



N ° Ref :

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

**Étude *in silico* des interactions de nouveaux inhibiteurs sur la
Cyclooxygénase, cible enzymatique impliquée dans les
phénomènes d'inflammation**

Présenté par :

- KHENIOUI Aya
- BENDALI HOUSSINE Zeyneb
- CHEKROUD Chaima

Devant le jury composé de :

Présidente : BENDJEDDOU Mouna	M.C.B	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila
Rapporteur : BOUCHERIT Hanane	M.C.B	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila
Examinatrice : MERZOUG Amina	M.C.A	Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Année Universitaire : 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciement

Tout d'abord merci beaucoup dieu de nous donner la patience et la force et le courage pour compléter ce travail.

*Nous exprimons nos profonds remerciements et nos vives Reconnaisances au **Dr. BOUCHERIT Hanane**, Maître de conférences classe B au Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila pour avoir acceptée de diriger et de réaliser ce travail. Nous vous remercions pour votre confiance, votre soutien et votre disponibilité. Vos qualités morales, intellectuelles et surtout votre intérêt pour la science forcent le respect et l'admiration.*

*Nous tenons à exprimer toute reconnaissance au **Dr. BENDJEDDOU Mouna**, Maître de conférences classe B au Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nos profonds remerciements vont aussi au **Dr. MERZOUG Amina**, Maître de conférences classe A au Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf de Mila, pour avoir acceptée à examiner ce travail.*

Enfin, nous remercions nos familles, nos amis et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à la réussite de ce travail.





Dédicace

Avant toute personne, le grand merci revient toujours à notre DIEU le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience et qui a éclairé mon chemin pour achever ce travail.

Après, Je tiens à dédier ce modeste travail À :

*La femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse, Mon adorable mère : **Aicha***

Aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte, Que dieu vous vous garde pour moi inshallah.

*À mon superbe père **Mounir** :*

Merci pour l'amour qu'elle m'a toujours donné, leur encouragement et toute l'aide quelle m'a apporté durant mes études. Puisse Dieu leur accorde santé,

*A mon unique frère adorable : **Yahya** et mes tendres sœurs : **Rayane** et **Nahla**, vous êtes mes sources de joie et de motivation, merci d'être toujours là pour moi sans même que je demande, Un grand merci à eux pour le partage de la bonne humeur dans tous mes moments difficiles. Je vous aime.*

*À mon fiancé : **Charaf***

Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments difficiles de cette vie. A celui qui a su m'épauler, m'encourager et surtout être patient avec moi ; sans toi je ne pourrai pas accomplir ce travail. Que Dieu te protège et t'offre le bonheur. Je n'oublier jamais ta faveur.

A tous et toutes vrais amis qui sont toujours à ma côté.

Zeyneb



Dédicace

Avant toute chose, le grand merci revient toujours à notre DIEU de m'avoir accordé la santé et les moyens de réaliser ce travail.

A ma très chère mère

*A une personne qui m'a tout donné sans compter.
Aucun hommage ne saurait transmettre à sa juste valeur l'amour,
le dévouement et le respect que je porte pour toi. Ta bienveillance me guide et ta
présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents
obstacles. Sans toi, je ne suis rien.*

J'implore Dieu qu'il te procure santé.

A mon très cher père

*A mon bon idole dans la vie, à l'homme qui a donné sa vie pour
Nous. Qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort
Pour me rendre heureuse. Mon précieux cadeau de Dieu qui me doit ma vie, ma réussite et
mon respect.*

À mon cher frère Younes allah yarhmo

A mes très chers frères Anes, messaoude, hichem et yasser

A mes chères sœurs Imane et meryem

*Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et
encouragements.*

Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A Mes cousins et mes cousines notamment Hadjer, Amina, Ihcen, Manel.

A ma deuxième mère samira et wafa

A toute la famille khenioui

A ma chère enseignante Mme Boucherit Hanane et mes Chères amis Zineb, Chaima

Qui m'ont toujours encouragée, je vous souhaite plus de succès.

AYA



Dédicace

Chaque fois qu'on achève une étape importante dans notre vie, on fait une pose pour regarder en arrière et se rappeler toutes ces personnes qui ont partagé avec nous tous les bons moments de notre existence, mais surtout les mauvais.

Je dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance et de respect

A mon cher père Mohamed, que Dieu lui fasse miséricorde, Qui m'a fait protéger

Toute ma vie

A ma très chère mère Salima, qui m'a donnée la tendresse et l'amour.

A mon petit frère Yahya.

A ma soeur Souha.

A tous mes oncles et tantes, ainsi que mes cousins.

A ma chère enseignante Mme Boucherit Hanane et à mes collègues Aya et

Zeyneb, qui ont été mon bras droit, ma source d'inspiration et de soutien au cours de la réalisation de ce travail.

A mes chères amies : Oussama, Asma, Hadil, Samir, Omar, Hind Et tous ceux qui me connaissent sans exception.

A toutes la famille Chekroud et la famille Boudjnana.

A tous mes enseignants sans exception.

CHAIMA

Thème : Etude *in silico* des interactions de nouveaux inhibiteurs sur la cyclooxygénase, cible enzymatique impliquée dans les phénomènes de l'inflammation.

Résumé

De nos jours, les méthodes *in silico* sont de plus en plus employées dans les stratégies de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Au cours de cette recherche, nous nous sommes appuyés sur le traitement de maladies inflammatoires basé sur l'inhibition de la cyclooxygénase-2, une enzyme importante impliquée dans la production de prostaglandines, des substances qui jouent un rôle clé dans l'inflammation.

L'objectif principal de notre travail, consiste à étudier au moyen du docking moléculaire par le programme Surflex-dock, les modes de liaison d'une série de petites molécules chimiques sur la cible COX-2 et, ensuite à proposer des nouveaux inhibiteurs potentiels pour cette cible.

Le logiciel Surflex-dock est hautement performant, avec un bon coefficient de corrélation linéaire ($r = -0,63$) entre l'affinité et l'activité biologique IC_{50} . On peut donc, utiliser ce programme sans trop de risque d'erreurs pour générer par simulation informatique de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme COX-2. L'évaluation de l'affinité des inhibiteurs issus de la PDB a permis de dégager celles présentant le meilleur effet inhibiteur. Il s'agit de composé FLP dont le score de docking est égale à 5.96 M^{-1} . Le docking moléculaire par Surflex-dock d'une collection de 297 similaires de l'inhibiteur FLP issus de la chimiothèque PubChem avec 95% de similarité, fait ressortir les composés CID72099 et CID448006 comme meilleurs inhibiteurs de la COX-2 qui ont des affinités égale à 7.59 M^{-1} pour le premier et 7.54 M^{-1} pour le second.

Afin de valider ces résultats, la prédiction *in silico* de la similarité médicamenteuse nous informe de manière positive sur les propriétés ADME-Tox des inhibiteurs proposés.

Mots clés : cyclooxygénase-2, l'inflammation, docking moléculaire, Surflex-dock, filtrage ADME-Tox

Theme: In silico study of the interactions of new inhibitors on cyclooxygenase, enzymatic target involved in the phenomena of inflammation.

Summary

Currently, *in silico* methods are increasingly use in the strategies of discovery of new molecules for therapeutic purposes. During this research, we have relied on the treatment of inflammatory diseases based on the inhibition of cyclooxygenase-2, an important enzyme involved in the production of prostaglandins, substances that play a key role in inflammation.

The main objective of our work is to study by means of molecular docking with Surflex-dock program, the binding modes of a series of small chemicals molecules on the COX-2 target and, then to propose new potential inhibitors for this target.

The Surflex-dock software is highly efficient, with a good coefficient of linear correlation ($r = -0.63$) between affinity and biological activity IC_{50} . So we can, use this program without too much risk of errors to generate by computer simulation novel COX-2 inhibitors. Assessing the affinity of inhibitors derived of PDB made it possible to identify those presenting the best inhibitory effect. Its FLP compound who is the docking score is equal to 5.96 M^{-1} . Molecular docking by Surflex-dock of a collection of 297 similar of inhibitor FLP from the chemical library PubChem with 95% similarity, highlights compounds CID72099 and CID448006 as the best COX-2 inhibitors which have affinities equal to 7.59 M^{-1} for the first and 7.54 M^{-1} for the second.

In order to validate these results, the *in silico* prediction of drug similarity positively informs about the ADME-Tox properties of the proposed inhibitors.

Keywords: cyclooxygenase-2, inflammation, molecular docking, Surflex-dock, filtering ADME-Tox.

الموضوع: دراسة ان سيليكو لتفاعلات المثبطات الجديدة على انزيمات الأكسدة الحلقية، الهدف الأنزيمي المتسبب في ظاهرة الالتهاب.

ملخص

في الوقت الحاضر، تستخدم أساليب ان سيليكو بشكل متزايد في استراتيجيات اكتشاف جزيئات جديدة لأغراض علاجية. خلال هذا البحث لقد اعتمدنا على علاج الأمراض الالتهابية على أساس تثبيط انزيمات الأكسدة الحلقية -2 ، وهو إنزيم مهم يشارك في إنتاج البروستاجلاندين ، المواد التي تلعب دورًا رئيسيًا في الالتهاب .

الهدف الرئيسي من عملنا هو الدراسة عن طريق الالتحام الجزيئي بواسطة برنامج Surflex-dock ، أنماط الربط لسلسلة من الجزيئات الكيميائية الصغيرة على هدف COX-2 ، ثم اقتراح مثبطات محتملة جديدة لهذا الهدف.

يتميز برنامج Surflex-dock بكفاءة عالية، مع معامل جيد يبلغ الارتباط الخطي ($r = -0.63$) بين التقارب والنشاط البيولوجي IC_{50} إذن نحن نستطيع، استخدام هذا البرنامج دون مخاطر كبيرة عن طريق محاكاة الكمبيوتر مثبطات إنزيم COX-2 الجديدة. تقييم تقارب المثبطات المشتقة من PDB جعل من الممكن تحديد أولئك الذين يقدمون أفضل تأثير مثبط. إنها مركب FLP الذي درجة إرساءه تساوي $5.96 M^{-1}$. الالتحام الجزيئي ب Surflex-dock لمجموعة من 297 مثبط مشابه ل FLP من المكتبة الكيميائية PubChem مع تشابه 95% ، يبرز المركبين CID72099 و CID448006 كأفضل مثبطات COX-2 التي لها تقاربات تساوي $7.59 M^{-1}$ للأول و $7.54 M^{-1}$ للثاني.

من أجل التحقق من صحة هذه النتائج، التنبؤ ان سيليكو للتشابه بين الأدوية يبلغ بشكل إيجابي عن خصائص ADME-Tox للمثبطات المقترحة.

الكلمات المفتاحية: انزيمات الأكسدة الحلقية -2، الالتهاب، الالتحام الجزيئي، Surflex-dock، التصفية -ADME، توكنس.

Table des matières

Table des matières

Résumé

Summary

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des graphes

Liste des abréviations

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I. L'INFLAMMATION

I. Définition de l'inflammation 4

II. Etiologie de l'inflammation 5

III. Types de l'inflammation 6

 III.1. L'inflammation aiguë 6

 III.2. L'inflammation chronique 7

IV. La relation entre les maladies et l'inflammation 8

 IV.1. L'asthme 8

 IV.2. Le cancer 8

 IV.3. Alzheimer 9

 IV.4. La fièvre 9

 IV.5. Le rhumatisme 10

V. Traitement par les anti-inflammatoires 10

 V.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens 10

 V.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens 10

CHAPITRE II. LA CYCLOOXYGENASE

I. Définition de la cyclooxygénase 13

II. Rôle de la cyclooxygénase 13

III. Classification	14
IV. La cyclooxygénase 2	15
IV.1. Définition	15
IV.2. La structure	16
IV.3. Le gène de la COX-2	17
IV.4. Site actif de COX-2 et interaction.....	18
V. Inhibiteurs de cyclooxygénases-2	20
V.1. Les inhibiteurs non sélectifs	21
V.2. Les inhibiteurs sélectifs	22
VI. Rôles biologiques de la COX-2	22

CHAPITRE III. LE DOCKING MOLECULAIRE

I. Introduction à la modélisation moléculaire	24
II. Définition de docking moléculaire	25
III. Principe de docking moléculaire.....	26
III.1. La première étape (le docking).....	27
III.2. La deuxième étape (le scoring)	27
IV. Les types de docking	28
V. Les outils du docking moléculaire	28
V.1. Récepteur.....	28
V.2. Ligand.....	28
VI. Les interactions intermoléculaires	29
VI.1. Les forces de Van Der Waals.....	30
VI.2. Les liaisons hydrogène.....	30
VI.3. L'effet hydrophobe	31
VI.4. Les interactions électrostatiques	31
VII. Programmes de docking	32
VIII. Etapes typiques du Docking moléculaire.....	34

IX. Le programme du docking moléculaire Surflex-dock	35
--	----

CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES

I. Matériel.....	38
I.1. Micro-ordinateurs	38
I.2. Les bases de données	38
I.2.1. Protéine Data Bank (PDB)	38
I.2.2. PubChem	39
I.3. Programmes utilisés	40
I.3.1. Le logiciel Surflex-dock.....	40
I.3.2. Microsoft Excel	40
I.3.3. Open Babel	41
I.3.4. ViewerLite.....	41
I.3.5. Discovery Studio Visualizer	42
I.4. Les Serveurs.....	43
I.4.1. SwissADME.....	43
I.4.2. PreADMET	44
II. Méthodes	45
II.1. Test de fiabilité de programme Surflex-dock	45
II.1.1. Coefficient de corrélation r	45
II.1.2. Analyse visuelle	46
II.2. Réalisation du docking moléculaire par Surflex-dock	46
II.2.1. Préparation d'enzyme	46
II.2.2. Préparation des ligands	46
II.2.3. Docking par Surflex-dock.....	46
III. Prédiction de la similarité médicamenteuse.....	48
III.1. Propriétés physico-chimiques	48
III.1.1. Règle de lipinski	48

III.1.2. Règle de veber	49
III.2. Propriétés pharmacocinétiques.....	49
III.2.1. Absorption	49
III.2.2. La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.....	49
III.2.3. Inhibition des CYP450	50
III.3. La toxicité.....	50
III.3.1. Mutagénicité par le test Ames	51
III.3.2. Cancérogénicité	51
III.3.3. Inhibition de HERG.....	52

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Tests de fiabilité du programme de dockingSurflex-dock.....	54
I.1. Le coefficient de corrélation linéaire (r)	54
I.2. Analyse visuelle	58
I.3. Conclusion	62
II. Etude des interactions intervenant dans l'inhibition de la COX-2 par diverses molécules provenant de la PDB	62
II.1. Choix du complexe 4PH9.....	62
II.2. Interaction 4PH9-inhibiteurs	63
II.3. Notion du site actif	67
II.4. Les acides aminés du site actif de l'enzyme COX-2	68
II.5. Analyse visuelle des interactions« 4PH9-FLP»	69
III. Proposition de nouveaux inhibiteurs du COX-2.....	70
III.1. Inhibition du COX-2 par les similaires de l'inhibiteur FLP.....	70
III.2. Molécules sélectionnées comme candidats	78
III.3. .Prédiction du mode d'interaction des meilleurs composés	78
III.3.1. Interaction 4PH9-CID72099.....	79
III.3.2. Interaction 4PH9-CID448006.....	80

IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse	82
IV.1. Propriétés physico-chimiques	82
IV.2. Propriétés pharmacocinétiques	83
IV.3. La toxicité	84
CONCLUSION	86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau III.1	Les principaux programmes de docking moléculaire.	33
Tableau III.2	Étapes typiques d'un docking.	34
Tableau V.1	Corrélation entre les scores donnés par Surflex-dock de 71 complexes et leur activité biologique (logIC ₅₀)	54
Tableau V.2	Valeurs de RMSD de 25 complexes COX2-inhibiteur étudiés.	58
Tableau V.3	Valeurs de RMSD des trois complexes de la COX2 choisis.	59
Tableau V.4	Les caractéristiques de l'enzyme 4PH9.	63
Tableau V.5	Les valeurs d'affinité des complexes 4PH9-inhibiteur.	63
Tableau V.6	Valeurs de l'affinité des similaires de FLP par Surflex-dock.	70
Tableau V.7	Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats.	78
Tableau V.8	Critères de la règle de <i>Lipinski</i> pour les inhibiteurs à partir de serveurs swissADME	82
Tableau V.9	Propriétés pharmacocinétiques des inhibiteurs à partir de serveurs swissADME	83
Tableau V.10	Le profil de toxicité des composés étudiés obtenus à partir de serveur PreADMET.	84

Liste des figures

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure I.1	La réaction inflammatoire.	5
Figure I.2	Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë.	7
Figure I.3	Causes et conséquences du microenvironnement tumoral inflammatoire.	9
Figure II.1	Voie de la cyclooxygénase.	14
Figure II.2	Métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases.	15
Figure II.3	Structure 3D de COX-2, code : 3HS5.	16
Figure II.4	Représentation schématique de la structure du gène de la COX-2 humaine et des éléments promoteurs.	17
Figure II.5	Sites actifs Structure 3D de la COX-2 et les acides aminés essentiels du actif de la COX-2	19
Figure II.6	Les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques.	20
Figure II.7	Quelques inhibiteurs spécifiques de la COX-2.	21
Figure III.1	Aperçu du processus d'amarrage moléculaire.	26
Figure III.2	Représentation schématique des étapes Du docking moléculaire.	27
Figure III.3	Les forces de Van Der Waals.	30
Figure III.4	La liaison hydrogène.	31
Figure III.5	Interactions hydrophobes.	31

Figure III.6	Les interactions électrostatiques.	32
Figure III.7	Digramme des programmes de docking les plus cités.	32
Figure III.8	La méthode de construction incrémentale.	36
Figure IV.1	Interface de la Protein Data Bank.	39
Figure IV.2	Interface de la PubChem.	40
Figure IV.3	Conversion de fichiers par le programme Open Babel.	41
Figure IV.4	Visualisation par le logiciel Viewerlite.	42
Figure IV.5	Visualisation par le logiciel Discovery Studio Visualizer.	43
Figure IV.6	Interface graphique du serveur SwissADME.	44
Figure IV.7	Interface graphique de serveur PreADMET.	45
Figure IV.8	Capture d'écran des résultats du docking obtenus Par le logiciel surflex-dock.	47
Figure IV.9	Résultat du calcul de RMSD par le programme surflex-dock.	48
Figure IV.10	Schéma explicatif de test d'Ames.	51
Figure V.1	Superposition du ligand S58 du complexe 1CX2 simulé par surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).	60
Figure V.2	Superposition du ligand LM8 du complexe 1PXX simulé par surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré vert).	60

Figure V.3	Superposition du ligand DIF du complexe 4RUT simulé par surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré vert).	61
Figure V.4	Structure 2D et 3D du ligand LM8.	62
Figure V.5	Structure 3D de l'enzyme COX-2 avec les acides	68
Figure V.6	Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur FLP dans le site actif de la COX-2.	69
Figure V.7	Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur FLP.	70
Figure V.8	Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur CID72099	79
Figure V.9	Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur CID72099.	80
Figure V.10	Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur CID448006.	81
Figure V.11	Représentation des liaisons hydrophobes formées par l'inhibiteur CID448006.	81

Liste des graphes

Liste des graphes

Graphe	Titre	Page
Graphe V.1	Corrélation linéaire entre les Affinités des différents inhibiteurs données par sSurflex-dock et leur activité biologique (logIC ₅₀).	57

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADME-Tox : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion, Toxicité

AA : Acide Arachidonique

Å : Angström

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

COX : Cyclo-oxygénases

COX-1 : Cyclooxygénase-1

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CYP450 : Cytochrome P450

GI : Absorption Gastro-Intestinal

HERG : Human Ether-à-go-go-Related Gene

IC50 : Concentration de l'inhibiteur causant 50% d'inhibition

KDa : kilo Dalton

Log P : Le coefficient de partition Octanol /Eau

PGI2 : nprostacycline

PDB : Protein Data Bank

PG : Prostaglandines

PGH2 : Prostaglandin Endoperoxydase H2

PGD2 : Prostaglandine D₂

PGE2 : Prostaglandine E₂

PGG2 : Prostaglandine ndoperoxydase G2

QT : Quick time

RMSD : Root Mean Square Deviation

3D : Trois dimensions

Introduction



INTRODUCTION

La réaction inflammatoire est un des modes de réponse de l'organisme à une agression qui peut être physique, infectieuse, chimique, immunologique, tumorale ou traumatique [1]. Cependant, la réaction inflammatoire est déclenchée pour lutter contre une agression extérieure, et de ce point de vue elle est indispensable pour préserver le bon fonctionnement de l'organisme. Par contre, lorsque cette réaction prend trop d'ampleur, elle devient néfaste et peut perturber différents processus physiologiques régissant le corps humain.

Nous avons choisi comme cible thérapeutique une enzyme impliquée dans le phénomène de l'inflammation : la cyclooxygénases-2 ou COX-2 [2]. Cette forme de cyclooxygénase est responsable de la production élevée en prostaglandine lors du processus inflammatoire et qui possède un rôle physiopathologique. Ces métabolites sont à l'origine des processus inflammatoires. La découverte du site actif de la COX-2 a conduit au développement de plusieurs médicaments ciblant cette enzyme, comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens et les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 [3].

De nos jours, les études *in silico* correspondent à la modélisation de phénomènes biologiques, telle que l'interaction entre plusieurs molécules. Ces études utilisées pour faciliter la découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique, lorsque les méthodes chimiques classiques ont atteint leurs limites [4].

Le docking moléculaire ou amarrage est le nom donné aux simulations dans lesquelles différentes approches sont combinées pour prédire et étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur le plus souvent une protéine (cible enzymatique) et d'une petite molécule (ligand) [4].

Notre propos, dans ce mémoire, consiste à étudier *in silico* l'inhibition enzymatique de la COX-2 par divers composés. Pour cela, nous avons utilisé le programme de docking moléculaire Surflex-dock afin de détecter le meilleur inhibiteur de cette enzyme et par la même de proposer de nouveaux candidats médicament présentant un profil anti-inflammatoire.

