de mon mieux ces principes généraux dans les pages qui suivent. Pour ceux qui désireraient avoir des informations plus détaillées, surtout au niveau des équations mathématiques et des algorithmes, je suggère fortement de consulter l'ouvrage sur lequel je vais principalement me baser pour écrire cet annexe, *Molecular Modelling : Principles and Applications* par Andrew R. Leach. La structure des parties de l'annexe seront très semblables à l'ordre des chapitres du livre et toutes les informations écrites viendront de ce livre, sauf lorsque des références seront explicitement écrites dans le texte.

### **II.A. Champ de force**

### **II.B. Minimisation d'énergie**

#### II.B.1 Introduction

#### II.B.2 Méthodes de minimisation et leurs différences

## II.A. Champ de force

Le champ de force sert à définir les propriétés structurales dans une simulation de mécanique moléculaire. Dans ce type de simulation, le système atomique est simulé selon les lois de la mécanique classique, où un atome est considéré comme un objet sphérique centré sur la position de son noyau. Ainsi, les calculs ne tiennent pas compte du déplacement et de la position des électrons, à l'opposé de simulations faites selon les lois de la mécanique quantique. L'utilisation de la mécanique quantique se fait sur des systèmes comportant quelques atomes, mais pour la simulation d'une protéine, il est extrêmement plus rapide et tout aussi fiable et efficace d'utiliser la mécanique moléculaire.

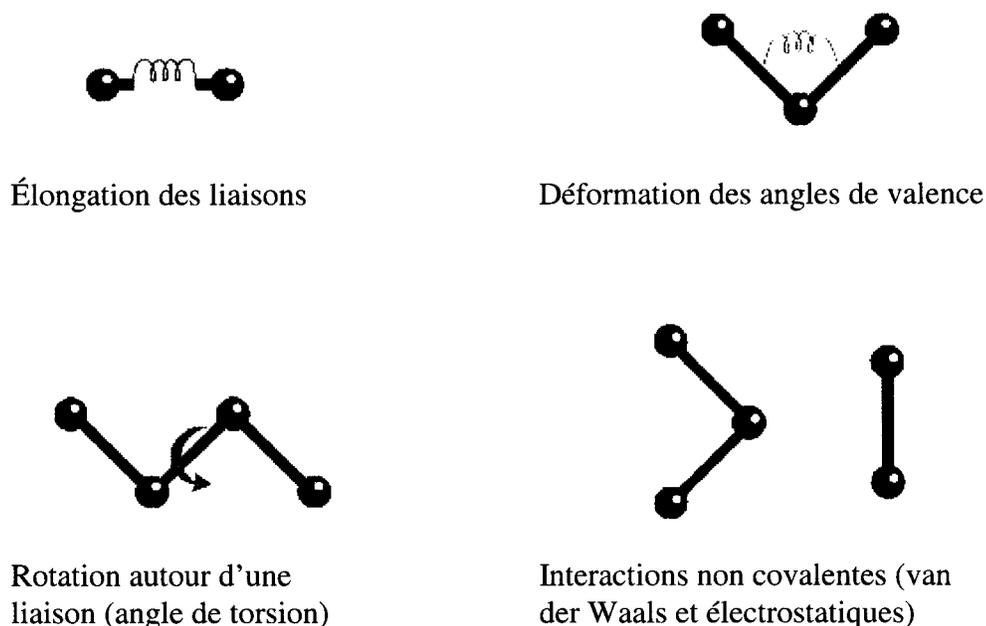
Donc, le champ de force est essentiel pour calculer l'énergie potentielle d'un système atomique. Il définit, pour un type d'atome donné, des paramètres optimaux comme la longueur de liaison, l'angle de déformation, l'angle de torsion ainsi que des valeurs constantes comme le rayon de Van der Waals et la charge électrostatique partielle en fonction de sa position, comme démontré dans l'équation générale suivante :

$$E(r^N) = \sum_{\text{liaisons}} k_i(r-r_0)^2/2 + \sum_{\text{angles}} k_i(\theta-\theta_0)^2/2 + \sum_{\text{torsions}} V_n(1 + \cos(n\omega-\gamma))/2$$