Cette recherche est présentée sous forme de cinq chapitres. Dans le premier chapitre, nous avons donné un aperçu général sur le phénomène de l'inflammation. Le deuxième chapitre présente un descriptif détaillé de notre cible enzymatique, le cyclooxygénases-2. Tout en citant les différents inhibiteurs déjà connus de la COX-2. Le troisième chapitre est consacré à l'étude bibliographique de l'application du docking moléculaire et les divers concepts théoriques sur lesquels se base. Le quatrième chapitre, intitulé « matériel et méthodes », décrit de façon

approfondie les outils utilisés pour réaliser notre travail. Le dernier chapitre renferme les principaux résultats obtenus au cours de cette étude en comparaison avec les recherches précédentes. Nous terminons par une conclusion suivie par quelques perspectives.

CHAPITRE I. L'INFLAMMATION



CHAPITRE I : L'INFLAMMATION

I. Définition de l'inflammation

La réaction inflammatoire est la réponse de l'organisme à une agression ayant pour origine des éléments physiques : chaleur, froid, rayonnements ionisants... ou des éléments solides exogènes ou endogènes : pathogènes microbiens, piqûre d'insecte, produits chimiques ou biologiques, composés issus de la réaction immunitaire (complexes immuns, anticorps cytotoxiques, cytokines...). Quelle que soit la nature du facteur déclenchant, les manifestations de la réponse inflammatoire seront les mêmes mais avec des intensités et des durées variables. La réaction inflammatoire peut être aiguë, voire suraiguë, se manifeste immédiatement après l'intrusion des micro-organismes et dure jusqu'à 48 heures environ. Elle est la réponse typique du système immunitaire inné. La réaction inflammatoire peut aussi être chronique et ainsi durer des semaines, voire des années [5].

La réponse inflammatoire peut être divisée en trois phases (figure I.1) :

- ❖ Une phase d'initiation qui fait suite à un signal de danger d'origine exogène ou endogène et qui met en jeu des effecteurs primaires ;
- ❖ Une phase d'amplification avec la mobilisation et l'activation d'effecteurs secondaires ;
- ❖ Une phase de résolution et de réparation qui tend à restaurer l'intégrité du tissu agressé.

Ces trois phases mettent en action différents systèmes et impliquent de nombreux médiateurs. La nature du développement de chacune de ces trois phases et la nature des effecteurs primaires et secondaires impliqués (cellules résidentes et recrutées, médiateurs préformés et néoformés) conditionnent le profil d'expression clinique et biologique de la réponse inflammatoire (aiguë ou chronique, locale ou systémique, protectrice ou délétère) [6].

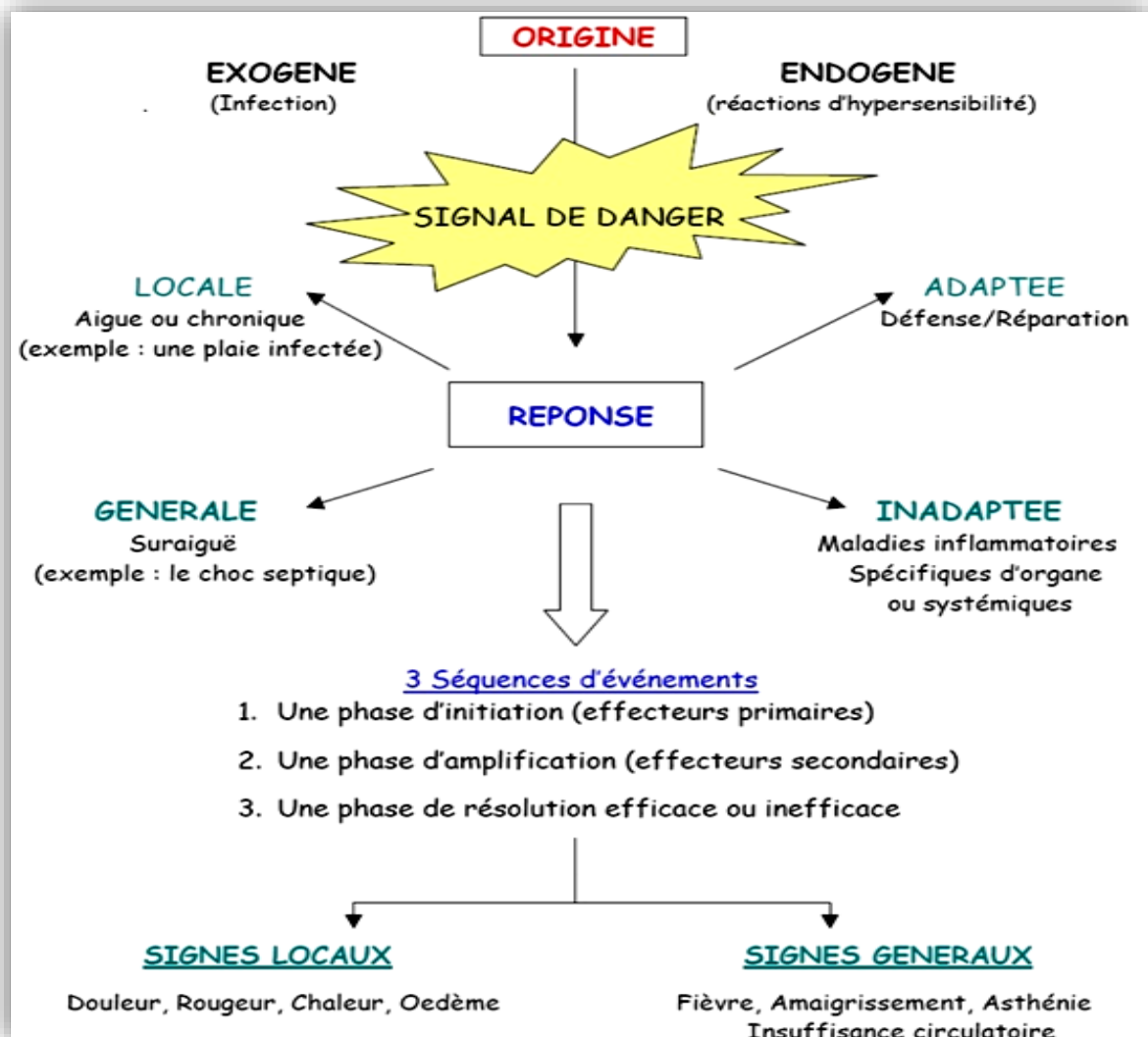


Figure I.1. La réaction inflammatoire [7].

II. Etiologie de l'inflammation

Les causes de la réaction inflammatoire sont nombreuses et variées et déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation [8] :

- **Infection** : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons) ;
- **Agents physiques** : traumatisme, chaleur, froid, radiations ;
- **Agents chimiques** : caustiques, toxines, venins ;
- **Défaut de vascularisation** : réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie ;
- **Agression dysimmunitaire** (anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité).

Autres causes [9] :

- Maladies cardiovasculaires : thromboses veineuses profondes ;
- Maladies intestinales inflammatoires comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique.
- Agression par agents physiques ou chimiques : traumatisme, chaleur, froid, radiations, toxines, venins.

Une réaction inflammatoire n'est donc pas synonyme d'infection. Un même agent pathogène peut entraîner des réactions inflammatoires différentes selon l'hôte, en particulier selon l'état des défenses immunitaires.

III. Types de l'inflammation

On distingue deux types : L'inflammation chronique et aigue.

III.1. L'inflammation aigue

L'inflammation aiguë peut être considérée comme la première ligne de défense contre les blessures infligées à un tissu. Elle fait partie du système immunitaire inné est une réaction immédiate aux agresseurs, est de courte durée (jours ou semaines), est souvent d'apparition soudaine et se caractérise par une exsudation vasculaire importante. L'inflammation aiguë guérit d'elle-même ou avec le corps il peut être traité, mais si le tissu est gravement endommagé, il peut y avoir des séquelles [10].

- **Les étapes de l'inflammation aigue** : Prenons l'exemple d'une blessure faite avec une épine de rosier [11] :

Étape 1 : Lésion cutanée permettant le passage de la barrière naturelle. Les agents pathogènes (bactéries) traversent l'épiderme puis atteignent le derme.

Étape 2 : Contamination conduisant à la pénétration des micro-organismes qui vont débuté leur multiplication cellulaire. C'est le début de l'infection.

Étape 3 : Dilatation locale des capillaires sanguins et diffusion du plasma sanguin dans les tissus avoisinants. Ce qui conduit au gonflement de la plaie et à sa rougeur (érythème et œdème). Les terminaisons nerveuses présentes sont stimulées et envoient un signal de douleur au cerveau.

Étape 4 : Diapédèse : Les phagocytes circulant dans les vaisseaux sanguins vont traverser leur paroi et venir au contact des micro-organismes. On les appelle alors macrophages tissulaires.

Étape 5 : Phagocytose : Les macrophages sont activés et fixent à leur surface les micro-organismes grâce à des récepteurs et les internalisent. Ils vont ensuite les digérer.

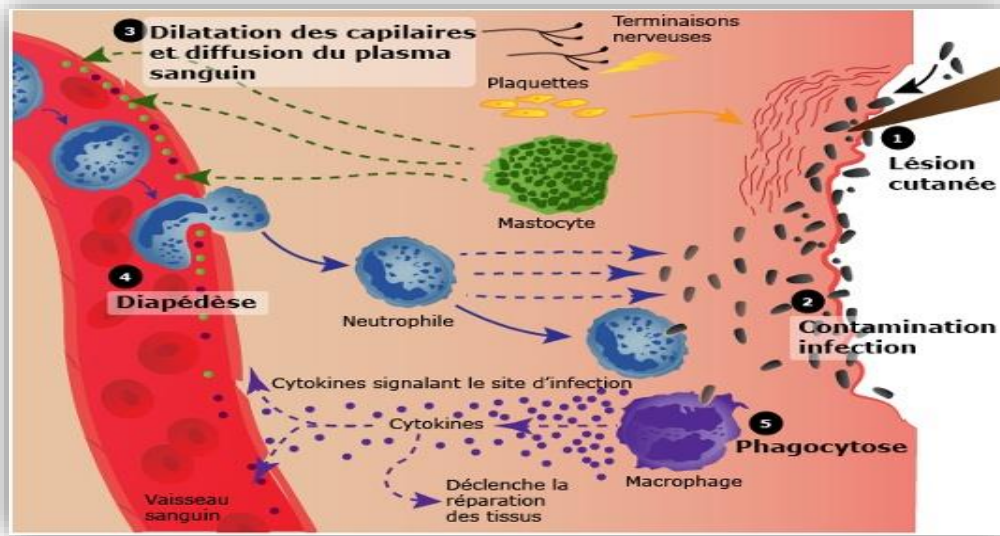


Figure I.2. Les grandes étapes de la réaction inflammatoire aiguë [12].

III.2. L'inflammation chronique

L'inflammation chronique est une phase anormale de l'inflammation, correspond à une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée caractérisée par sa persistance dans le temps, elle peut durer plusieurs semaines voire plusieurs années, d'où le terme chronique. Le caractère chronique de cette inflammation a pour origine le maintien du (ou des) facteur(s) d'agression, qui peut être d'origine infectieux, toxique, auto-immune...etc [13].

On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques :

- Les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus, ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien éparées.
- Les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique.

De plus, on distingue deux types d'inflammation chronique [14] :

- Inflammation chronique non spécifique : son évolution est sous la dépendance de facteurs locaux et systémique.

- Inflammation chronique spécifique. Elle peut être de morphologie granulomateuse ou non granulomateuse. Elle repose en partie sur l'activation des macrophages.

IV. La relation entre les maladies et l'inflammation

La réaction inflammatoire (RI) est un des modes de réponse de l'organisme à une agression qui peut être physique, infectieuse, chimique, immunologique, tumorale ou traumatique [15]. Si cette réaction devient trop importante, elle devient nocive, il peut perturber divers processus physiologiques qui contrôlent le corps humain. En réalité, l'inflammation chronique est actuellement développement de nombreuses maladies, asthme, cancer, Alzheimer, rhumatismes, fièvre,...etc.

IV.1. L'asthme

L'asthme est une des maladies chroniques les plus fréquentes. Est défini par des épisodes récurrents des symptômes respiratoires tels que le sifflement expiratoire, l'essoufflement, l'oppression thoracique, et/ou la toux, variables en intensité, et par une limitation expiratoire variable qui peut devenir persistante aux stades plus avancés de la maladie. Ils peuvent être déclenchés par de l'exercice, certains allergènes, des substances irritantes, un changement de temps, ou des infections virales. Ils sont généralement réversibles au traitement ou spontanément [16].

IV.2. Le cancer

L'inflammation représente un avantage pour la tumeur puisqu'une part importante du processus inflammatoire est dédiée à la reconstruction du tissu ce qui sollicite des mécanismes intervenant aussi dans la tumorigenèse. L'inflammation tumorale est induite par des facteurs inflammatoires sécrétés par les cellules tumorales. La prolifération et la survie qui sont déjà suractivées dans les cellules cancéreuses, sont stimulées par l'inflammation. L'angiogenèse, qui est absolument nécessaire pour la croissance de la tumeur, est induite par l'inflammation. En dégradant la matrice extracellulaire, les macrophages favorisent l'infiltration des cellules cancéreuses dans le tissu sain, ce qui peut favoriser la progression de l'oncogenèse vers un stade invasif [17].

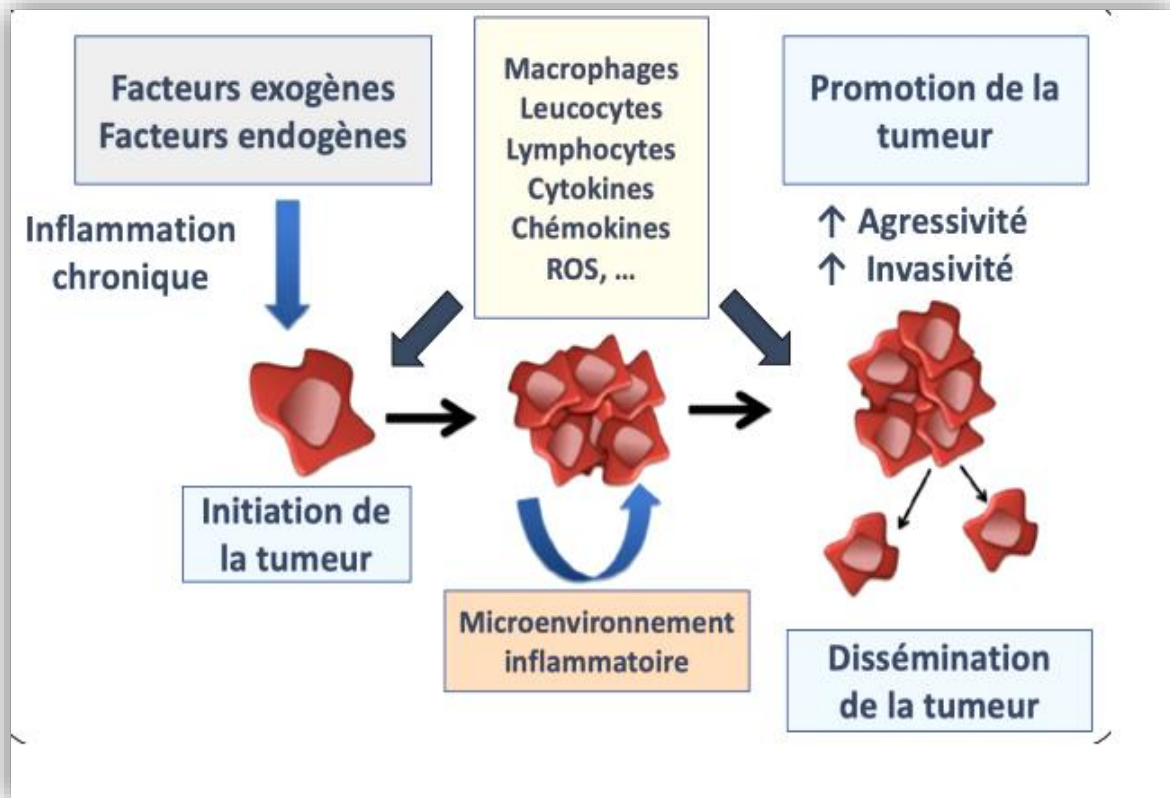


Figure I.3. Causes et conséquences du microenvironnement tumoral inflammatoire [18].

IV.3. Alzheimer

L'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable à ce jour du tissu cérébral qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales et notamment de la mémoire. C'est la cause la plus fréquente de démence chez l'être humain [19]. L'inflammation au cours de la maladie d'Alzheimer présente un caractère particulier puisqu'elle se situe au sein du système nerveux central et n'implique que très peu les lymphocytes et les monocytes. Ainsi, les études immunologiques dans la maladie d'Alzheimer se sont concentrées sur les réponses humorales [20].

IV.4. La fièvre

Une des premières réponses adaptées de l'organisme est la fièvre. Elle est un des signes majeurs de l'inflammation systémique. La fièvre participe à la lutte contre l'infection notamment car elle stimule la prolifération des cellules de l'immunité tout en inhibant la prolifération de nombreux organismes pathogènes [21]. Une inflammation peut se manifester

de différentes manières. Elle peut être généralisée et se traduire par une altération de l'état général avec de la fièvre et de la fatigue, ou être locale.

IV.5. Le rhumatisme

Le rhumatisme inflammatoire est une maladie chronique qui provoque des douleurs articulaires et qui est le plus souvent héréditaire. Ils se caractérisent par des douleurs articulaires inflammatoires [22].

V. Traitement par les anti-inflammatoires

Les anti-inflammatoires sont des médicaments qui peuvent réduire la douleur, l'inflammation et dans certaines cas la fièvre. La thérapeutique anti-inflammatoire est généralement menée par des molécules de synthèse, Ils sont utilisés quand les processus de la réaction inflammatoire sont exagérés par trapper à la cause initiale [23]. Ces médicaments peuvent être divisés en deux groupes : les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) [24].

V.1. Anti-inflammatoires stéroïdiens

Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes de synthèse permettent d'obtenir une meilleure activité anti-inflammatoire et la dissociation entre les effets anti-inflammatoires et les effets physiologiques cortisoliques. Ils sont utilisés depuis plusieurs dizaines d'années dans la prise en charge de nombreuses pathologies présentant une composante inflammatoire [25].

Ces médicaments augmentent la production de la lipocortine (protéine anti-inflammatoire) inhibant ainsi la phospholipase A2 donc la libération de l'acide arachidonique. Par contre, ils diminuent fortement la migration des polynucléaires, monocytes-macrophages vers le site de l'inflammation et la production d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, les cytokines, les ions superoxydes. Parmi les anti-inflammatoires stéroïdiens les plus puissants, on cite les glucocorticoïdes, les corticoïdes naturels (cortisol) et les corticoïdes de synthèse (Prednisone, Prednisolone, Triamcilone et Dexamétasone) [26, 27].

V.2. Anti-inflammatoires non stéroïdiens

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) constituent une classe thérapeutique très utilisée depuis plusieurs décennies [28], en raison de leur activité antipyrétique, antalgique et anti-inflammatoire. Ils sont utilisés dans de nombreuses indications comme dans les douleurs

ostéomusculaires, les affections rhumatologiques, en traumatologie, dans les coliques néphrétiques, etc. Historiquement, les AINS constituaient un groupe hétérogène de substances qui permettaient de réduire ou de supprimer les conséquences de la réaction inflammatoire, sans préjuger de l'étiologie, ni du mécanisme de celle-ci [29].

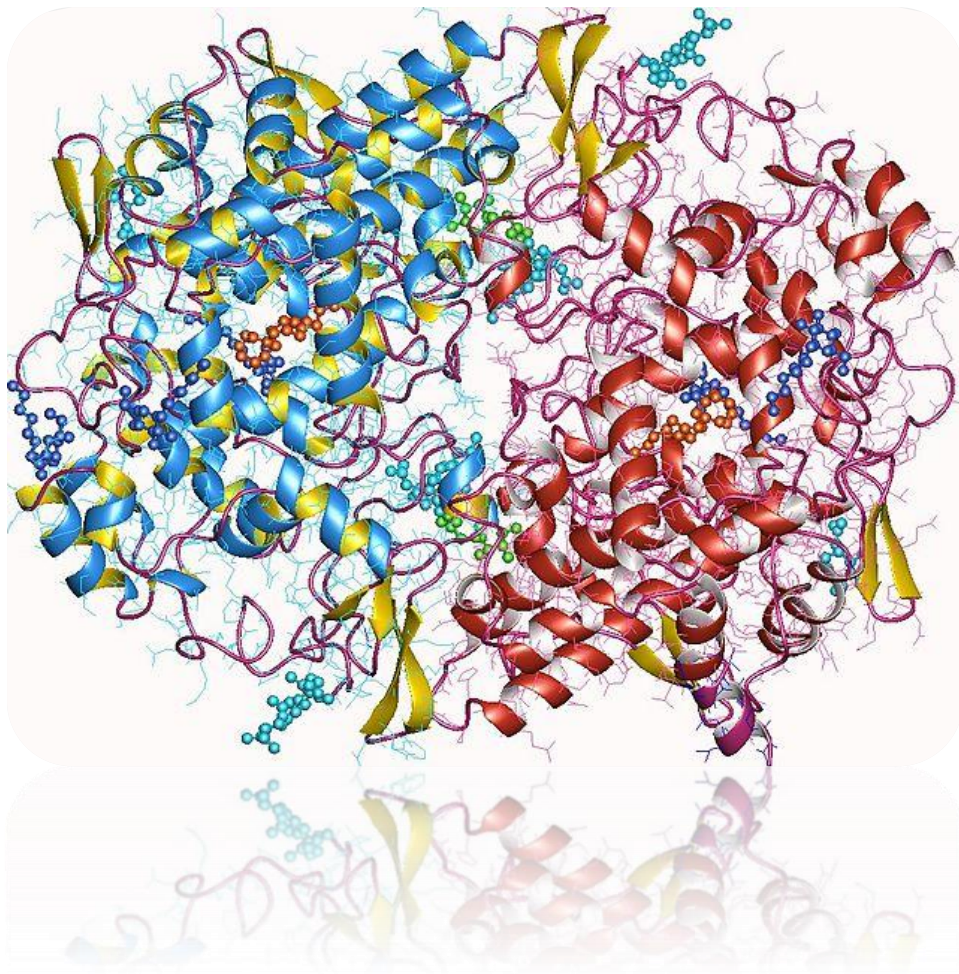
Le mécanisme d'action des AINS le plus communément admis, est celui découvert par John R. Vane en 1970 [30]. Il s'agit de l'inhibition des cyclo-oxygénases (COX), ce qui implique un blocage de la synthèse des prostaglandines et du thromboxane A₂ à partir de l'acide arachidonique. Cet effet anti-prostaglandines explique l'action anti-inflammatoire, antalgique et antipyrétique des AINS aux doses usuelles, ainsi que leurs effets indésirables aux doses thérapeutiques [31, 32].

La diminution de la synthèse des prostaglandines par les AINS est consécutive à l'inhibition plus ou moins sélective des iso enzymes de la COX [33]. Plusieurs classifications ont été proposées, basées soit sur la structure des AINS, soit encore sur leurs modalités d'action et/ou leur sélectivité anti-COX [34].

- Les inhibiteurs de la p38 MAP kinase
- Les inhibiteurs de la Lipo-oxygénases
- Les inhibiteurs de La cyclooxygénase-1(COX-1)
- Les inhibiteurs de La cyclooxygénase-2 (COX-2)

Ces molécules offrent des avantages significatifs par rapport aux autres classes d'AINS. Ceci explique notre choix pour cette classe de médicaments anti-inflammatoires. Le but de notre travail est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la COX-2 en faisant appel au docking moléculaire.

CHAPITRE II. LA CYCLOOXYGENASE



CHAPITRE II : LA CYCLOOXYGÉNASE

I. Définition de la cyclooxygénase

La cyclooxygénase (COX) également appelées prostaglandines H synthases ou prostaglandines endoperoxyde synthase (E.C.1.14.99.1) est une glycoprotéine membranaire intégrale, appartient à la famille des myéloperoxydases [35], capable de convertir l'acide arachidonique (AA), qui sert de substrat aux isomérases spécifiques à la prostaglandine H₂, responsable de nombreuses fonctions physiologiques, notamment au niveau musculaire [36, 37].

La COX a été identifiée en 1971 comme étant la cible moléculaire d'une classe thérapeutique, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) [38]. Par la suite, elle a été purifiée et isolée en 1976 [39]. Les COX sont des protéines globulaires d'environ 600 acides aminés. Ils ont une masse moléculaire de 67 à 72 kDa, ont une séquence d'acides aminés égale à 65 % et ont des sites actifs presque identiques. Ils se combinent pour former deux dimères. Avec une région hydrophobe, ils flottent sur à l'intérieur des membranes microsomales du réticulum endoplasmique. Cette région de liaison à la membrane forme une ouverture étroite, également hydrophobe, dans un canal se terminant en aveugle vers le site actif ayant une activité cyclooxygénase [40].

II. Rôle de la cyclooxygénase

Les COX sont des enzymes bi-fonctionnelles capables de convertir dans un premier temps l'AA en endoperoxyde cyclique par sa fonction cyclooxygénase (ou bis-dioxygénase) puis de former à partir de ce produit de la prostaglandine H₂ (PGH₂) par la fonction peroxydase de l'enzyme (figure II.1). Puis des isomérases présentes en fonction du type cellulaire permettent la synthèse de prostanoïdes, c'est à dire une classe d'eicosanoïdes comprenant les prostaglandines, les thromboxanes et les prostacyclines. Les prostaglandines sont des molécules impliquées dans la fièvre (PGE₂), la douleur, l'inflammation, la régulation de la pression artérielle, l'agrégation plaquettaire (PGI₂) et jouent aussi un rôle dans la vasodilatation (PGD₂, PGE₂, PGI₂), la protection de la muqueuse gastrique (PGI₂), la coagulation sanguine (par exemple, l'action anticoagulante de la PGI₂). Cependant, les cyclo-oxygénases sont l'étape déterminante de la vitesse de formation des prostaglandines et occupent donc une position centrale dans la régulation du processus inflammatoire [41, 42].

III. Classification

Au début des années 1990, deux isoformes de cette enzyme ont été identifiées : la cyclooxygénase 1 et la cyclooxygénase 2 (figure II.1) [43].

La cyclooxygénase de type 1 (COX-1) est une isoforme constitutionnelle ayant un rôle physiologique majeur. Est exprimée de manière constitutive dans l'organisme c'est-à-dire de façon permanente. Son inhibition conduit généralement à des événements tels que des dérégulations rénales et des dysfonctionnements de la fonction ulcéro-gastrique.

La cyclooxygénase de type 2 (COX-2) est une isoforme inductible associée à l'apparition de phénomènes inflammatoires exprimé par l'action d'agents inducteurs. Cette forme de cyclooxygénase est responsable de la production élevée en prostaglandine lors du processus inflammatoire et qui possède un rôle physiopathologique. Ces métabolites sont à l'origine des processus inflammatoires [44, 45].

Des études ont également montré l'existence d'une troisième isoforme, la COX-3. Cependant, il semble incapable de produire des prostaglandines actives dans les tissus humains.

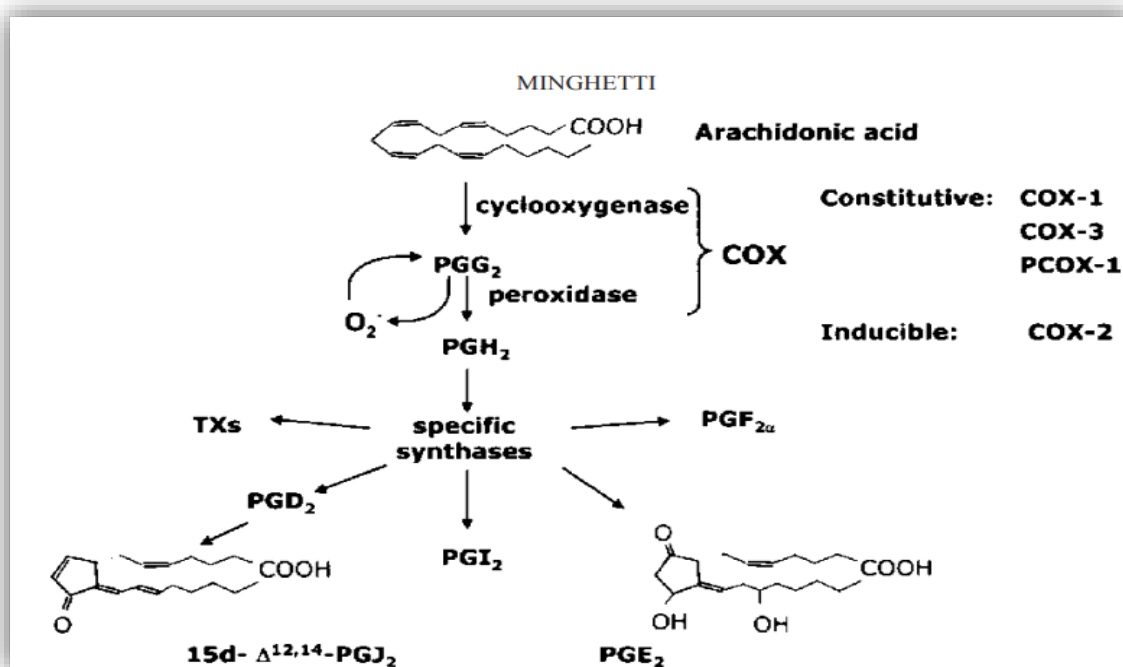


Figure II.1. Voie de la cyclooxygénase [46].

• Acide arachidonique

L'acide arachidonique (AA) est un acide gras polyinsaturé à longue chaîne, de la famille des oméga-6. Il est distribué à travers la couche bilipidique de la membrane cytoplasmique des cellules et est normalement estérifié à la position SN-2 des phospholipides [47]. L'AA est ensuite transformé en prostaglandines (PG) et en thromboxanes (TX) par l'enzyme prostaglandine endoperoxyde synthase, également appelée cyclo-oxygénase. Cette enzyme catalyse deux réactions enzymatiques : l'oxygénation de l'AA en PGG₂ suivie de peroxydation de PGG₂ en PGH₂ [48]. La PGH₂ est ensuite isomérisée et réduite en les principaux prostanoides biologiquement actifs : PGE₂, PGF_{2α}, prostacycline (PGI₂) ou thromboxane A₂. Il est cependant d'une grande importance en pathologies inflammatoires car il est à l'origine des hormones éicosanoïdes (figure II.2) [49].

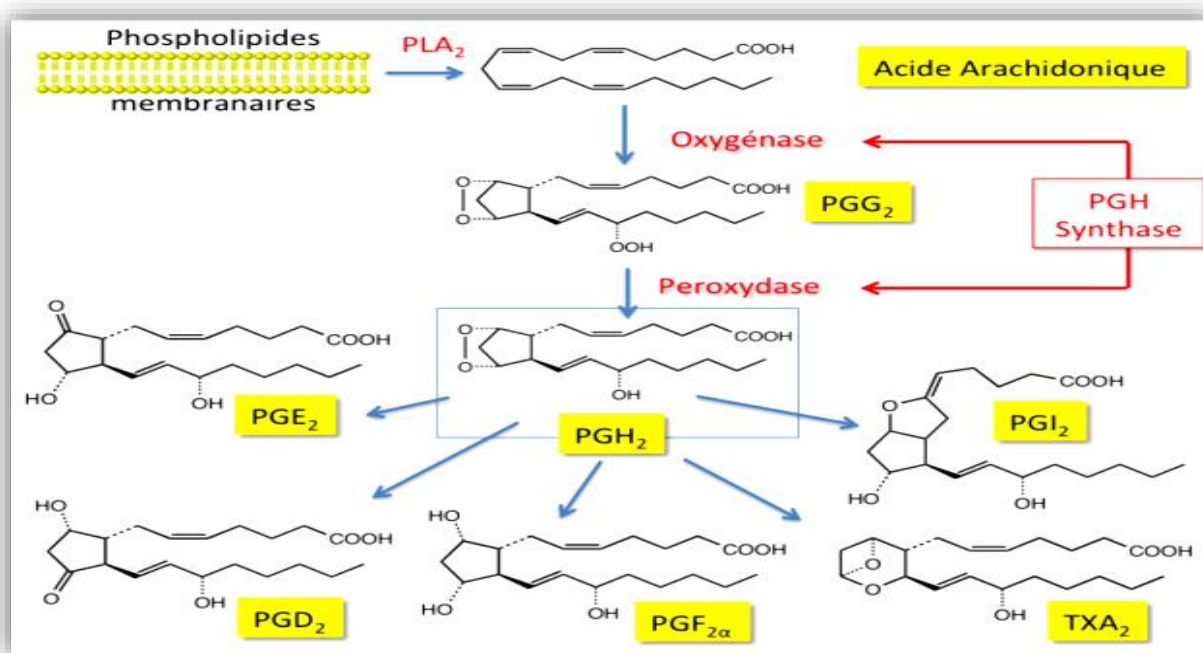


Figure II.2. Métabolisme de l'acide arachidonique par les cyclooxygénases [49].

IV. La cyclooxygénase 2

IV.1. Définition

La cyclooxygénase-2 ou COX-2 a été découverte au début des années 1990, et a été rapidement associée à des phénomènes inflammatoires pouvant affecter l'organisme. Elle a été mise en évidence après que certaines études aient montré que la quantité de protéines COX

augmentait dans les conditions inflammatoires, indiquant une forme inductible de cyclooxygénase [50].

La COX-2 humaine est constituée de 604 acides aminés de masse moléculaire (74 kDa) dont la séquence est identique à environ 60 % à celle de la COX-1. La COX-2 inductible se forme lors de l'inflammation. Il est activé par l'inflammation qui l'aggrave en produisant des prostaglandines pro-inflammatoires [51]. La COX-2 est essentiellement une enzyme inductible. Séparément, c'est un composant que l'on trouve dans certains tissus comme le cerveau et les reins. Il est physiologiquement présent dans la prostate, l'utérus, les testicules et les poumons, et se retrouve dans tous nos tissus après induction. Cependant, il joue un rôle physiologique important dans le maintien de diverses fonctions vitales [52].

IV.2. La structure

L'enzyme COX-2 possède un site actif plus grand, compatible avec la promiscuité du substrat de cette isoenzyme. Se retrouve dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans les feuillettes internes et externes de l'enveloppe nucléaire des monocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Cependant, la COX-2 préfère se localiser dans l'enveloppe nucléaire où son activité est plus importante [53].

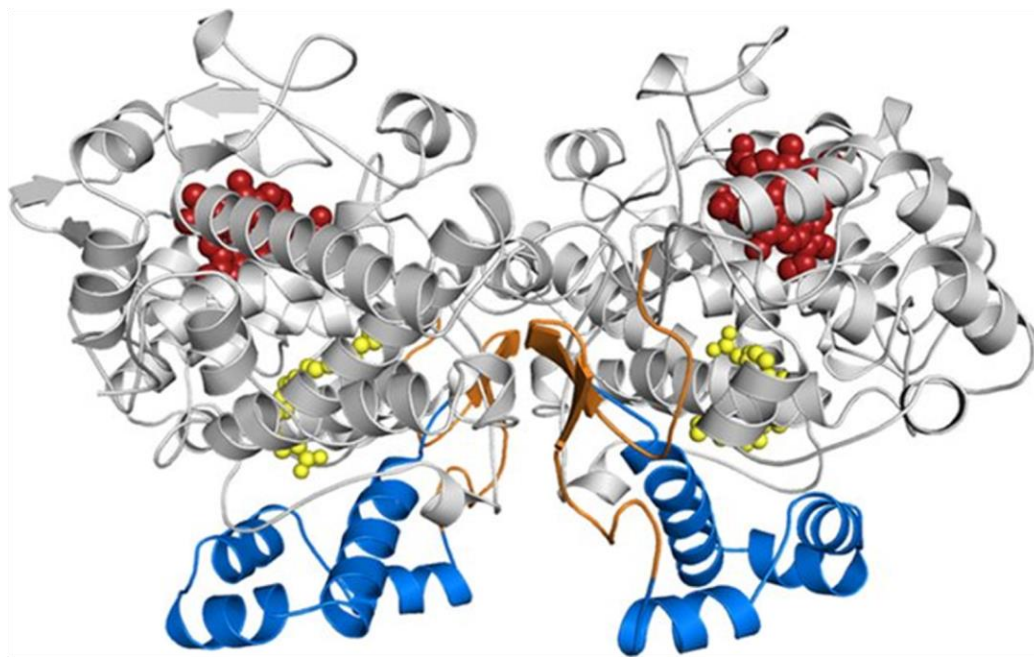


Figure II.3. Structure 3D de COX-2, code : 3HS5 [54].

IV.3. Le gène de la COX-2

Le gène de la COX-2 est situé sur le chromosome 1 (1q31.1) (figure II.4) et mesure 8,3 kb de long avec une queue de produits géniques d'ARNm d'environ 4,0 kb de long, composée de 10 exons et 9 introns [55]. Ce gène est inductible, avec un promoteur 5'UTR elle se caractérise par la présence d'une boîte TATA de liaison au régulateur transcriptionnel ainsi que plusieurs sites de liaison pour les facteurs de transcription dans sa région promotrice comme : CEBP/NFIL6, CRE, NFκB, qui expliquent la régulation complexe de l'expression de la COX-2 [56]. La protéine COX-2 active est composée de 587 acides aminés et apparaît comme un doublé (72 kDa et 74 kDa) sur un gel SDS-PAGE à cause des différences de liaison d'oligosaccharides en position N-terminale [57].

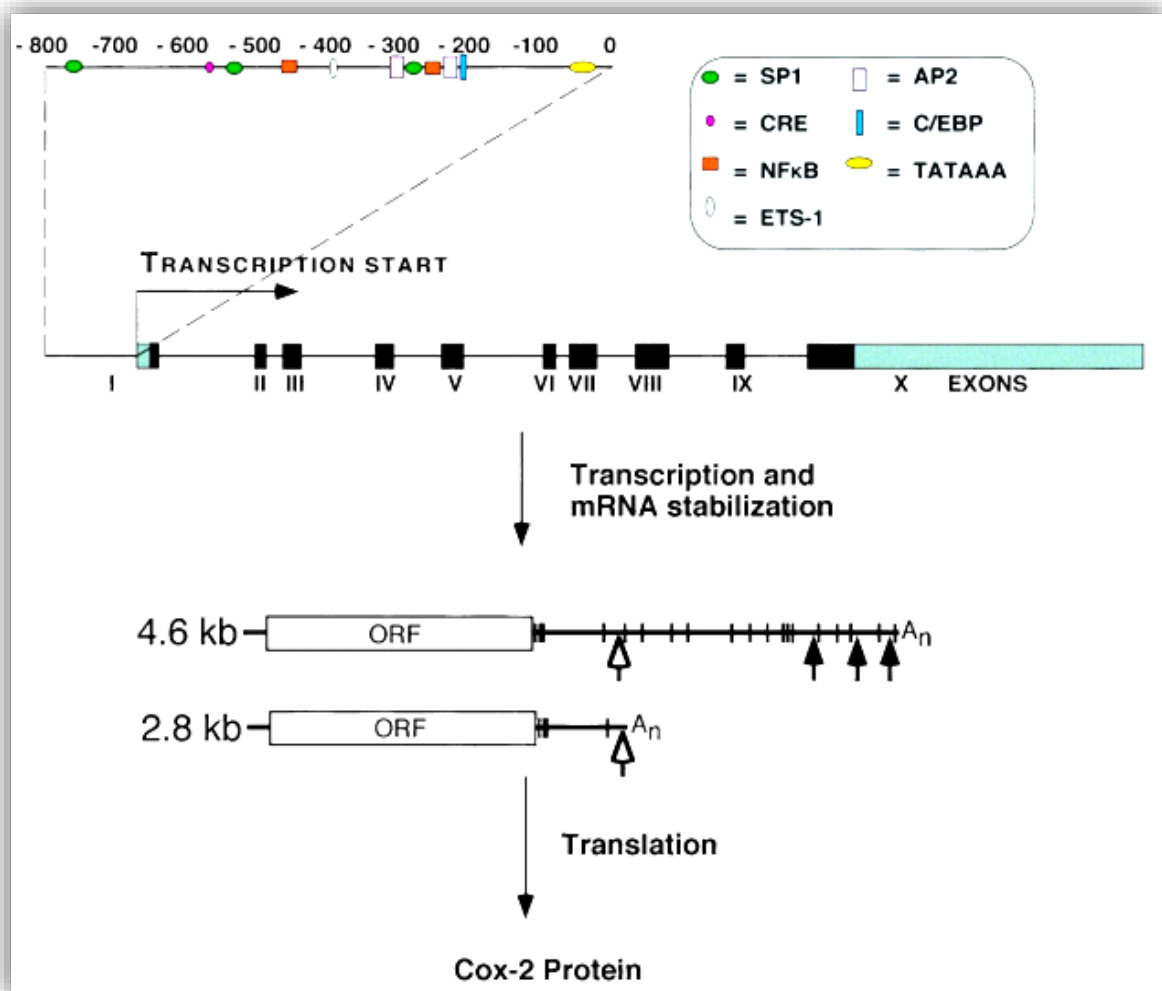


Figure II.4. Représentation schématique de la structure du gène de la COX-2 humaine et des éléments promoteurs [58].

IV.4. Site actif de COX-2 et interaction

IV.4.1. Définition

L'enzyme COX-2 contient deux sites actifs, un pour la liaison à l'oxygène et un pour la liaison au substrat. Le site a une affinité élevée pour le substrat, parce que la nature chimique des acides aminés du site et leur arrangement spatial forment une région complémentaire de certains groupements de la molécule de substrat [59]. De plus, cette enzyme est également connue pour interagir avec d'autres protéines et lipides, ce qui en fait un acteur clé dans les voies de signalisation cellulaire et indiquant son rôle important dans les processus biologiques [60].

La découverte du site actif de la COX2 a conduit au développement de plusieurs médicaments ciblant cette enzyme, comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et les inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Ces médicaments ont été utilisés pour traiter diverses affections, notamment l'arthrite, les crampes menstruelles et la douleur aiguë. Au cours des dernières années, le site actif COX2 a été étudié en profondeur en raison de son implication dans la pathogenèse de nombreuses maladies, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives [61, 62].

IV.4.2. Structure du Site Actif de la COX-2

La structure 3D de la COX-2, déterminée en 1996 par Luong et Coll., a permis de constater une grande similitude entre les deux isoformes (COX-1 et COX-2), il existe environ 60% d'homologie dans les séquences peptidiques, et représente le site de liaison de l'acide arachidonique, des substrats naturels et des AINS [63]. Il existe une très grande analogie dans les séquences d'acides aminés des deux isoenzymes, Ces enzymes, organisées en homodimères, sont globalement identiques, et présentent trois sous-domaines [64] :

- Un domaine N-terminal « Epidermal Growth Factor like » ;
- Un motif en hélice de liaison à la membrane ;
- Un domaine catalytique en C-terminal représentant environ 80% de la protéine.

Le site actif des deux isoformes de la COX présente quelques spécificités essentielles : la différence de trois acides aminés (Arg120, Tyr355 et Glu524) rend le site actif de la COX-2 plus grand et plus accessible. Ainsi, celui-ci comprend une poche de liaison au substrat supplémentaire du fait. Ces différences entre les sites actifs des deux isoformes de la COX sont

à l'origine des mécanismes d'action distincts entre les AINS traditionnels et ceux qui sont spécifiques de la COX-2 [65].

IV.4.3. Les acides aminés du Site Actif de COX-2

Le site actif COX-2 est composé de plusieurs résidus d'acides aminés qui jouent un rôle clé dans la catalyse de la réaction enzymatique. Les aminoacides essentiels à la fixation du substrat (Arg120) ou à la réaction d'oxygénation (Tyr385) sont également retrouvés dans la COX-2 (figure II.5). Toutefois, des remplacements ponctuels de certains résidus vont entraîner des modifications d'ordre stérique au niveau du site enzymatique [66]. De plus, il existe deux acides aminés essentiels à l'activité de cyclooxygénation sur l'acide arachidonique [67, 68].