$$+ \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N (4\varepsilon_{ij}[(\sigma_{ij}/r_{ij})^{12} - (\sigma_{ij}/r_{ij})^6] + q_i q_j / 4\pi\varepsilon_0 r_{ij})$$

où  $E(r^N)$  est l'énergie potentielle du système en fonction de la position  $r$  de  $N$  atomes. Chaque type d'interaction est schématisé à la figure A.1. Le premier terme décrit l'élongation des liaisons, où  $r_0$  est la longueur de référence et le second terme décrit la déformation des angles de valences, où  $\theta_0$  est l'angle de référence. En fait, ces deux termes se comportent comme la loi des ressorts de Hook, où  $k_i$  est la constante d'énergie potentielle. Le troisième terme décrit l'énergie de la rotation d'une liaison et le quatrième, les interactions non covalentes. Dans ce dernier, la première partie calcule les interactions

de van der Waals selon le potentiel 6-12 de Lennard-Jones et la deuxième partie calcule les interactions électrostatiques selon la loi de Coulomb. Les interactions non covalentes sont calculées entre chaque pair d'atomes  $i$  et  $j$ . Un cinquième terme  $E_r$  peut être ajouté à cette équation, pour le calcul des termes de pénalité d'énergie pour les contraintes (voir section 2.1).



**Figure II.A.1 : Schémas des contributions au champ de force.** (Figures tirées du *User Guide de InsightII* (MSI, California, USA))

Un champ de force définit plusieurs types d'atomes et plusieurs champs de force ont été mis sur pied, avec des paramètres atomiques légèrement différents, des définitions des types d'atomes différents et des méthodes de calcul différentes. L'équation donnée plus haut est une équation de base utilisée dans le champs de force AMBER; il existe d'autres termes (dont je n'ai pas nécessairement connaissance) et les autres champs de force peuvent d'ailleurs utiliser des équations différentes pour calculer un même terme. Malgré cette différence dans les équations, les champs de force donnent généralement des résultats

semblables entre eux. Par type d'atome, le champs de force ne décrit pas seulement un élément, mais il le fait selon les types de liaisons qu'il forme. Par exemple, les paramètres pour un carbone  $sp^2$  et  $sp^3$  seront différents, même qu'un carbone cétonique  $sp^2$  sera différent d'un carbone  $sp^2$  lié à d'autres carbones. AMBER a été largement utilisé et a été optimisé pour la simulation des protéines, des acides nucléiques, et des petites molécules organiques utilisées comme ligand à une protéine.

## II.B. Minimisation d'énergie

### II.B.1 Introduction

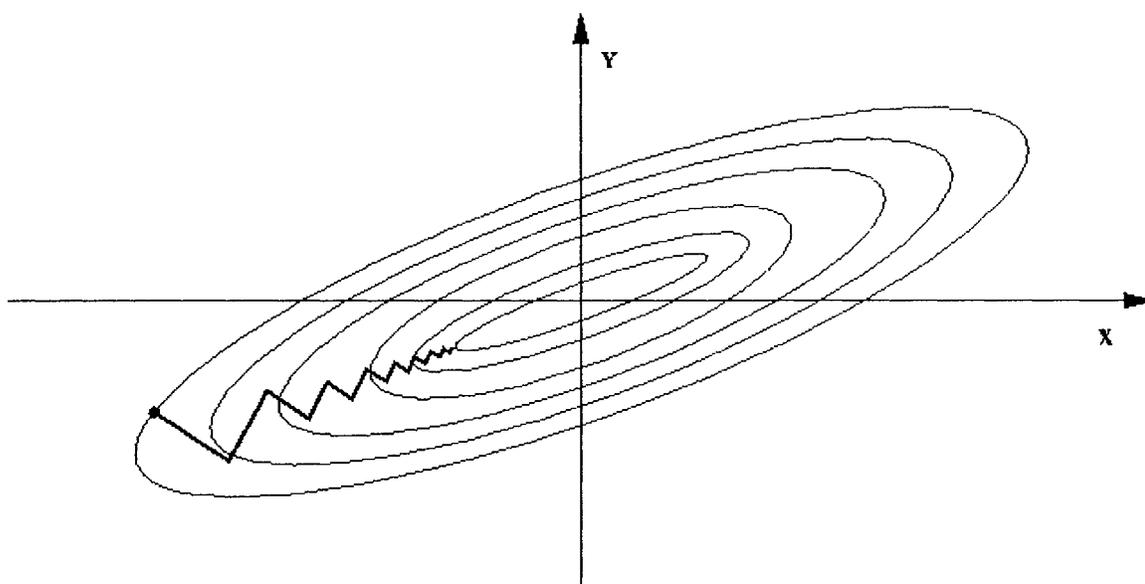
On représente souvent l'énergie d'un système atomique par une surface d'énergie où chaque point correspond à une conformation du système. La surface peut prendre l'allure de n'importe quel type de géographie comme un paysage montagneux, une vallée ou même une plaine avec quelques collines, et chaque sommet (de montagne) représente un pic élevé de l'énergie ou une barrière énergétique alors que chaque creux représente un minimum de l'énergie, celui ayant l'altitude la plus basse correspondant au minimum global de la structure. Les algorithmes de minimisation servent à amener une structure, dont la conformation initiale de l'énergie se trouve «à flanc de montagne», vers une conformation d'énergie minimale locale, soit le creux où la vallée la plus proche du point de départ.