- **Tyr385** : situé au sommet du canal, il initie la réaction enzymatique et sert de passerelle vers le site de peroxidation, il est le principal intervenant de la réaction d'oxydation.
- **Arg120** : son groupement guanidine intervient dans une liaison électrostatique avec la fonction acide de l'AA (ou de certains inhibiteurs de type anti-inflammatoires non stéroïdiens) en entrée de tunnel et assure la bonne position du ligand, cet acide aminé étant le plus important pour l'activité de COX et le docking des AINS

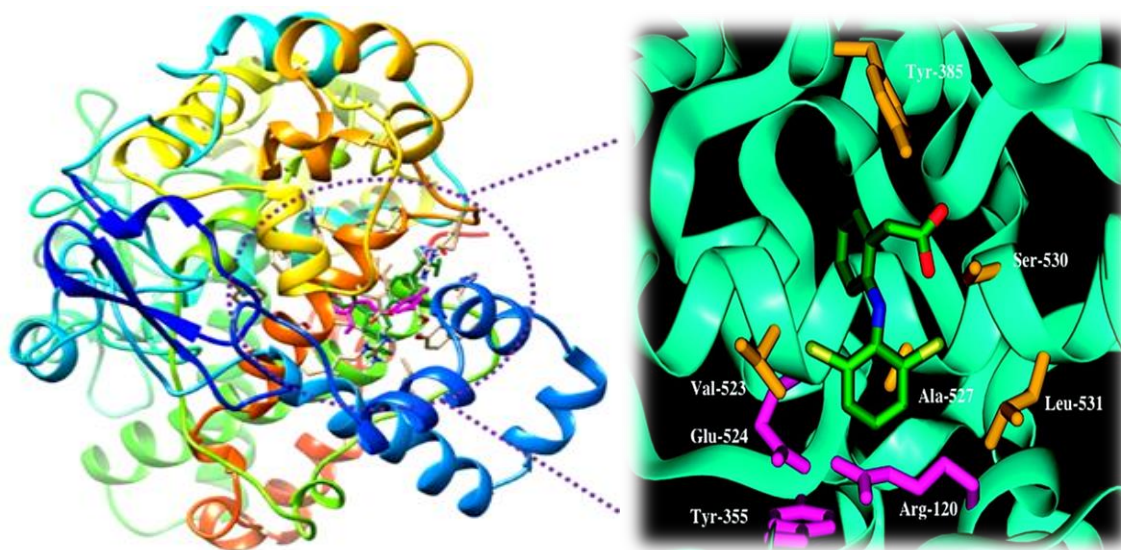


Figure II.5. Sites actifs Structure 3D de la COX-2 avec les acides aminés essentiels du actif de la COX-2 [69, 70].

V. Inhibiteurs de cyclooxygénases-2

Les inhibiteurs de la COX-2 peuvent être séparés en deux catégories [71] :

- Les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques (en vert) qui sont capables d'inhiber l'activité de COX-1 et de COX-2 (figure II.6) ;
- Les inhibiteurs spécifiques de COX-2 (en bleu), qui n'inhibent que l'activité de COX-2 qui inhibent spécifiquement l'activité de la COX-2 (figure II.7) ;

Le nimésulide et le méloxicam, qui inhibent préférentiellement la COX-2 (en gris) en raison de leur capacité à inhiber COX-1 mais que pour les plus fortes posologies recommandées (figure II.7).

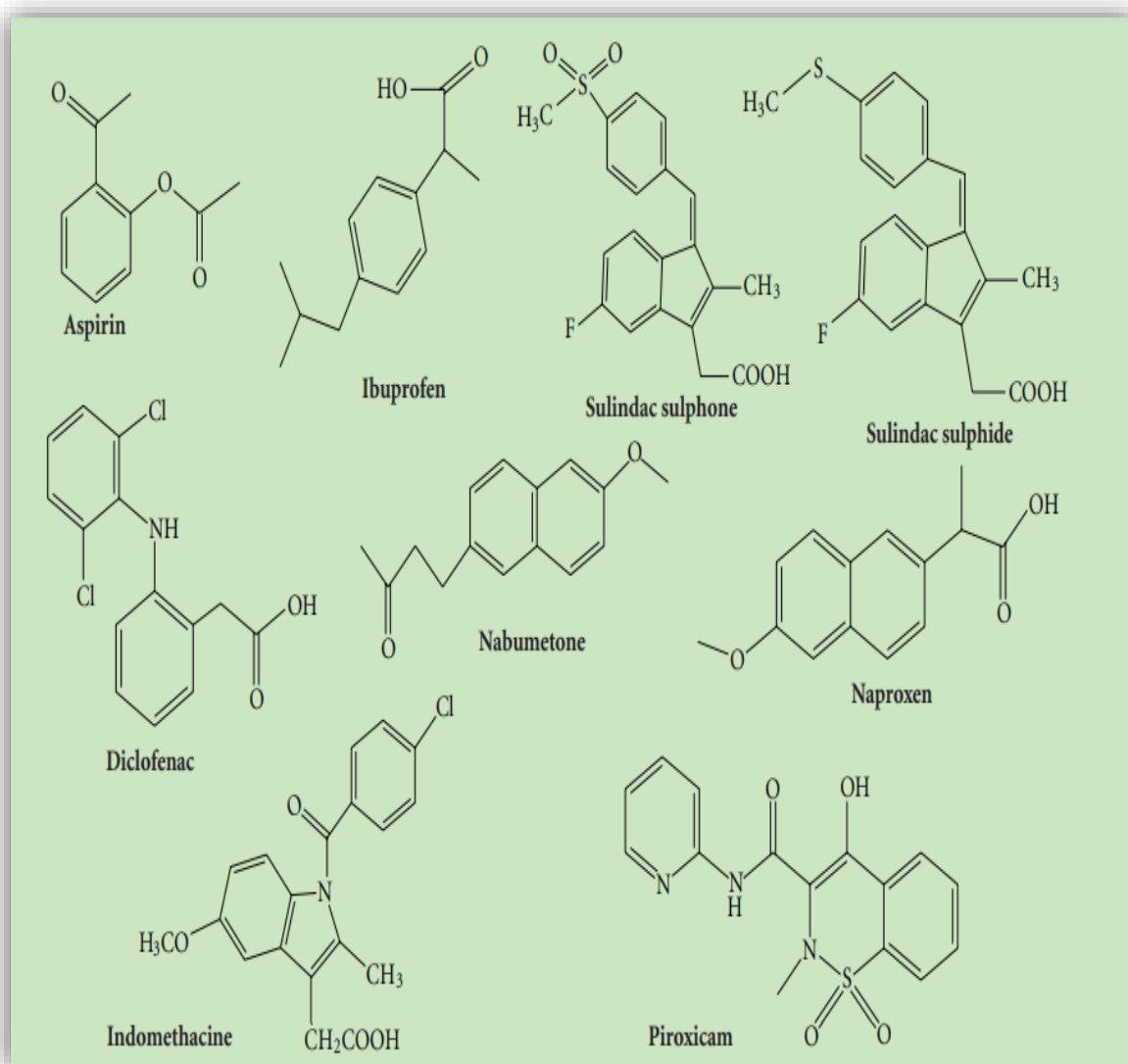


Figure II.6. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques [72].

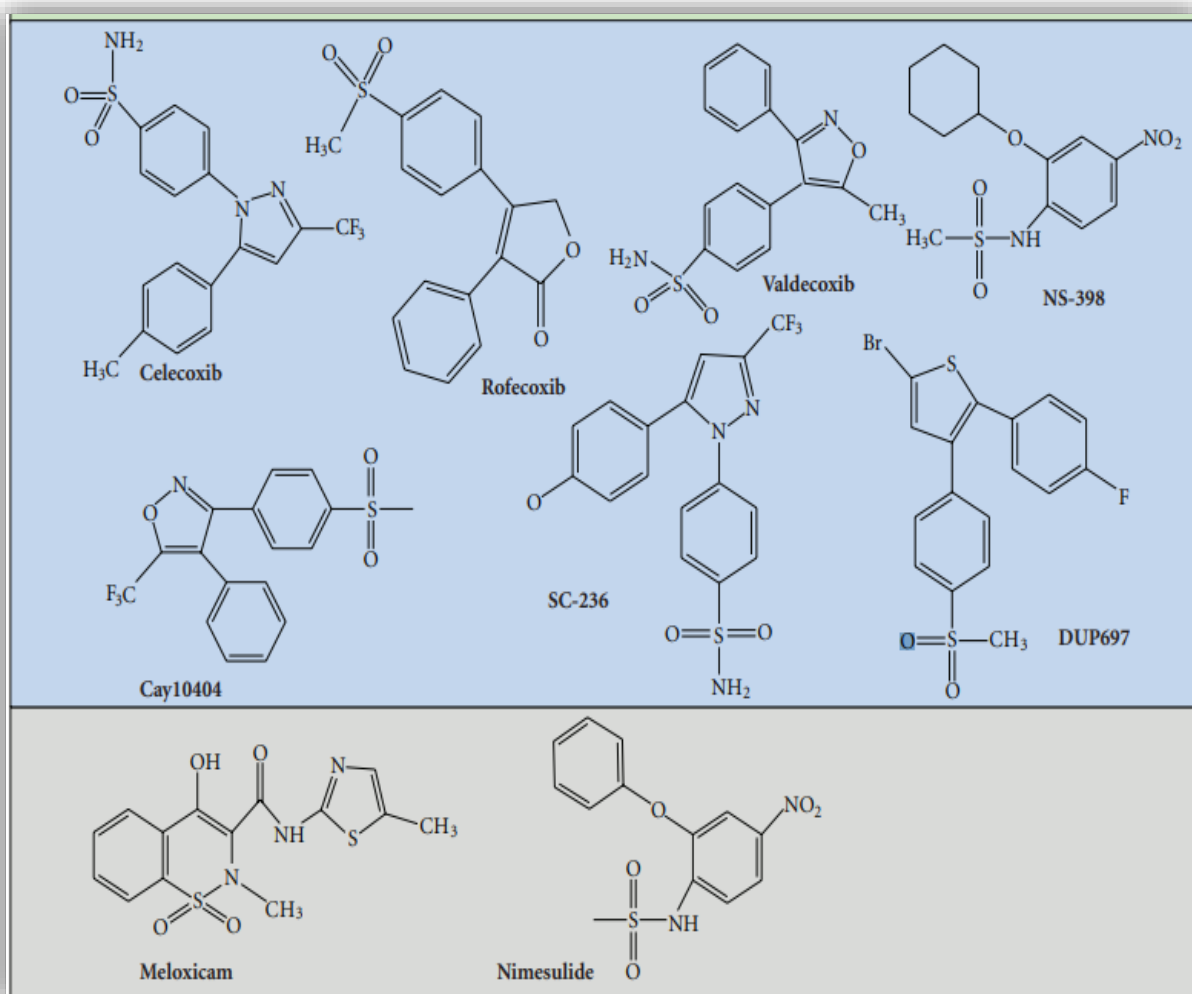


Figure II.7. Quelques inhibiteurs spécifiques de la COX-2 [73].

V.1. Les inhibiteurs non sélectifs

Les COX sont inhibés par les AINS. Les AINS non sélectifs bloquent l'entrée du site actif de la COX en se liant via le groupe carboxyle (formant une liaison ionique) au résidu arginine en position 120 (Arg-120) situé à l'entrée du site actif. On peut classer les AINS en fonction de leurs interactions avec l'enzyme [74] :

- **Inhibiteurs irréversibles de COX-1 et 2** : Le premier AINS découvert est un dérivé acétylé du salylate, l'aspirine qui inhibe irréversiblement les deux isoformes de COX par acétylation, ce qui empêche l'AA de se loger dans la cavité de cyclooxygénation.
- **Inhibiteurs compétitifs réversibles COX-1 et 2** : c'est le cas des oxicames et de la majorité des profènes.

- **Inhibiteurs réversibles dépendant du temps** : c'est le cas entre autres de l'indométhacine et du flurbiprofène, qui par l'interaction avec 120Arg se logent dans le site catalytique et bloquent la configuration de l'enzyme.

Cependant, ces inhibiteurs non sélectifs provoquent des lésions gastriques et également des problèmes rénaux dus à l'inhibition de la production basale de PG relayée par la COX-1. Tous ces effets secondaires découlent d'une altération de la fonction physiologique normale de la cyclooxygénase. La recherche pharmaceutique s'est donc naturellement orientée vers la conception d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 [75].

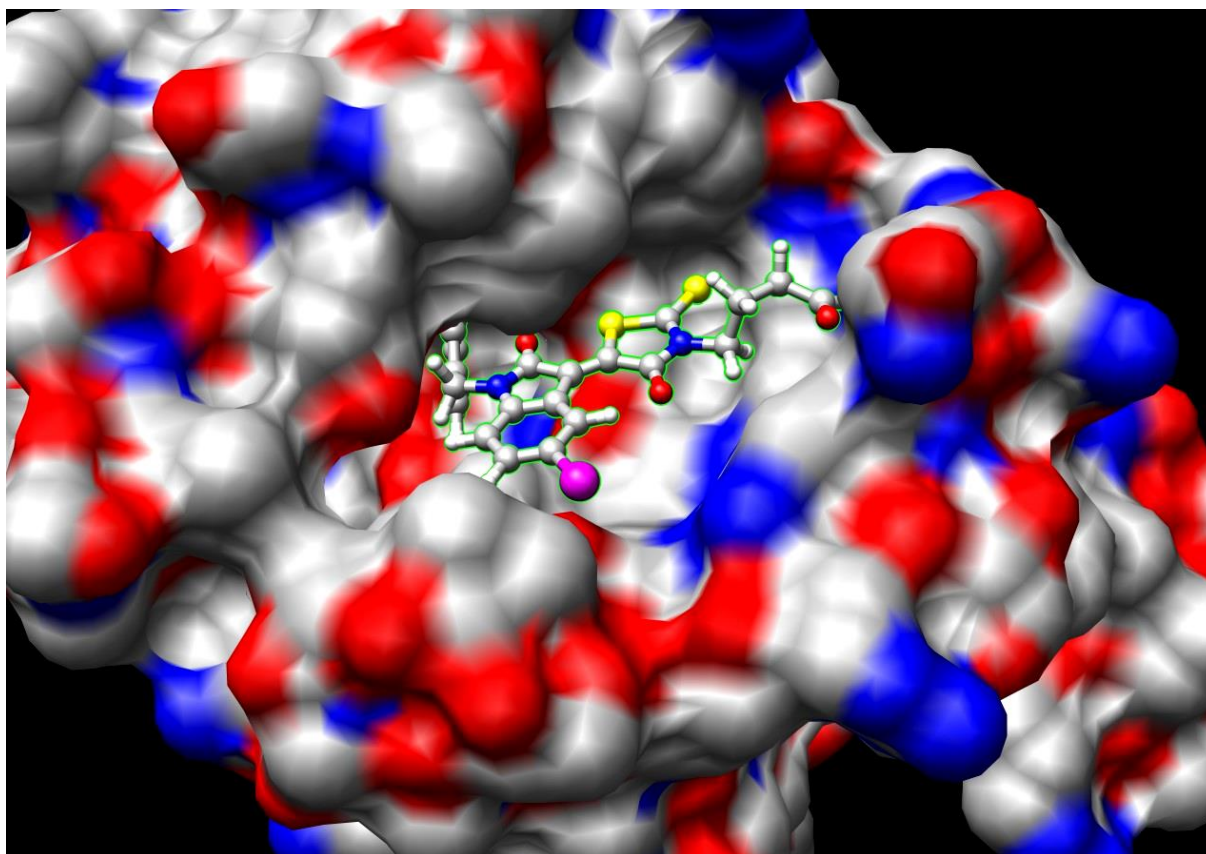
V.2. Les inhibiteurs sélectifs

C'est dans le but de réduire ces effets secondaires que des molécules inhibant spécifiquement la COX-2 ont été mises au point en tant qu'agents antidouleurs, antipyrétiques ou anti-inflammatoires liés à l'augmentation de l'expression de la COX-2. L'utilisation d'une molécule de première génération, le méloxicam, un inhibiteur sélectif de COX-2, montre que les troubles gastriques sont significativement moins importants que ceux provoqués par des inhibiteurs non sélectifs. Des produits plus spécifiques comme le NS-398 ou encore le SC-58125 ont été développés. Comme le méloxicam, les tests cliniques montrent des effets secondaires réduits. Deux molécules, le viox et le celebrex (dérivé du SC-58125) ont été récemment commercialisés dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde [76].

VI. Rôles biologiques de la COX-2

La forme inductible de la COX est la principale responsable de la formation de PGs lors de l'inflammation. Les LPS et les cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 α et l'IL-1 β permettent l'induction de la COX-2, qui synthétise alors des PGs pro-inflammatoires. L'IL-1 α induit l'expression de la cPLA et mobilise l'acide arachidonique, le substrat de la COX-2. En plus d'être la responsable de la synthèse de PGs associées à la douleur et à la fièvre, la COX-2 est aussi impliquée dans le développement du système cardiovasculaire, l'arthrite rhumatoïde, la reproduction chez la femelle (ovulation, implantation utérine et invasion du blastocyte), la maladie d'Alzheimer, certaines fonctions immunologiques, la régulation de la croissance cellulaire, l'angiogenèse, l'apoptose et la prolifération et la croissance des cellules normales et cancéreuses [77].

CHAPITRE III. LE DOCKING MOLECULAIRE



CHAPITRE III : LE DOCKING MOLECULAIRE

I. Introduction à la modélisation moléculaire

La recherche traditionnelle pour le développement des nouveaux médicaments nécessite un environnement de recherche spéciale. Au lieu de passer des jours, des mois, ou même des années dans un laboratoire à tester certaines molécules dans le but de savoir si elles ont un effet thérapeutique bénéfique ou pas, en plus de ça c'est coûteux, la recherche et la synthèse de nouveaux composés chimiques et biochimiques sont aujourd'hui souvent associées à une étude par modélisation moléculaire [78].

Le terme de modélisation moléculaire est assez général et, sous cette étiquette, on trouve un certain nombre de techniques : mécanique moléculaire, chimie quantique, simulation de dynamique moléculaire, construction par homologie, criblage virtuel, docking moléculaire..etc. Ces méthodes théoriques et/ou empiriques appartiennent toutes à la famille des techniques informatiques qui sous l'ombre du calcul tendent à résoudre des problèmes qui impliquent la structure moléculaire et la réactivité chimique. Ces méthodes peuvent être relativement simples et rapide ou au contraire, extrêmement complexes et lentes [79].

Depuis ces dernières décennies, la modélisation moléculaire connaît un intérêt tout particulier dans l'ère de la prédiction grâce à son large champ d'applications possibles. Elle peut, en particulier, s'avérer précieuse lors de la mise au point de nouvelles molécules. Dans notre cas d'intérêt thérapeutique (médicamenteux) [80].

La modélisation moléculaire à intérêt thérapeutique a deux applications classiques :

- **Le développement de nouveaux médicaments :** le mécanisme d'action de nombreux médicaments consiste à agir une inhibition d'une enzyme (récepteur) impliquée dans le développement de la maladie par un ligand (inhibiteur), que ce soit une protéine d'un organisme pathogène ou du propre organisme humain. L'élucidation de la structure tridimensionnelle des protéines impliquées dans plusieurs pathologies a permis, via des simulations informatiques, la découverte d'inhibiteurs puissants pour ces pathologies, en réduisant considérablement le nombre d'essais expérimentales (screening) nécessaires pour aboutir à un nouveau médicament.
- **La rationalisation de l'énergie enzymatique :** le fondement est le même que celui du développement du médicament, en permettant d'étudier les interactions entre les substrats (ligand) et les enzymes (récepteurs), la modélisation moléculaire apporte une meilleure

compréhension de la sélectivité enzymatique, au niveau moléculaire. Ce qui peut rendre possible, par la suite, le développement d'approches prédictives pour la sélectivité des enzymes natives vis-à-vis d'un substrat ou d'une classe de substrats donnée [81]

L'intérêt pour nous dans ce chapitre est d'illustrer une des méthodes de modélisation : le docking moléculaire. En portant l'accent sur ses acteurs et outils dominants et son processus d'action [82].

II. Définition de docking moléculaire

Le docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français), est une approche numérique de modélisation moléculaire qui rend possible l'identification des interactions qui existent dans l'entité constituée à partir d'une protéine et d'un ligand. Il vise à prédire le positionnement le plus probable en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable [83]. Le docking permet de déterminer les modes de liaison ou les conformations possibles d'un ligand à un récepteur et de calculer l'énergie de liaison ou l'énergie du complexe permettant de donner une estimation sur l'affinité de liaison entre deux molécules, ceci a pour but de déterminer quel ligand candidat interagira le mieux avec une protéine cible donnée [84]. Cette méthode permet soit de découvrir de nouvelles molécules, soit de comprendre la nature d'un complexe de molécules obtenu par cristallographie [78].

L'amarrage moléculaire est l'un des méthodes dans le domaine de la modélisation qui permettent de [85] :

- Représenter et de visualiser la forme des molécules dans l'espace ;
- Simuler leurs mouvements et leurs comportements ;
- Prédire la structure tridimensionnelle (3D) de ces protéines en se basant sur la structure 3D déjà connue de protéines similaires ;
- Prédire l'effet d'un changement de un/ou plusieurs acide(s) aminé(s) sur la structure 3D d'une protéine ;
- Il est ainsi possible de prédire l'effet d'une mutation sur l'activité d'une protéine et/ou sur sa capacité à interagir avec un médicament.

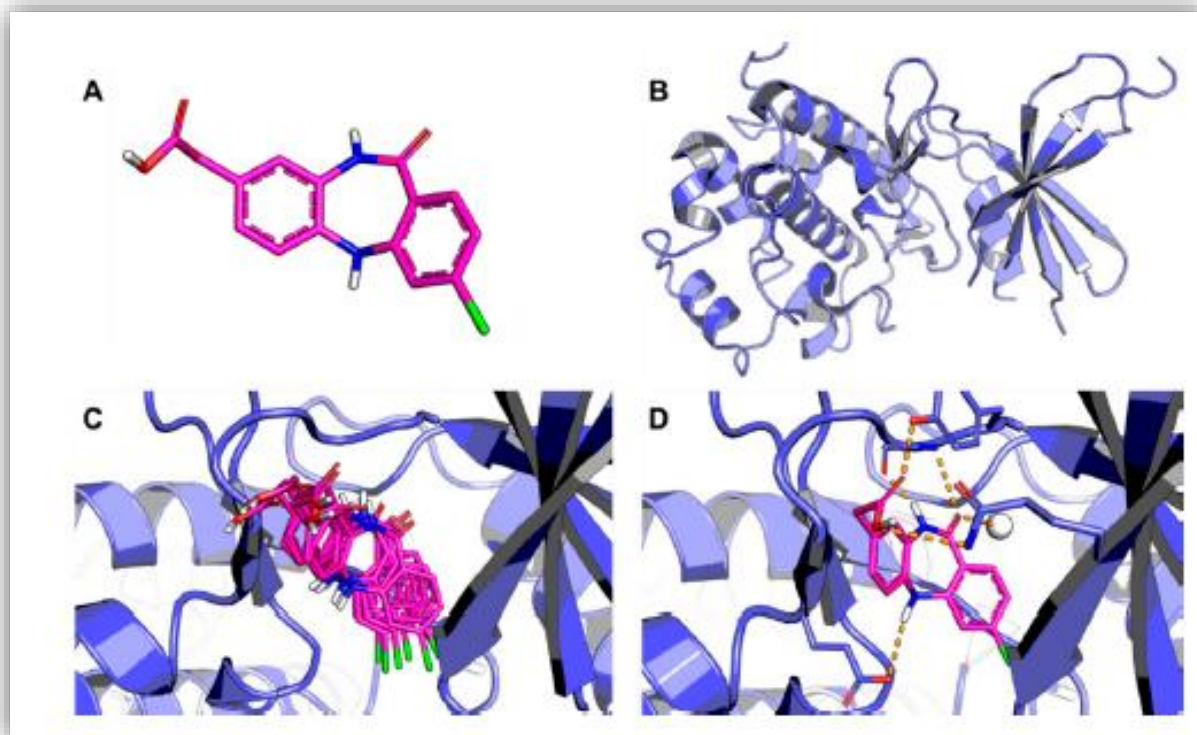


Figure III.1. Aperçu du processus d'amarrage moléculaire.

(A) Structure 3D du ligand ; (B) Structure 3D du récepteur ; (C) Le ligand est ancré dans la cavité de liaison du récepteur et les conformations putatives sont explorées ; (D) La conformation de liaison la plus probable et les interactions intermoléculaires correspondantes sont identifiées. Le ligand (carbone en magenta) et les résidus de site actif (carbone en bleu) sont représentés en bâton. L'eau est représentée par une sphère blanche et les liaisons hydrogène sont indiquées par des lignes pointillées [86].

III. Principe de docking moléculaire

Le docking décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace 3D. Deux aspects sont importants : la prédiction de l'affinité du complexe (protéine-ligand), et la prédiction de la position correcte du ligand dans le site actif de la protéine. La prédiction d'affinité est liée à différents ligands de la collection, certains conviennent mieux que d'autres. La prédiction de position est liée à la même molécule de ligand mais dans des orientations différentes [87, 88]. Un programme de docking doit être capable de générer les modes de liaison attendus pour des ligands dont la position adoptée au sein du site actif est connue dans un temps raisonnable [89]. Pour cela une simulation de docking moléculaire s'accomplit en deux étapes complémentaires (figure III.2).

III.1. La première étape (le docking)

Est une étape de sélection consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, entretenant que celles qui représentent les modes d'interaction les plus favorables [90].

III.2. La deuxième étape (le scoring)

Est une étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine dans chacun des complexes sélectionnés lors de l'étape précédente. Cette tâche est accomplie par des outils informatiques nommées fonction de score. Celles-ci évaluent d'abord les différentes contributions énergétiques (et parfois entropiques) pour la stabilisation du complexes, permettant ainsi l'identification des modes d'interaction les plus probables. Ce score permet de retenir la meilleure conformation [90].

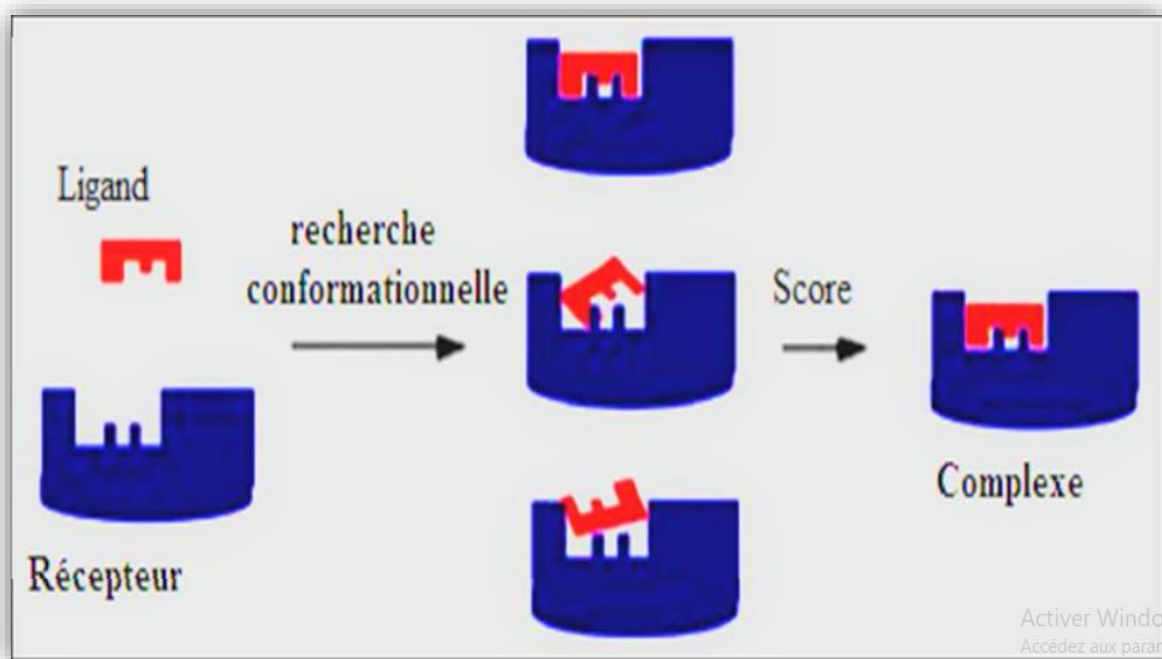


Figure III.2. Représentation schématique des étapes Du docking moléculaire [91].

IV. Les types de docking

On peut distinguer trois types de docking moléculaire [92, 93] :

- **Docking rigide** : considérant que chacune des deux molécules conserve une géométrie interne fixe, où les molécules sont représentées comme des objets rigides qu'ils ne peuvent changer leurs formes spatiales durant le processus du docking.
- **Docking semi-flexible** : Les partenaires d'interaction sont partiellement déformables. En général, le récepteur est traité comme étant rigide et le ligand comme étant totalement flexible, se sont imposés, car elles permettent d'obtenir des résultats plus précis.
- **Docking flexible** : où les deux molécules sont considérées comme flexibles.

V. Les outils du docking moléculaire

Les éléments essentiels pour pratiquer l'amarrage moléculaires ont réduits à un récepteur macromoléculaire protéique appelé la cible, une petite molécule appelée le ligand et un programme d'amarrage qui prédit la conformation la plus favorable du ligand au sein du Récepteur sélectionné.

V.1. Récepteur

En biologie, le récepteur est une protéine, généralement située à la surface des cellules, capable de fixer une molécule informative (médiators chimiques, neurotransmetteurs, hormones...) et de convertir ce message extracellulaire en signal intracellulaire, entraînant une réponse de la part de la cellule. De ce fait, un récepteur est une protéine spécialisée capable de se lier spécifiquement et réversiblement à une autre molécule appelée ligand [94].

V.2. . Ligand

Ligand est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal [95]. Il peut être [96] :

- **Substrat** : est une molécule qui subit l'action d'une enzyme lorsqu'elle s'attache au site actif.
- **Coenzyme** : molécule organique essentielle pour que certaines enzymes catalysent une réaction.
- **Activateur** : substance nécessaire ou favorable à l'activité d'une enzyme.

- **Inhibiteur** : est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue leur activité. Un inhibiteur peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif.

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules [96]. Pour faire un docking la structure du ligand doit être en 3D, il existe deux méthodes pour recevoir un ligand [97] :

- ❖ **La première**: consiste à utiliser des ligands de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....) grâce à des logiciels de construction moléculaires tels que Arguslab et Titan.
- ❖ **La deuxième** : consiste à utiliser des ligands de la PDB ou des collections de molécules virtuelles aussi bien commerciales qui proviennent de bases de données des structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimique tel que ZINC et PubChem.

La liaison d'un ligand à une protéine réceptrice modifie souvent la conformation de cette dernière, c'est-à-dire sa structure en 3D. L'énergie associée aux interactions intermoléculaires formées entre la protéine et son ligand permet de promouvoir ce changement de conformation, appelé ajustement induit. Cette modification structurale peut ainsi moduler éventuellement son état fonctionnel et son activité [98].

VI. Les interactions intermoléculaires

Les interactions entre une protéine et un ligand sont en général de nature non covalente et génèrent une énergie appelée énergie libre de Gibbs. Les associations sont dues aux propriétés chimiques, électroniques, et géométriques des molécules. A l'inverse des liaisons covalentes, les liaisons faibles permettent une grande flexibilité et plasticité des macromolécules (protéine, enzymes, complexes protéine-ligand ou protéine- protéine) [99].

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Les forces intervenant dans la formation du complexe peuvent être de nature stérique, électronique ou les deux avec des contributions différentes. Les complexes formés sont généralement plus stables que les formes dissociées. Cette association intermoléculaire est stabilisée par plusieurs effets et des liaisons non covalentes [100].

VI.1. Les forces de Van Der Waals

Les interactions de Van der Waals, également connues sous le nom d'interactions de London ou de forces de dispersion, impliquent des dipôles instantanés. Ces interactions sont de faible intensité, mais elles sont néanmoins très importantes en pratique à cause de leur très grand nombre [101]. Les interactions de Van Der Waals sont des interactions de nature électrostatique qui ont lieu entre les nuages électroniques (Figure III.3). Cette force généralement attractive n'intervient qu'à très courte distance, elle est donc plus intense lorsque les molécules qui interagissent sont proches et volumineuses [99].

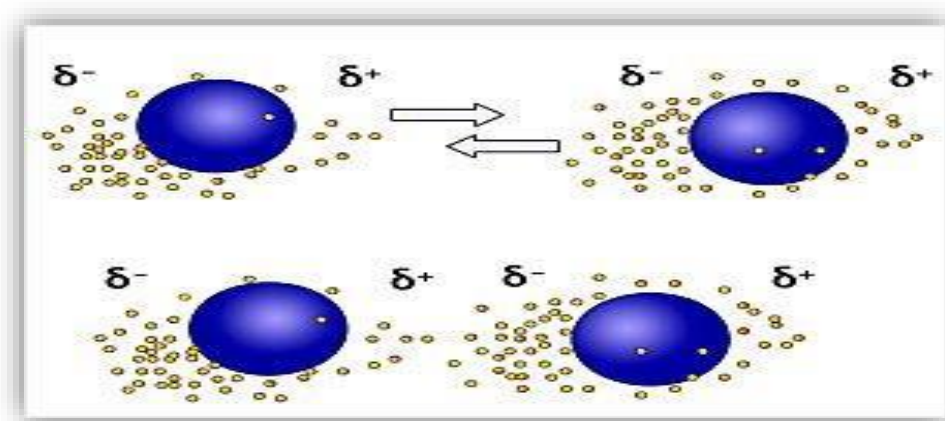


Figure III.3. Les forces de Van Der Waals [99].

VI.2. Les liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène sont des interactions d'origine électrostatique entre un atome électronégatif dit « accepteur » (charge partielle δ^-) et un atome d'hydrogène polaire (charge partielle δ^+) qui est lié de manière covalente à un atome électronégatif dit « donneur » (charge partielle δ^-) [100]. Les ponts hydrogène ont une force de l'ordre de 12 à 30 kJ/mol et agissent à très courte distance (de 0.8 à 2.8 Å). Elles sont peu nombreuses et s'adaptent très bien à la flexibilité, l'angle de la liaison H peut varier de 120° à 180° (figure III.4) [89].

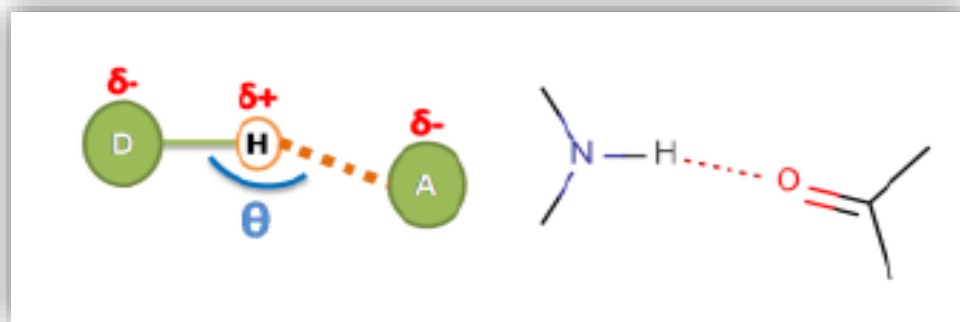


Figure III.4. La liaison hydrogène [101].

VI.3. L'effet hydrophobe

Les molécules non polaires et peu polarisables ont tendance à se regrouper, ce qui crée une force de liaison hydrophobe. Il s'agit d'interactions entre molécules ou groupements qui ont très peu d'affinité pour le solvant dans lequel elles sont dissoutes (eau). Les groupements vont se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'eau (figure III.5) [99].

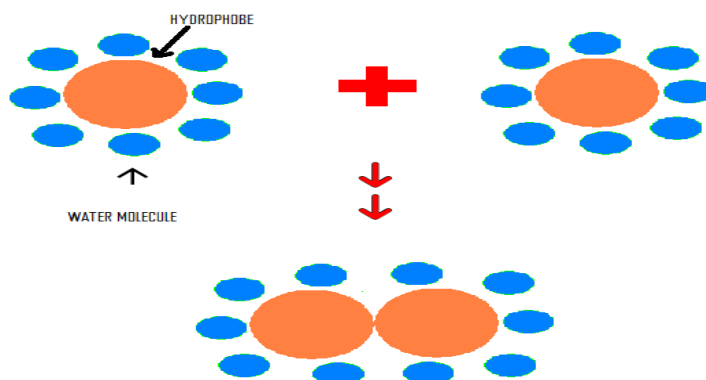


Figure III.5. Interactions hydrophobes [102].

VI.4. Les interactions électrostatiques

Certains acides aminés peuvent être chargés positivement ou négativement, ce qui donne lieu à des phénomènes électrostatiques qui favorisent la formation d'un complexe protéique spécifique. Ces interactions électrostatiques agissent à « longues » distances (autour de 10 Å), entre des groupes d'atomes électriquement chargés (figure III. 6) [103].

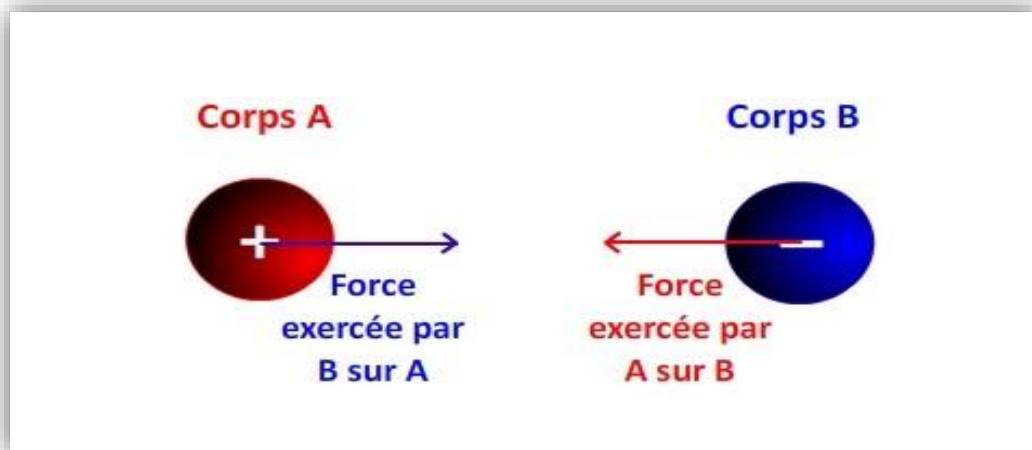


Figure III.6. Les interactions électrostatiques [103].

VII. Programmes de docking

Le docking moléculaire a pour objectif essentiel de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable du ligand au sein de son récepteur, et aussi pour estimer la force de l'interaction entre la cible et le ligand. A nos jours, plusieurs programmes de docking moléculaire (commerciaux ou non) sont disponibles. Les programmes les plus fréquemment représenté dans la figure III. 7 le tableau III.1 suivant [104, 105] :

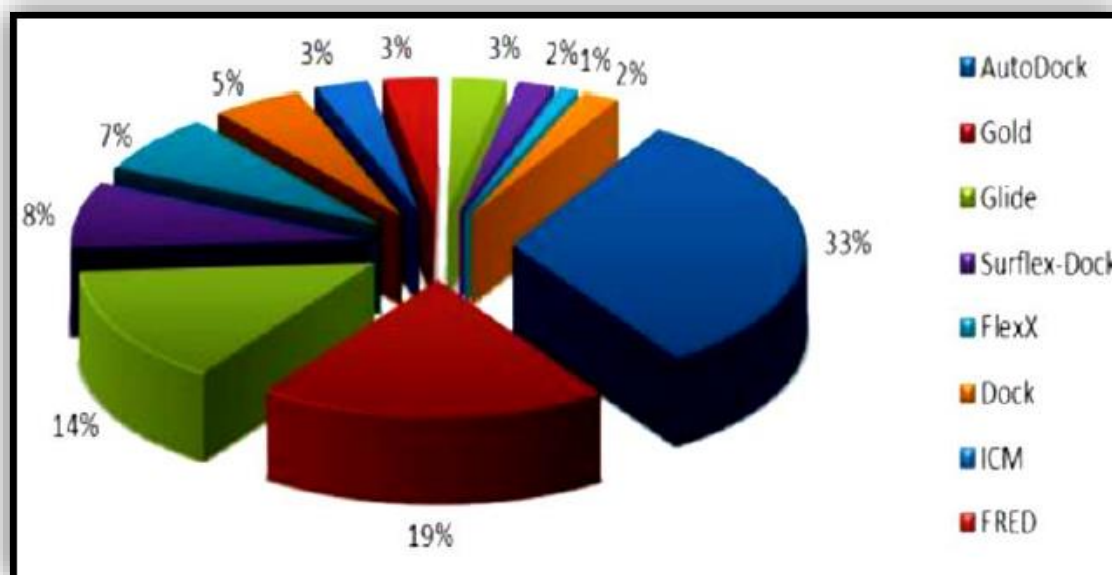


Figure III.7. Digramme des programmes de docking les plus cités [105].

Tableau III.1. Les principaux programmes de docking moléculaire [106].

Nom	Editeur	Site internet
AutoDock	scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/application/fred.html
Glid	Schrodinger	http://www.schorodinger.com/products/glide.html
Gold	CCDC	http://ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex-dock	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

VIII. Etapes typiques du Docking moléculaire

La technique de docking comprend quatre étapes principales (voir figure III.8) :

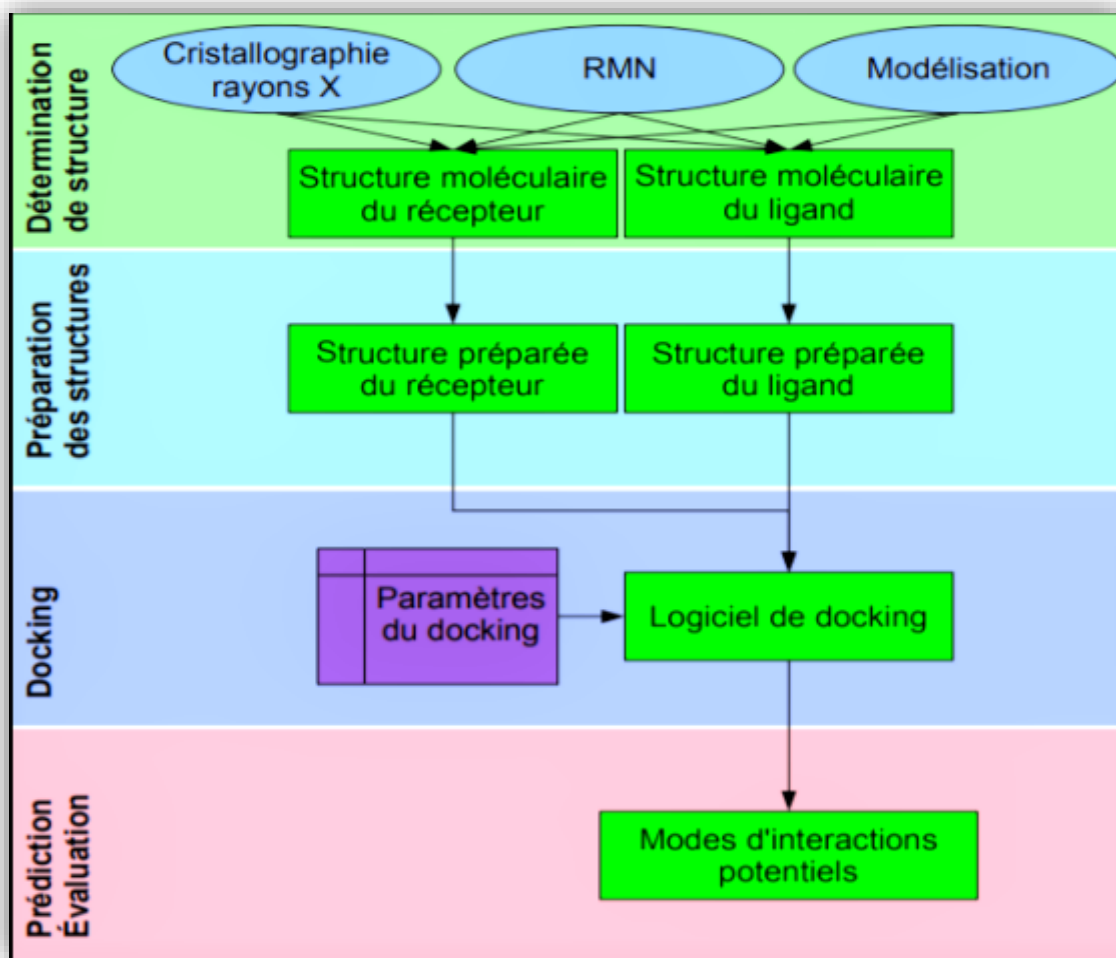


Tableau III.2. Étapes typiques d'un docking [107].