Mathématiquement, la minimisation correspond à une fonction  $f$ , dépendante de plusieurs variables indépendantes  $x_1, x_2, \dots, x_i$  (i.e. coordonnées internes) et l'algorithme doit trouver les valeurs des variables donnant une valeur minimale de  $f$ . Cette équation est résolue en utilisant la dérivée première de l'énergie, car elle permet de déterminer les forces exercées par et sur chaque atome. La dérivée première de l'énergie (le gradient) indique la direction du minimum et l'amplitude du gradient détermine l'inclinaison de la pente. L'énergie est donc abaissée en bougeant chaque atome en réponse à la force exercée sur eux, cette force équivalant à la forme négative du gradient. Puisque chaque mouvement d'un atome change l'énergie du système, l'équation est constamment résolue selon un processus itératif.

### II.B.2 Méthodes de minimisation et leurs différences (grande pente et gradient conjugué)

La méthode de la plus grande pente est la plus simple et est surtout utilisée pour abaisser l'énergie initiale du système, lorsque la structure présente des conformations de très haute énergie comme de grandes interactions stériques défavorables ou des liaisons atome-atome trop longues. Sans entrer dans les détails mathématiques, l'algorithme fait une recherche linéaire sur la surface énergétique, c'est-à-dire qu'il cherche un minimum de la

surface en suivant une ligne droite dans une direction où le gradient (ou la pente) est le plus grand (ou le plus à-pic). Lorsqu'un minimum au long de cette ligne est trouvé, il refait le même procédé dans une direction perpendiculaire à la direction de la ligne précédente. La méthode permet d'abaisser rapidement l'énergie initiale de la structure, mais elle converge très lentement. Plus on se rapproche du minimum local, plus le pas fait en direction du minimum est petit (figure B.1). De plus, puisque chaque étape va toujours dans la direction perpendiculaire à la précédente, elle peut revenir sur ses pas plutôt que de converger.



**Figure II.B.1 : Comportement oscillatoire de la méthode de la plus grande pente.** Plus l'algorithme se rapproche du minimum, plus il prend de temps à converger puisque la ligne utilisée pour rechercher le minimum va toujours dans les deux mêmes directions.

La méthode du gradient conjugué est semblable à celle de la plus grande pente, sauf que le changement de direction de la recherche linéaire n'est pas orthogonal, il est conjugué. La méthode se « souvient » des gradients précédents et peut donc déterminer une nouvelle direction à suivre à partir des précédentes, évitant de revenir sur ses pas et accélérant la convergence vers un minimum. Cependant, lorsque le gradient est élevé et l'énergie de la structure est loin d'un minimum, la méthode est instable et aura de la difficulté à converger correctement. Dans ce cas, il est préférable d'utiliser la méthode de la plus grande pente,

qui converge beaucoup mieux lorsque le gradient est élevé. C'est ce que fait ZMM lorsqu'il minimise une structure : si le gradient est élevé, la méthode de la plus grande pente est utilisée pour abaisser l'énergie de la structure jusqu'à ce que la structure devienne plus stable et que le gradient soit assez bas pour que la méthode du gradient conjugué soit plus efficace (section 2.1 et tableau 2.1).