- **Détermination des structures :** cette étape préliminaire du docking moléculaire est réalisée pour détecter les structures moléculaires mises en jeu (récepteur et ligand). Ces structures sont obtenues en faisant appel à trois méthodes (la résonance magnétique nucléaire, la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X) [108].
- **Préparation des structures :** la préparation du récepteur en vue du docking ne peut être réalisée qu'une fois les structures mises en jeu sont identifiées. Après le téléchargement de la cible, nous utilisons un logiciel de visualisation pour voir avec quels ligands l'enzyme est co-cristallisé (eau, ligands, ion,...etc) [109].

- **Docking moléculaire** : le docking est une méthode qui calcule l'orientation préférée d'une molécule vers une seconde lorsqu'elles sont liées pour former un complexe stable. Les paramètres du calcul de docking sont : l'état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précise) ; détermination des acides aminés de site actif ; et enfin lancer le processus de docking. A la fin de chaque cycle d'exploration, le logiciel de docking va enregistrer la meilleure interaction avec le ligand [109].
- **Prédiction et évaluation** : une fois les paramètres du docking sont établis, le programme passe à l'étape de prédiction et d'évaluation. Celle-ci permet la mise au point des modes d'interactions potentiels [110, 111].

IX. Le programme du docking moléculaire Surflex-dock

Parmi les programmes de docking moléculaire, nous avons utilisé le programme Surflex-dock pour réaliser ce travail. Ce programme repose sur l'ajustement de fragments en commençant par construire un modèle « en négatif » du site actif dit protomol [112].

Surflex-dock est un algorithme d'amarrage moléculaire flexible entièrement automatique qui combine la fonction de notation du système d'amarrage Hammerhead avec un moteur de recherche qui s'appuie sur une méthode de similarité moléculaire basée sur la surface comme moyen de générer rapidement des poses putatives appropriées pour les fragments moléculaires. Pour réaliser le docking en utilisant ce logiciel, il faut suivre trois étapes :

- Déterminer la manière d'identifier le site actif soit à partir d'un ligand soit à partir du récepteur ;
- Construire une pseudo-molécule (protomol) qui va être la cible de différents ligands ;
- Réalisation du docking d'un ou de plusieurs ligands.

Plusieurs approches ont été utilisées pour chercher les conformations les plus stables des deux composants d'un complexe. Nous avons détaillé l'approche incrémentale qui est la stratégie utilisée par surflex-dock [113].

- **Approche incrémentale**

Le ligand est fragmenté à partir de liaisons rotatives en divers segments. L'un des segments est ancré à la surface du récepteur. Le fragment d'ancrage est généralement considéré comme le fragment qui montre le maximum d'interactions avec la surface du récepteur, a un nombre minimum de conformations alternées et assez rigide comme le système d'anneaux. Une fois la

base/l'ancre établie, l'étape suivante consiste à ajouter chacun des fragments étape par étape. Idéalement, ces fragments sont ajoutés en premier qui ont une plus grande chance de montrer des interactions comme la liaison hydrogène car ils sont de nature directionnelle et sont responsables de la spécificité du ligand. De plus, les liaisons hydrogène conduisent à une prédiction plus précise de la géométrie. Une fois qu'un fragment particulier est ajouté, les poses avec le moins d'énergies sont considérées pour la prochaine itération [114].

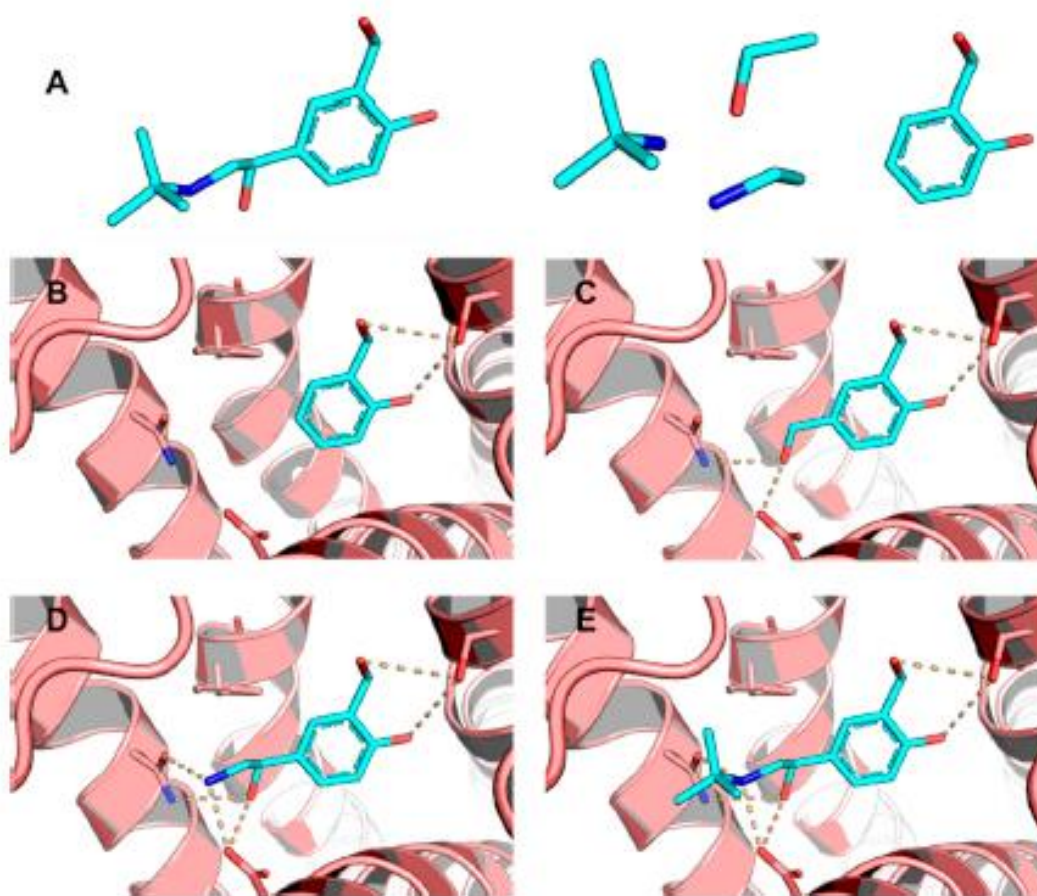


Figure III.8. La méthode de construction incrémentale [81].

(A) Le ligand est divisé en plusieurs fragments ; (B) Le fragment d'ancrage est amarré au site de liaison de la cible moléculaire ; (C) Le fragment suivant est amarré après le fragment d'ancrage ; (D et E) Les autres fragments sont ancrés séquentiellement pour construire le ligand entier dans sa conformation de liaison. Les résidus dans le site actif sont représentés en bâton. Les liaisons hydrogène sont indiquées par des lignes pointillées.

CHAPITRE IV. MATERIEL ET METHODES



CHAPITRE IV : MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel

I.1. Micro-ordinateurs

L'objectif principal de nos travaux est de découvrir de nouveaux inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 à l'aide d'une étude *in silico* permettant de prédire les affinités, les types des interactions ainsi que la position des petites molécules à l'intérieur de site actif de la COX-2.

Pour mener cette étude, nous avons utilisé des programmes installés sur trois micro-ordinateurs offrant les capacités suivantes :

- **Delle** avec une mémoire de 4,00 Go, et un processeur Intel(R) Core(TM) i5-5300U CPU @ 2.30GHz 2.29 GHz, sous le système d'exploitation Windows 10 Professionnel, version 21H2.
- **HP** avec une mémoire de 4 GO, et un processeur Intel(R) Core (TM) i3-2330M CPU @ 2.20 GHz sous le système d'exploitation Windows 7 ; 64 bits version 2010.
- **Acer** avec une mémoire de 4 GO, et un processeur Intel(R) Celeron(R) CPU 2957U @ 1.40 GHz sous le système d'exploitation Windows 7 ; 64 bits version 2007.

I.2. Les bases de données

I.2.1. Protéine Data Bank (PDB)

Protéine Data Bank (PDB) est l'unique archive mondiale des données structurales des macromolécules biologiques comme les protéines essentiellement et les acides nucléiques. Il comprend des données obtenues par cristallographie aux rayons X et spectrométrie de résonance magnétique nucléaire et microscopie électronique soumises par des biologistes et des biochimistes du monde entier [115]. La PDB a été créée aux Brookhaven National Laboratoire en 1971 en tant qu'archive pour les structures cristallines macromoléculaires biologiques. La PDB fournit des informations utiles et fondamentales sur des milliers de protéines. Pour de nombreuses protéines, il existe des dizaines voire des centaines de structures disponibles réalisées dans des conditions variables, y compris la présence de différents partenaires de liaison tels que des inhibiteurs, des acides nucléiques ou d'autres protéines, ou avec des mutations et des modifications post-traductionnelles [116].

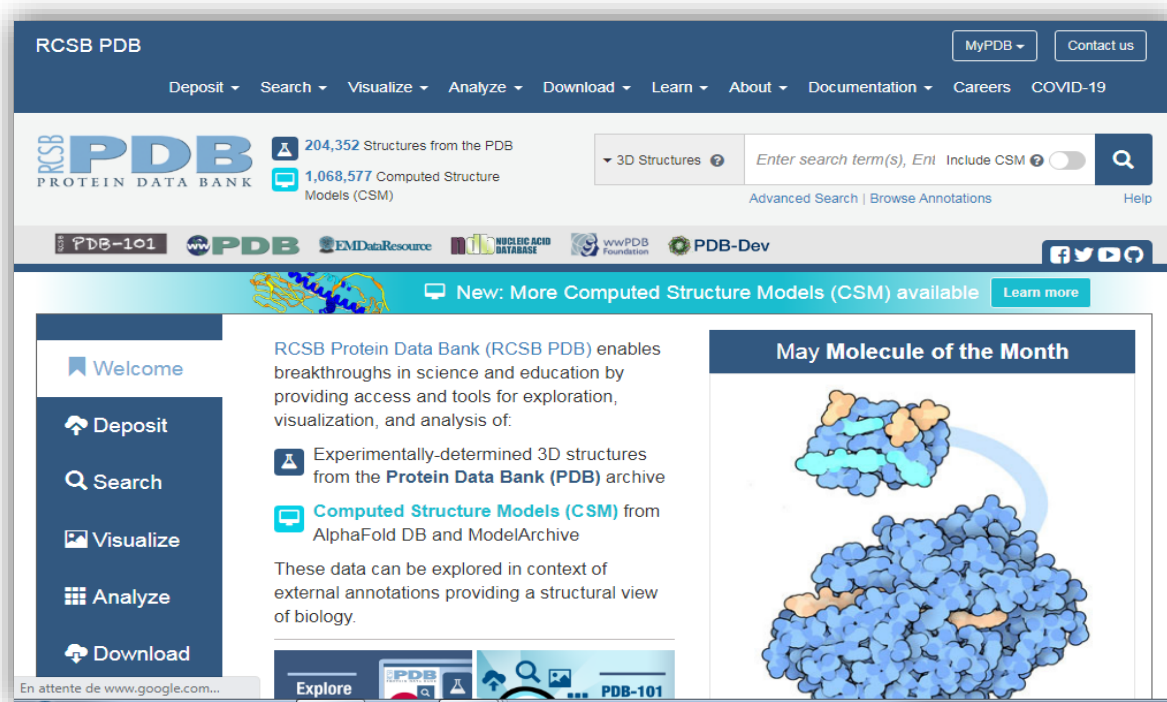


Figure IV.1. Interface de la Protein Data Bank.

I.2.2. PubChem

PubChem est une base de données de chimie lancée en 2004 aux National Institutes of Health (NIH). "Ouvert" signifie que vous pouvez mettre vos données scientifiques dans la PubChem et que d'autres peuvent les utiliser et est un référentiel public d'informations sur les substances chimiques et leurs activités biologiques [117]. Au cours des 11 dernières années, la PubChem est devenu un système important, servant de source d'informations chimiques pour la communauté de la recherche scientifique telle que la chimie informatique, la biologie chimique, la chimie médicinale et la découverte de médicaments [118]. PubChem se compose de trois bases de données interconnectées, Substance, Compound et BioAssay. La base de données Substance contient des informations chimiques déposées par des contributeurs de données individuels à PubChem, et la base de données Compound stocke des structures chimiques uniques extraites de la base de données Substance. Les données d'activité biologique des substances chimiques testées dans les expériences de dosage sont contenues dans la base de données BioAssay. Chaque composé de cette chimiothèque est stocké dans plusieurs formats de fichiers courants, notamment SMILES, mol2 et sdf. Parmi les informations disponibles dans la PubChem figurent : la référence de la molécule, la structure 2D et 3D et les propriétés physico-chimiques [118].

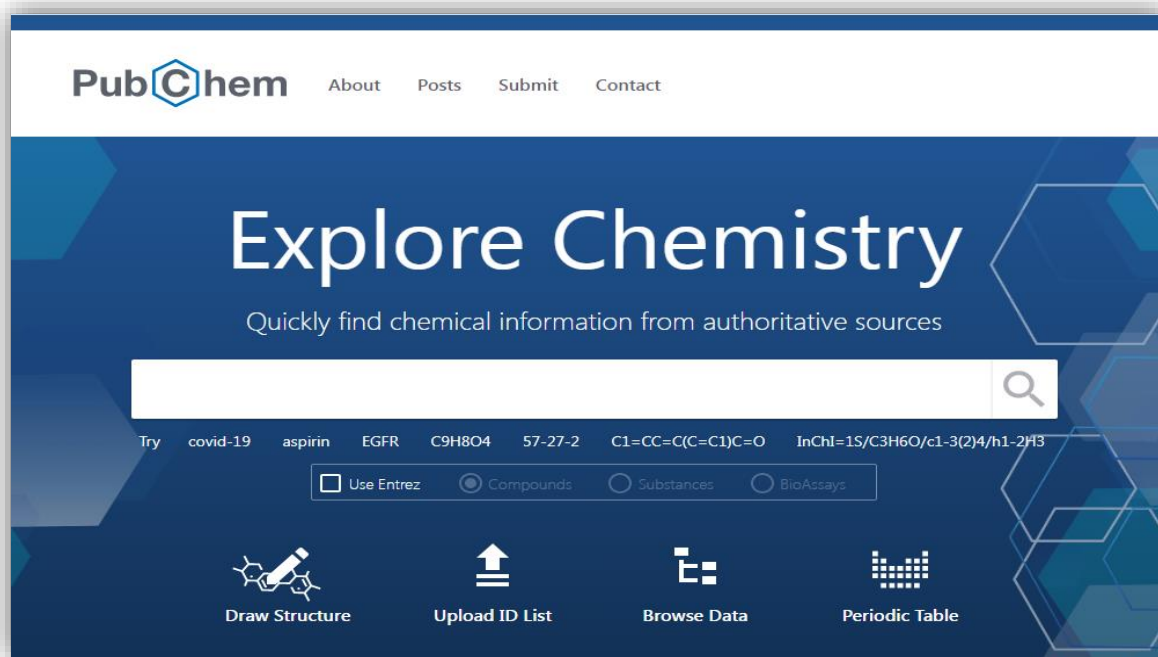


Figure IV.2. Interface de la PubChem.

I.3. Programmes utilisés

I.3.1. Le logiciel Surflex-dock

Pour simuler les interactions entre une protéine (cible enzymatique) et un ligand (substrat ou inhibiteur), nous avons choisi le programme de docking moléculaire Surflex-dock (1.3, 2005), il dispose d'un algorithme de fragmentation incrémentale appelé « algorithme de Hammerhead » [119]. Il est capable d'arrimer des ligands dans un environnement constitué d'acide aminés avec une bonne précision et d'une façon rapide. Les cinq modules de la plateforme Surflex (Tools, Similarity, Docking, xGen et Affinity) sont entièrement intégrés. L'ensemble fournit un flux de travail complet de modélisation prédictive [112]. Le logiciel est disponible pour les plates-formes Windows, Linux et Mac, avec un déploiement facile sur les postes de travail et les ordinateurs portables sur site [120].

I.3.2. Microsoft Excel

Le calcul du coefficient de corrélation de Pearson est réalisé par Microsoft Excel. Nous avons passé par les étapes suivantes :

- Trouvez le coefficient de corrélation de Pearson avec la fonction « COEFFICIENT.CORRELATION ».
- Créez une matrice de corrélation en effectuant une analyse des données.

- Trouvez plusieurs coefficients de corrélation avec une formule ; Tracez un graphique de corrélation pour obtenir la représentation visuelle de la relation de données.

I.3.3. Open Babel

C'est un programme gratuitement accessible permettant la conversion des fichiers en plusieurs formats. Les formats de fichier que Open Babel prend en charge comprennent : PDB, MOL, MOL2, SDF, Smile...etc [121, 122]. L'objectif de ce programme est d'offrir aux utilisateurs une base pour rechercher, convertir, analyser ou stocker des données issues de la modélisation moléculaire, de la chimie, des matériaux à l'état solide et de la biochimie. Open Babel dans sa version 2.0.2 est obtenu à partir de cette adresse électronique : <http://openbabel.org>.

Un exemple de conversion est mentionné dans la figure IV.3 suivante.

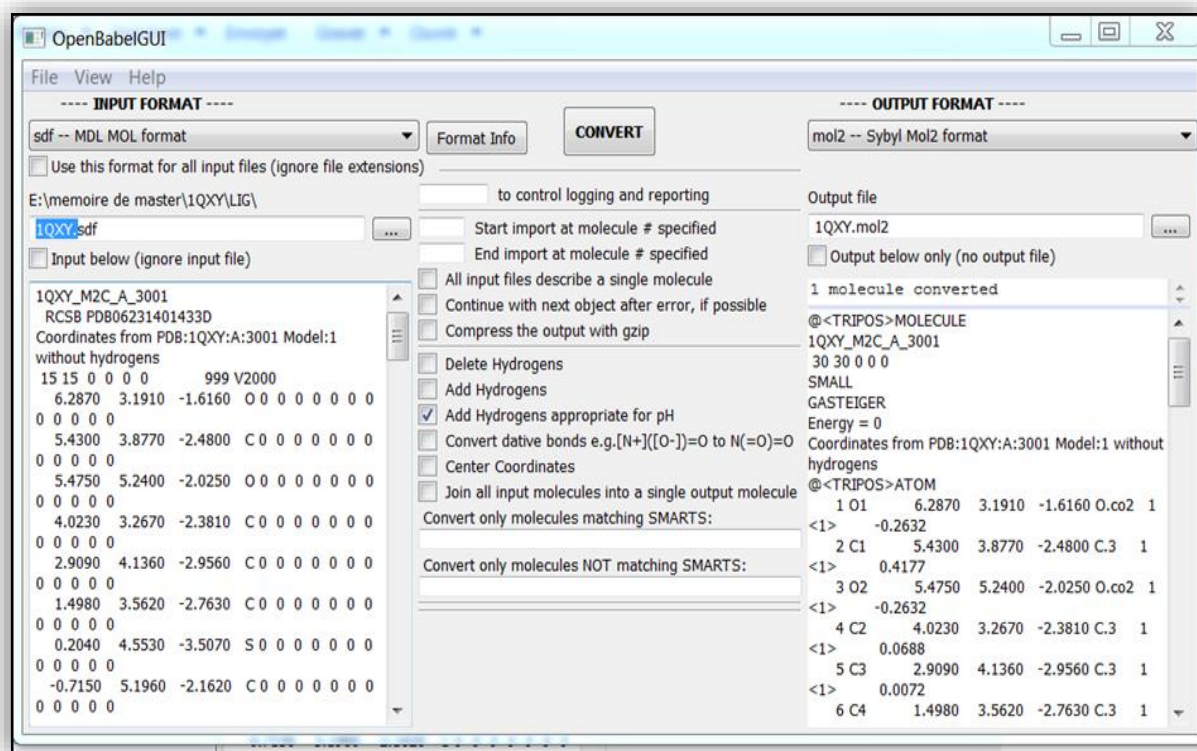


Figure IV.3. Conversion de fichiers par le programme Open Babel.

I.3.4. ViewerLite

Le programme Surflex-dock est dépourvu de la visualisation c'est pour cette raison nous avons utilisé le programme ViewerLite afin de visualiser les structure 3D des complexes protéine-inhibiteur.

ViewerLite (4.2, 2001) est un outil gratuit de visualisation, qui permet un affichage 3D d'une structure de molécule biologique. Il lit plusieurs formats de fichier dont le format .pdb qui est le format le plus courant pour visualiser la structure des protéines ou des petites molécules.

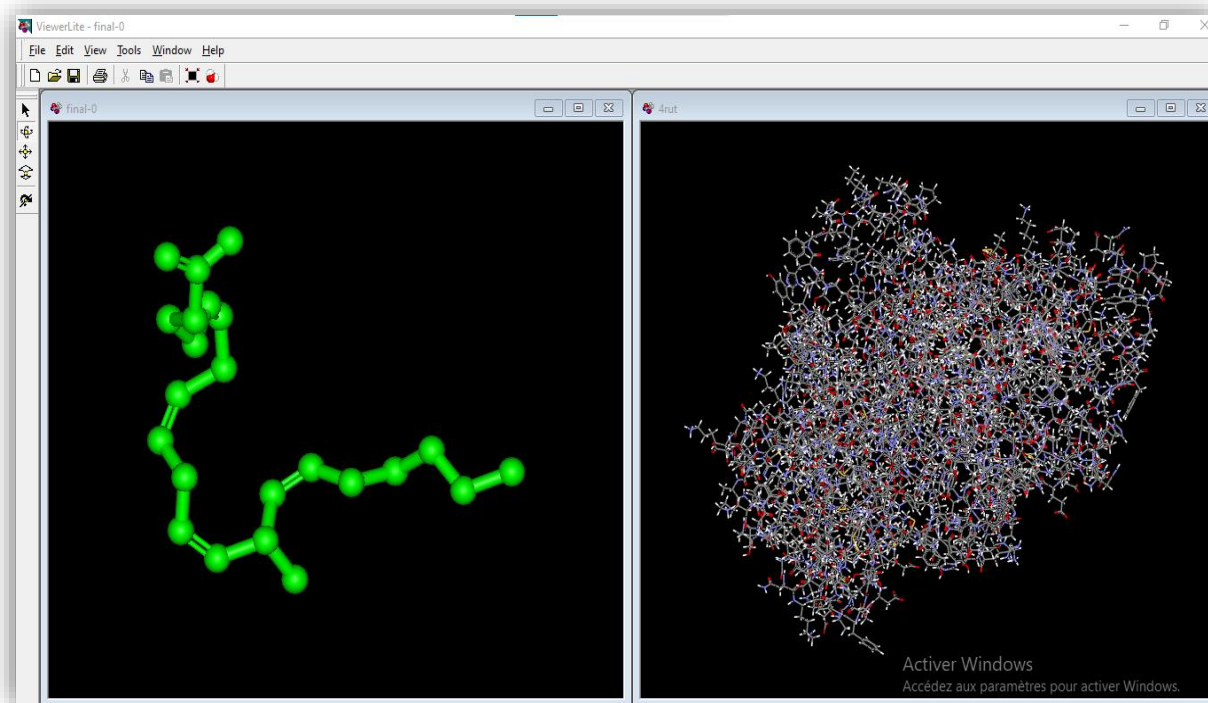


Figure IV.4. Visualisation par le logiciel Viewerlite.

I.3.5. *Discovery Studio Visualizer*

Discovery Studio Visualizer est un visualiseur gratuit qui peut être utilisé pour ouvrir des données générées par d'autres logiciels, et permet un affichage 3D des complexes protéine-ligand. Il lit plusieurs formats de fichier tel que : .pdb, .mol2, .sdf...etc. Discovery Studio Visualizer propose plusieurs fonctions telles que : la présentation des liaisons chimiques (liaison hydrogène, interaction hydrophobe...etc.), la mesure de distances, l'annotation des acides aminés et ligand, créations de surfaces, choix de couleur (selon les atomes, les structures...), la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les différentes molécules. Ce logiciel est un programme complet d'analyse et de modélisation moléculaire structures, séquences et autres données pertinentes pour les chercheurs en sciences de la vie. Ce programme fonctionne sur Windows et Linux, son adresse électronique est <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> [123].

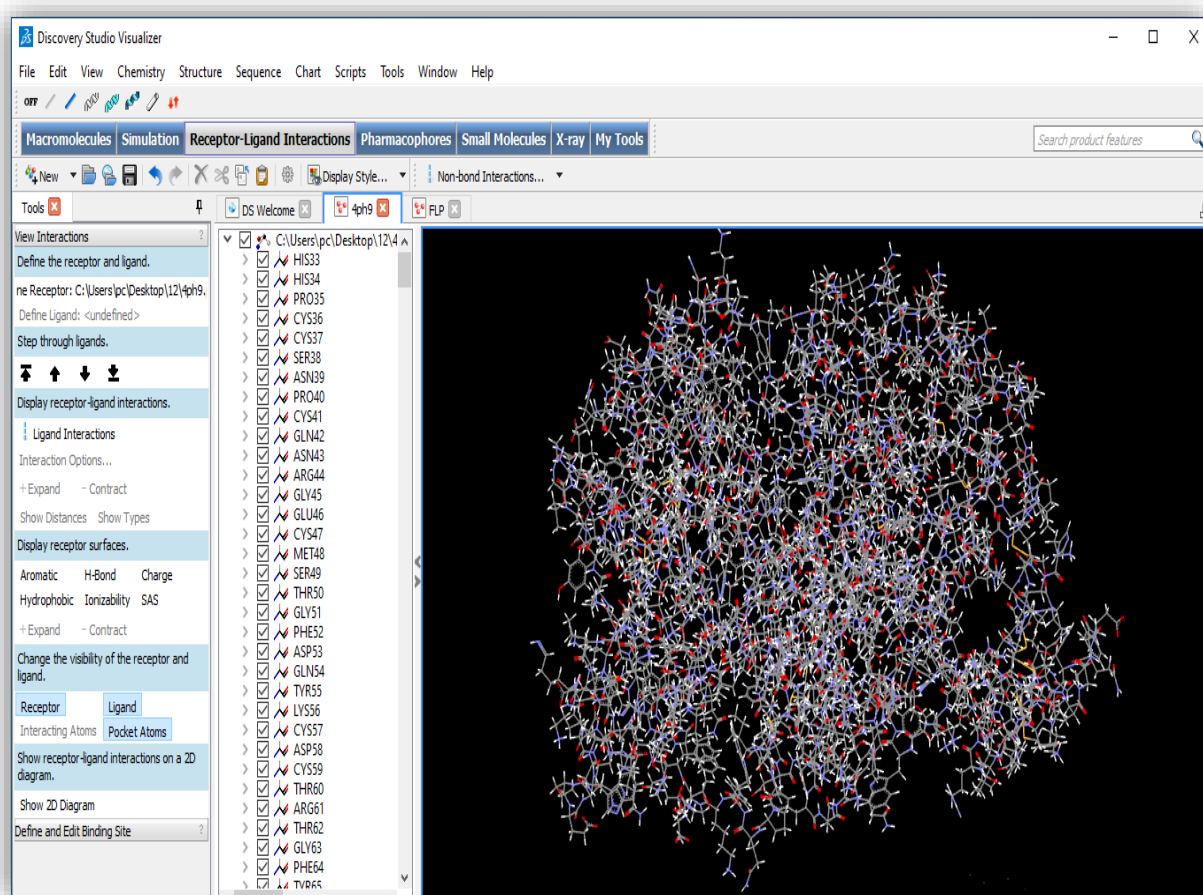


Figure IV.5. Visualisation par le logiciel Discovery Studio Visualizer.

I.4. Les Serveurs

I.4.1. SwissADME

SwissADME est un serveur en ligne géré par l'Institut suisse de bioinformatique, qui fournit des services et des ressources en bioinformatique aux scientifiques. Ce serveur web permet de calculer des descripteurs physicochimiques ainsi que de prédire les paramètres ADME, les propriétés pharmacocinétiques, la nature médicamenteuse et la convivialité de la chimie médicinale d'une ou plusieurs petites molécules pour soutenir la découverte de médicaments [124].

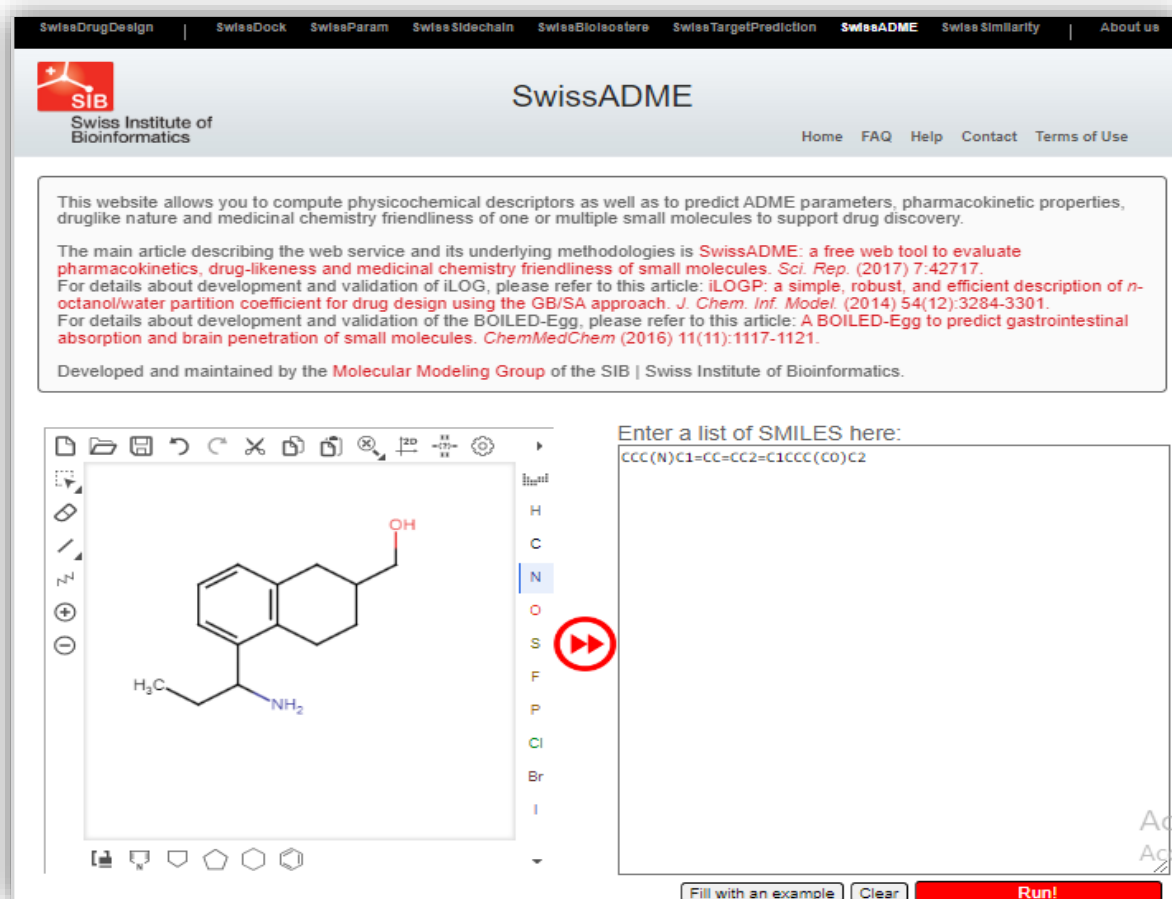


Figure IV.6. Interface graphique du serveur SwissADME.

I.4.2. PreADMET

PreADMET est une application Web permettant de prédire les données ADME-Tox et de créer une bibliothèque de type médicament à l'aide de la méthode *in silico*. PreADMET permet un accès à plusieurs modèles pour prédire [125] :

- Les propriétés physicochimiques (*Druglikeness*).
- Quelques comportements pharmacocinétiques.
- La toxicité des composés.

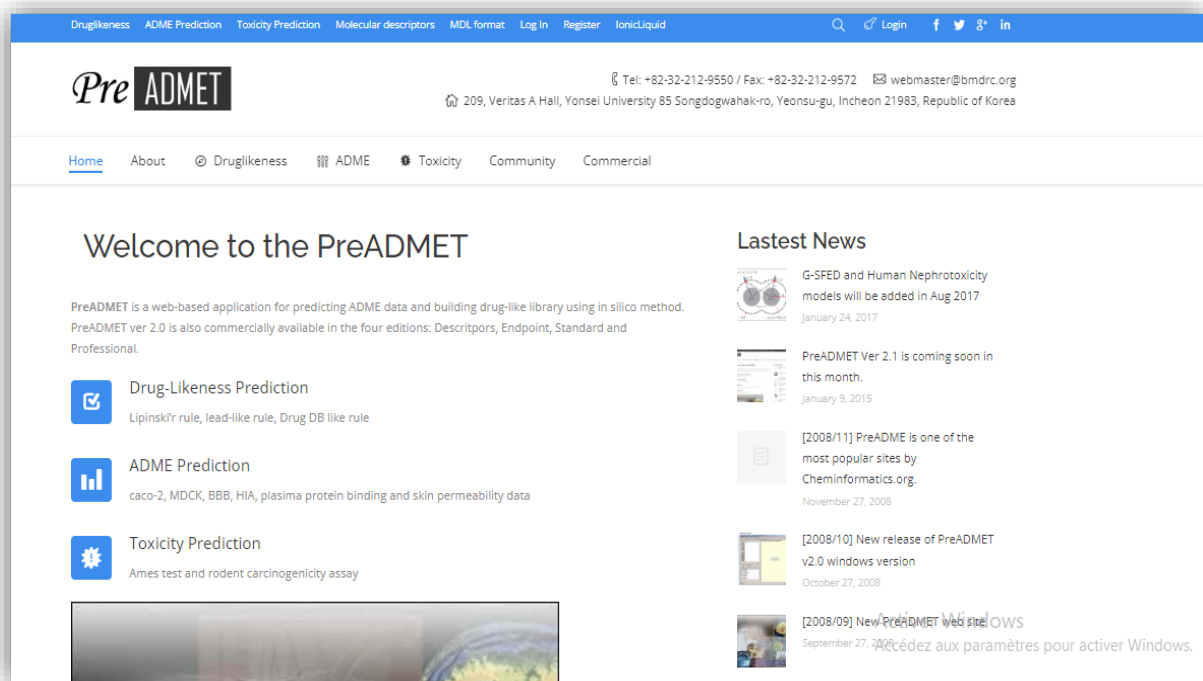


Figure IV.7. Interface graphique de serveur PreADMET.

II. Méthodes

II.1. Test de fiabilité de programme Surflex-dock

Pour valider les résultats obtenus dans notre étude, il est important de tester la fiabilité du logiciel d'ancrage moléculaire Surflex-dock. Pour ce faire, nous avons effectué deux tests pour vérifier les performances de notre logiciel d'amarrage.

II.1.1. Coefficient de corrélation r

Le coefficient de corrélation linéaire de Bravais-Pearson permet d'étudier l'intensité et le sens de la corrélation qui existe entre deux variables. La valeur du coefficient de corrélation est située entre -1 et 1. Plus le coefficient de corrélation est proche des valeurs extrêmes -1 et 1, plus la corrélation linéaire entre les variables est forte [126].

Pour étudier la corrélation entre le score obtenu par le docking moléculaire (Affinité) et l'activité biologique (IC_{50}) nous avons utilisé des complexes enzyme-inhibiteur provenant de la PDB. Au total, 71 ont été testées. La disponibilité des valeurs de leur IC_{50} est parmi les critères de choix de ces molécules.

II.1.2. Analyse visuelle

L'analyse visuelle permet de préciser la position exacte du ligand docké par Surflex-dock par rapport au ligand co-cristallisé obtenu expérimentalement. On peut dire, qu'un docking moléculaire par le programme Surflex-dock est jugé fiable si la position est identique à celles de la structure cristallisée ou du ligand de référence. Dans le cas opposé, le positionnement est dit incorrect [127].

II.2. Réalisation du docking moléculaire par Surflex-dock

II.2.1. Préparation d'enzyme

Pour réaliser le docking moléculaire, la structure 3D de l'enzyme COX-2 a été téléchargée via la banque de donnée PDB. Nous avons choisi un code de bonne qualité de l'enzyme COX-2 : le code 4PH9, c'est une structure qui est résolue à 1,81 Å. Contenant deux chaînes (A et B), la chaîne B et tous les hétéroatomes ont été éliminés pour permettre une utilisation plus facile de l'enzyme lors de l'amarrage moléculaire. Cela a été fait manuellement sans l'aide d'un logiciel via l'ouverture du fichier .pdb dans un éditeur de texte. Enfin, la chaîne restante, la chaîne A est enregistrée au format .pdb puis convertie au format .mol2 à l'aide du programme Open Babel.

II.2.2. Préparation des ligands

Les inhibiteurs de la COX-2 existant au niveau de la PDB ainsi que les similaires du meilleur inhibiteur étudié ont été téléchargés directement au format .mol2 à partir de la PDB et la banque de données PubChem.

II.2.3. Docking par Surflex-dock

Le docking moléculaire a été réalisé en utilisant le programme Surflex-dock, et différentes étapes sont nécessaires :

II.2.3.1. Génération de Protomol

Au cours de docking, nous avons utilisé une pseudo-molécule comme la cible à laquelle se rallie le ligand dans le site actif de la cible enzymatique. Pour cela, trois types de fragments (CH₄, C=O et N-H) sont placés dans de multiples positions dans le site actif et optimisés pour permettre l'établissement des interactions avec le site de liaison étudié. Les fragments les mieux scorés sont assemblés pour former le protomol qui couvre l'intégralité du site actif. Pour générer le protomol, nous avons utilisé la chaîne A du code 4PH9 sous format .mol2 et le ligand IBP sous format .mol2 étape réalisée par la commande suivante :

Surflex-dock proto ligand.mol2 protéine.mol2 pl

II.2.3.2. Le docking moléculaire

Cette étape nécessite la disponibilité de la protéine sous format .mol2, le protomol généré dans l'étape précédente et les ligands sous format .mol2. Le docking moléculaire par Surflex permet d'avoir les dix meilleures positions (conformations) de chaque ligand au sein du site actif étudié, classées par leur score (final-0, final-1...final-9). Chaque position présente trois scores : le 1^{er} correspond à l'affinité, le 2^{ème} correspond au degré de pénétration impropre du ligand dans la protéine appelé «crash score» et le 3^{ème} correspond au niveau de contribution des interactions polaires appelé «self score» (Figure VI.8). Cette étape a été réalisée en utilisant la commande suivante :

Surflex-dock dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 Protéine.mol2

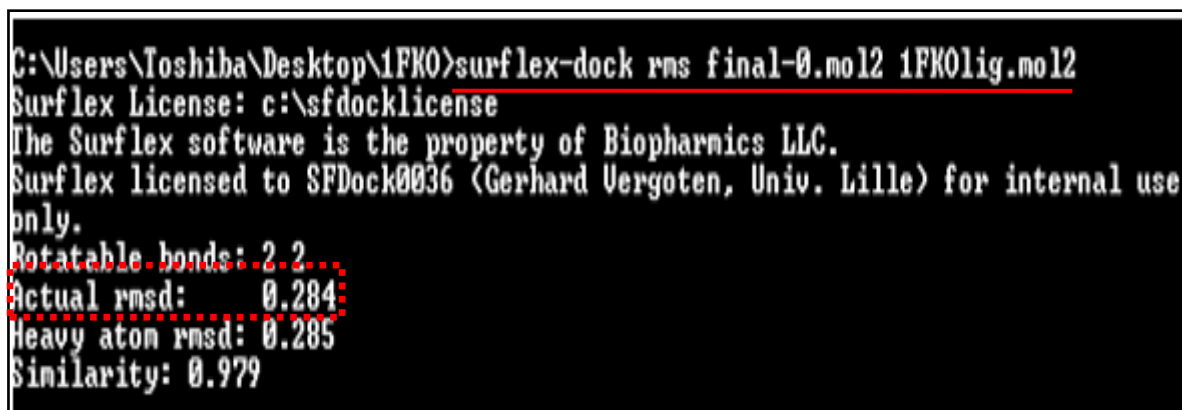
Position	1 (Affinity)	2 (Crash score)	3 (Self score)
final-0:	4.28	(crash -3.37	(self -1.54))
final-1:	3.96	(crash -0.89	(self -0.36))
final-2:	3.96	(crash -0.89	(self -0.36))
final-3:	3.84	(crash -3.60	(self -1.55))
final-4:	3.75	(crash -3.65	(self -1.69))
final-5:	3.70	(crash -3.68	(self -1.68))
final-6:	3.70	(crash -3.68	(self -1.68))
final-7:	3.69	(crash -1.21	(self -0.62))
final-8:	3.69	(crash -1.21	(self -0.62))
final-9:	3.69	(crash -1.43	(self -0.46))

Figure IV.8. Capture d'écran des résultats du docking obtenus Par le logiciel surflex-dock.

II.2.3.3. Calcule de RMSD

Le RMSD permet la précision du positionnement des composés (Figure IV.9). Cette étape a été réalisée en utilisant la commande suivante :

Surflex-dock rms final-0.mol2 ligand.mol2



```
C:\Users\Toshiba\Desktop\1FK0>surflex-dock rms final-0.mol2 1FK0lig.mol2
Surflex License: c:\sfdocklicense
The Surflex software is the property of Biopharmics LLC.
Surflex licensed to SFDock0036 (Gerhard Vergoten, Univ. Lille) for internal use
only.
Rotatable bonds: 2 2
Actual rmsd: 0.284
Heavy atom rmsd: 0.285
Similarity: 0.979
```

Figure IV.9. Résultat du calcul de RMSD par le programme surflex-dock.

III. Prédiction de la similarité médicamenteuse

Pour augmenter le succès de la découverte et le développement de candidats médicaments, il est nécessaire de considérer l'activité pharmacologique des composés et l'optimisation de leurs propriétés ADME-Tox (Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité). Ces tests peuvent être classés en trois catégories : caractérisation physicochimique, paramètres pharmacocinétiques et prédiction de la toxicité.

III.1. Propriétés physico-chimiques

Il existe différentes règles pour prédire une bonne biodisponibilité d'un médicament par voie orale, l'une des règles les plus connues est la règle de *Lipinski*.

III.1.1. Règle de *Lipinski*

La règle de cinq de *Lipinski* est une règle empirique qui décrit la pharmacobilité d'une molécule déterminée [128]. Cette règle décrit un ensemble de critères, permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D) [129]. L'efficacité de ces composés actifs administrés par voie orale sera influencée par les processus d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'élimination (ADME). Des caractéristiques communes influençant la perméabilité d'un composé à travers les barrières physiologiques ont été identifiées [130]. Selon cette règle, un composé possède toutes les chances d'être disponible oralement s'il respecte au moins 3 des critères suivantes :

1. Possède une masse moléculaire inférieure à 500 daltons.
2. Un coefficient de partition (logP) ou une lipophilie entre -2 et 5.
3. Ne possède pas plus de 5 donneurs de ponts hydrogène (OH et NH).

4. Ne possède pas plus de 10 accepteurs de ponts hydrogène (O et N).

Une règle supplémentaire a été proposée par *Veber* qui comparait la biodisponibilité orale du composé et la perméabilité du composé à la flexibilité moléculaire.

III.1.2. Règle de *Veber*

De plus, *Veber* [131] a introduit deux critères supplémentaires à ce qui est aujourd'hui communément appelé « la règle des 5 ». D'après l'étude de 1100 composés candidats médicaments, la surface polaire (PSA, *polar surface area*) du composé doit être inférieure ou égale à $140 \text{ \AA}^2$ et le nombre de liaisons de rotation (*rotatable bonds*) doit être inférieur ou égal à 10 pour une bonne biodisponibilité par voie orale.

III.2. Propriétés pharmacocinétiques

L'échec des candidats médicaments lors des phases cliniques était principalement imputable à de mauvaises performances pharmacocinétiques et de biodisponibilité. Il est alors apparu nécessaire de prendre en compte ces critères dès les phases précoces de la recherche et développement de nouveau médicament pour tenter de diminuer le taux d'échec des candidats médicaments. La mise en place de filtres ADME des chimiothèques avant tout processus de criblage a donné d'excellents résultats [132].

III.2.1. Absorption

L'absorption est le processus par lequel le médicament passe de son site d'administration à la circulation générale. Un médicament doit traverser plusieurs membranes cellulaires avant d'atteindre la circulation sanguine. Les membranes cellulaires sont des barrières biologiques qui interdisent sélectivement le passage des molécules. Les médicaments peuvent traverser les membranes cellulaires par [89] :

- Diffusion passive ;
- Transport actif ;
- Endocytose.

L'absorption gastro-intestinale (GI) est un modèle pour prédire *in silico* l'absorption des candidats-médicaments.

III.2.2. La perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière perméable hautement sélective qui sépare le sang et le système nerveux central [133]. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

est un élément important de la régulation de l'environnement interne du cerveau. Les médicaments agissant dans le système nerveux central doivent traverser le BHE. Les paramètres moléculaires «règle de cinq» ont été conçus pour faciliter les prédictions de la pénétration à la BHE. Ils participent à la détermination de la capacité des molécules à traverser la BHE [134].

III.2.3. Inhibition des CYP450

L'inhibition des enzymes du cytochrome P450 ou CYP450 est le mécanisme le plus courant conduisant à des interactions médicamenteuses [135]. Les cytochromes P450 sont une superfamille d'enzymes ayant plusieurs caractéristiques communes. On les désigne sous le nom d'iso-enzymes. Ces enzymes sont des hémoprotéines contenant une molécule d'hème par protéine, mais elles se distinguent par leurs apoprotéines. Cette superfamille d'enzymes est divisée en familles dont les membres ont un pourcentage d'homologie de 40% dans leur séquence protéique. Ces familles sont subdivisées en sous-familles dont les membres ont une similitude de 55 %. La famille est représentée par un chiffre arabe, la lettre correspond à une sous-famille, et un dernier chiffre arabe indique la protéine spécifique. Les différentes familles du CYP450 peuvent être subdivisées en deux classes majeures, soit celles qui interviennent dans la synthèse de substances endogènes telles que les stéroïdes, les acides biliaires, les leucotriènes ou les prostaglandines, et celles qui interviennent dans le métabolisme des xénobiotiques. Les CYP1, CYP2 et CYP3 sont les trois principales familles responsables du métabolisme des médicaments [136].

III.3. La toxicité

La toxicité se définit comme l'ensemble des effets néfastes qui peuvent être des lésions morphologiques et fonctionnelles dans un organisme vivant, provoquées par une substance introduite à dose unique relativement élevée ou à des petites doses longtemps répétées. L'étude de la toxicité d'une substance est l'ensemble des essais pharmacologiques, qui déterminent le degré ou le caractère nocif de cette dernière afin de réglementer son utilisation. L'action d'une substance toxique est évaluée en fonction de plusieurs paramètres entre autres son mode d'administration [137].

La toxicité peut être classifiée selon l'organe affecté (hépatotoxicité, néphrotoxicité, cardiotoxicité,...) ou selon le mécanisme de toxicité (génotoxicité, mutagénicité, carcinogénicité) [138].

III.3.1. Mutagénicité par le test Ames

Le test d'Ames est un test de mutagenèse proprement dit. Il consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation His⁻ rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations His⁻ reversent spontanément vers His⁺ et donc les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His⁻ à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses His⁺ [139, 140].

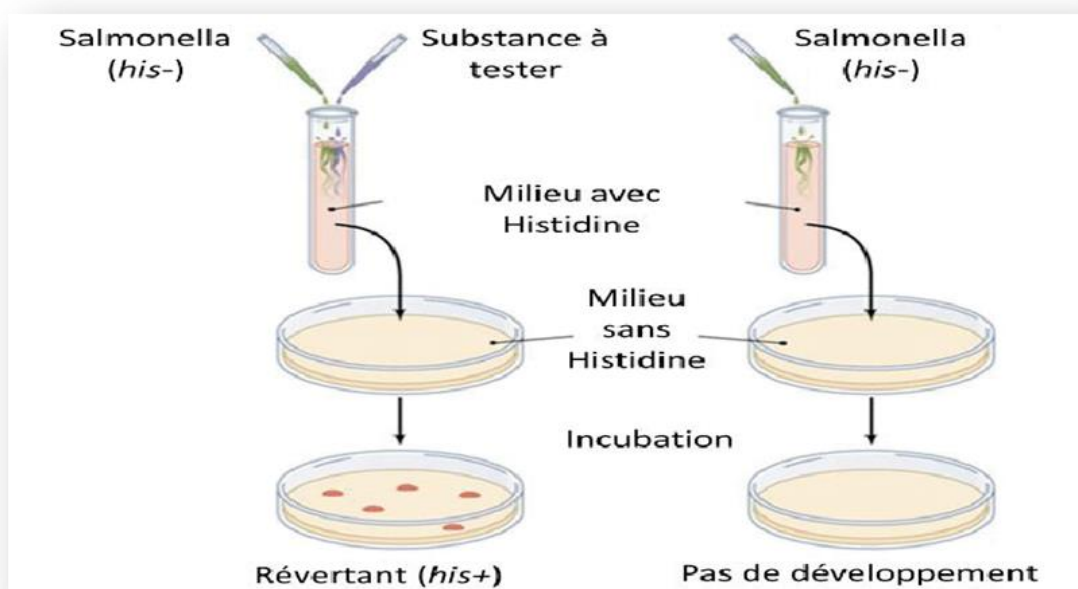


Figure IV-10. Schéma explicatif de test d'Ames [141].

III.3.2. Cancérogénicité

L'objectif de ces études est de définir le potentiel cancérigène d'une substance chez l'animal afin d'évaluer le risque chez l'homme. Ces études sont nécessaires lors d'une utilisation clinique prolongée de la substance chez l'homme (au moins 6 mois) ou lors d'une administration répétée sur plusieurs cycles. Le schéma de base de ces études est une administration prolongée chez le rongeur (24 à 30 mois chez le rat et 18 à 24 mois chez la souris) [142].

III.3.3. Inhibition de HERG

Le gène HERG code pour le canal ionique sous-jacent à la composante rapide du courant potassique de redressement retardé cardiaque, I_{Kr} [143]. La réduction des courants HERG due à des mutations dans HERG ou via un blocage médicamenteux excessif peut produire un syndrome du QT (Quick time) long, un trouble de la repolarisation cardiaque potentiellement mortel. Outre le tissu cardiaque, les canaux potassiques HERG sont également exprimés dans diverses cellules tumorales, où il a été démontré qu'ils sont impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose [144].

CHAPITRE V. RESULTATS ET DISCUSSIONS



CHPITRE V : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans le but d'identifier *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la COX-2, deux études furent menées dans ce mémoire. La première étude traite la fiabilité du programme de docking moléculaire Surflex-dock. La deuxième qui nous intéresse dans cette partie du travail est une étude théorique qui consiste à réaliser un docking moléculaire des composés qu'on retrouve au niveau de la chimiothèque Pubchem par le programme de docking Surflex-dock.

I. Tests de fiabilité du programme de docking Surflex-dock

Pour vérifier si le protocole de docking que nous venons de l'utiliser est correct, nous avons jugé utile d'évaluer la performance de logiciel Surflex-dock utilisé dans cette étude. Plusieurs tests permettent l'évaluation de la qualité d'un programme de docking moléculaire parmi lesquels :

- ❖ Le coefficient de corrélation linéaire (r).
- ❖ Analyse visuelle.

I.1. Le coefficient de corrélation linéaire (r)

La performance de programme Surflex-dock a été vérifié par le test de corrélation linéaire qui peut exister entre l'affinité (finale-0) calculée par Surflex-dock et l'activité biologique ($\log IC_{50}$) déterminée expérimentalement de divers complexes protéine-ligand tirés de façon aléatoire de la PDB en calculant le coefficient de corrélation linéaire, et en traçant la droite de régression linéaire entre ces deux paramètres.

Dans cette étude, 71 complexes protéine-ligand ont été testés par le programme de docking moléculaire Surflex-dock. Le score de docking des inhibiteurs étudiés ainsi que leur $\log IC_{50}$ sont représentés dans le tableau V.1 suivant.

Tableau V.1. Corrélation entre les scores donnés par Surflex-dock de 71 complexes et leur activité biologique ($\log IC_{50}$).

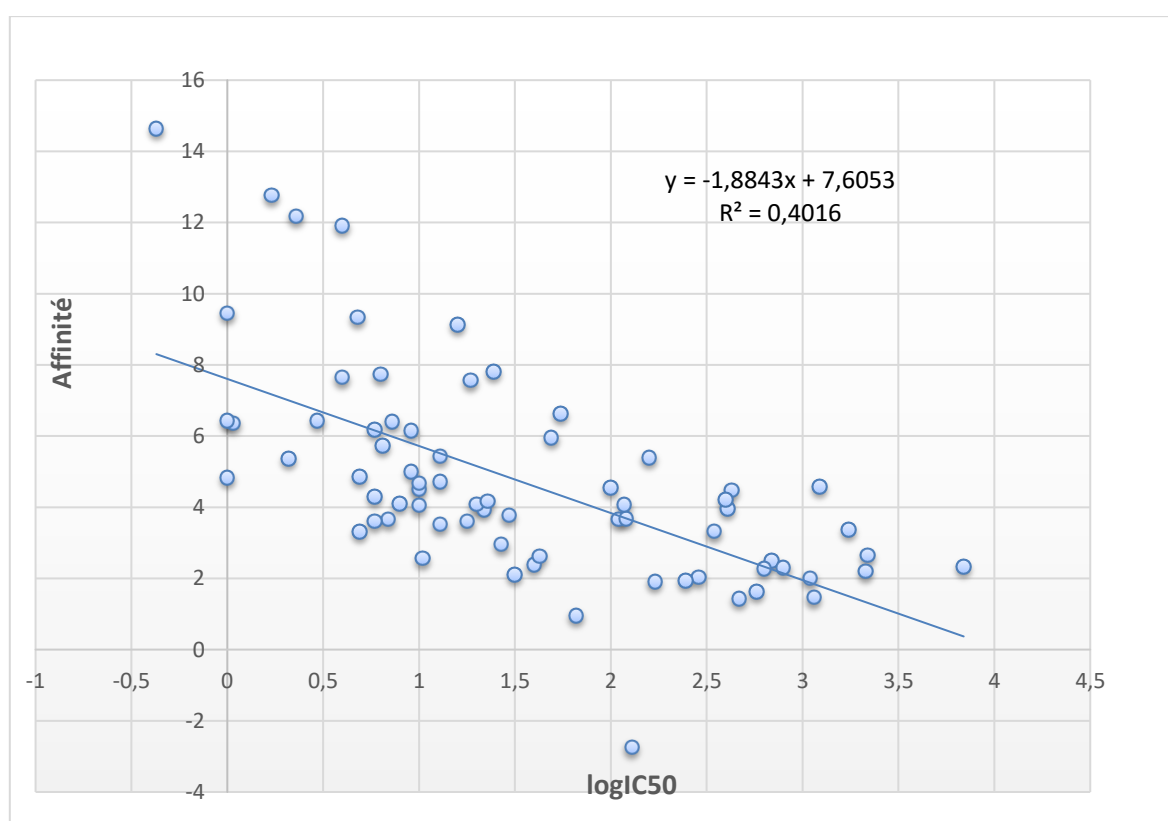
Code de l'enzyme	Code de ligand	IC ₅₀ (Nm)	Log IC ₅₀	affinité (M^{-1})
1CX2	S58	9,3	1,69	5,96
6COX	G_S58	9,3	0,96	6,16
3PGH	FLP	10	1	4,05
4PH9	IBP	100	2	4.55

4OTY	LUR	40	1.60	2.39
3Q7D	NPX	430	2.63	4.48
2AW1	COX	43	1.63	2.63
1PXX	DIF	5	0.69	4.86
2BB7	QMS	2140	3.33	2.20
2EVC	FC3	290	2.46	2.04
2EVM	FC2	693	2.84	2.50
2P99	YE6	1160	3.06	1.47
2P98	YE7	640	2.80	2.28
2Q92	B23	1100	3.04	2.01
1QZW	M1C	7000	3.84	2.33
2GG3	U13	580	2.76	1.62
1YVM	TMG	472	2.67	1.42
2GG5	U19	250	2.39	1.93
2EVO	CT0	67	1.82	0.95
2GG0	U11	1700	2.23	1.90
2GG7	U14	1750	3.24	3.37
1QZY	TDE	800	2.90	2.30
1R58	AO5	110	2.04	3.66
3FMR	TN4	10.6	1.02	2.57
5T4B	75N	0.42	-0.37	14.64
2OLE	KR2	56.2	1.74	6.62
2ONC	SY1	13	1,11	3.52
2OPH	277	16	1.2	9.13
2QJR	PZF	6.4	0.8	7.74
2QKY	13Z	22	1.34	3.93
2QOE	448	25	1.39	7.8
2QT9	524	2.3	0.36	12.18
2QTB	474	4.8	0.68	9.34
3Q8W	AZV	10	1	4.5

3SWW	KXB	4	0.6	7.65
1X70	715	18	1.25	3.6
2AJD	BRR	20	1.3	4.09
2BUB	FPB	410	2.61	3.95
2BUC	OO8	23	1.36	4.17
2FJP	S14	4	0.6	11.9
2HHA	3TP	122	2.08	3.67
2IIV	565	6.6	0.81	5.72
2RGU	356	1	0	9.46
3C43	315	19	1.27	7.57
3CC	7AC	8	0.9	4.1
3D4L	605	32	1.5	2.11
4FFW	715	120	2.07	4.07
5I7U	6AJ	1.7	0.23	12.77
1HT5	FL2	2.10	0.32	5.36
3N8X	NIM	1	0	4.83
1EQG	IBP	7.28	0.86	6.40
2OYU	IMS	350	2.54	3.32
2OYE	IM8	5.90	0.77	6.18
5WBE	63X	13	1.11	4.72
1N5X	FES	30	1.47	3.77
1G2A	BB2	6	0.77	4.29
1Q1Y	BB2	5	0.69	3.31
1G27	BB2	7	0.84	3.66
2AI8	5B7	160	2.20	5.39
2EW6	Y13	1.08	0.03	6.36
4DR9	BB2	10	1	4.67
3E3U	NVC	13	1.11	5.44
4JE7	C_BB2	27	1.43	2.96
6OW	N9Y	1	0	6.43

2AI7	SB7	400	2.60	4.20
2AIE	SB9	2200	3.34	2.65
2EW5	Y12	1250	3.09	4.58
1LRU	BB2	6	0.77	3.61
1S17	GNR	5	0.96	5
6OW2	NB4	3	0.47	6.43

L'analyse par régression linéaire a permis d'obtenir la courbe de corrélation suivante :



Graph V.1. Corrélation linéaire entre les Affinités des différents inhibiteurs données par Surflex-dock et leur activité biologique ($\log IC_{50}$).

Selon les travaux de Bensegueni A (2007), un programme de docking moléculaire est performant quand la valeur absolue du coefficient de corrélation linéaire dépasse 0.5, ce qui est en parfait accord avec les résultats trouvés [145]. Le graphique V.1 donne un nuage de points avec un coefficient de corrélation supérieure à 0.5 ($|r| \geq 0.5$) [127].

Le programme Surflex-dock établit une relation linéaire négative ($r = -0,63$) entre l'affinité et l'activité biologique représentée ici par $\log IC_{50}$. Ceci témoigne d'une bonne

corrélation entre ces deux paramètres et donc de la bonne performance du logiciel de docking moléculaire Surflex-dock et ce conformément aux résultats de Boucherit H (2012) et Boucherit et *al*, (2014) qui est également révèle un coefficient de corrélation dépasse 0.5. La corrélation est calculée entre l'activité biologique ($\log IC_{50}$) et les valeurs d'affinités de divers inhibiteurs de la méthionine aminopeptidase (MetAP) estimées par Surflex-dock étaient égales à 0,76 [146, 147].

I.2. Analyse visuelle

L'analyse visuelle est aussi une étape utile pour juger la performance du logiciel Surflex-dock. Elle permet de visualiser si un ligand simulé par Surflex-dock se superpose ou non avec le ligand Co-cristallisé.

En effet, l'analyse visuelle par Surflex-dock est réalisée sur 25 complexes COX-2 – inhibiteurs. Les codes de notre enzyme, les inhibiteurs testés ainsi que les valeurs de RMSD sont présentés dans le tableau V. 2.ci-dessous.

Tableau V.2. Valeurs de RMSD de 25 complexes COX2-inhibiteur étudiés.

Code de l'enzyme	Code de l'inhibiteur	RMSD (Å)
1cx2	S58	0.902
4cox	IMN	1,829
6cox	G_S58	1,004
3pgh	FLP	1,238
5ikv	FLF	3.041
4rrx	LUR	5.531
4rrz	K_LUR	6,224
4rrw	LUR	6,224
3qmo	NS4	5,112
3hs7	HXA	5,370
5ikr	ID8	5.171
4otj	IXP	3.536
4ph9	IBP	2.454
4m10	ICD	9.432
4oty	LUR	3.090

4rut	LM8	7.519
5f1a	SAL	4.307
3olt	ACD	3.37
3q7d	NPX	1.202
4e1g	LNL	4.791
2Aw1	Cox	4.334
1cvu	ACD	2.168
1PXX	DIF	2.981
3HS5	ACD	2.106
3HS6	EpA	7.729

Afin de découvrir l'importance de l'analyse visuelle nous avons choisi à partir de tableau V.2 trois complexes avec des valeurs de RMSD différents. La comparaison de la conformation expérimentale qu'on retrouve dans la PDB de ces complexes (colorées en vert) : 1CX2 (le meilleur), 1PXX (l'intermédiaire) et 4RUT (le mauvais) avec les conformations calculées par le logiciel Surflex-dock (colorées en rouge), est présentée dans le tableau V.3 et les figures V.1, 2 et 3 suivants.

Tableau V.3. Valeurs de RMSD des trois complexes de la COX2 choisis.

Code de complexe	Code du ligand	RMSD (Å)	Nombre de liaison retable
1CX2	S58	0.902	3
1PXX	DIF	2.981	4
4RUT	LM8	7.519	14

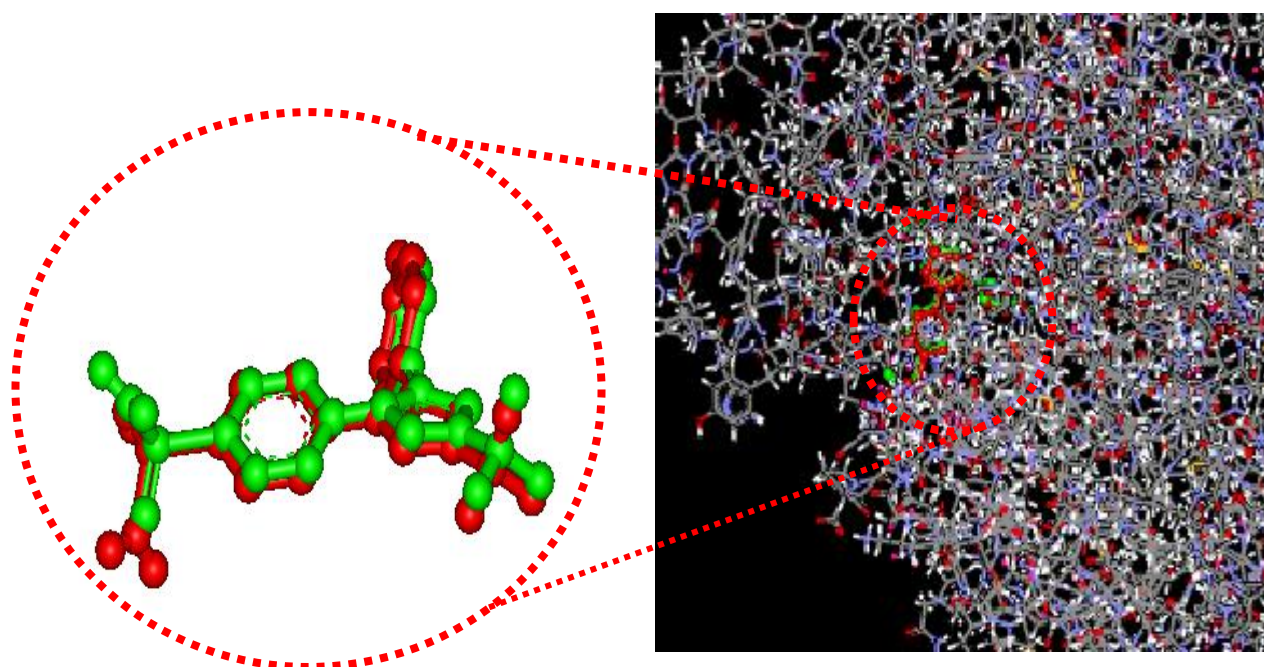


Figure V.1. Superposition du ligand S58 du complexe 1CX2 simulé par surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré en vert).

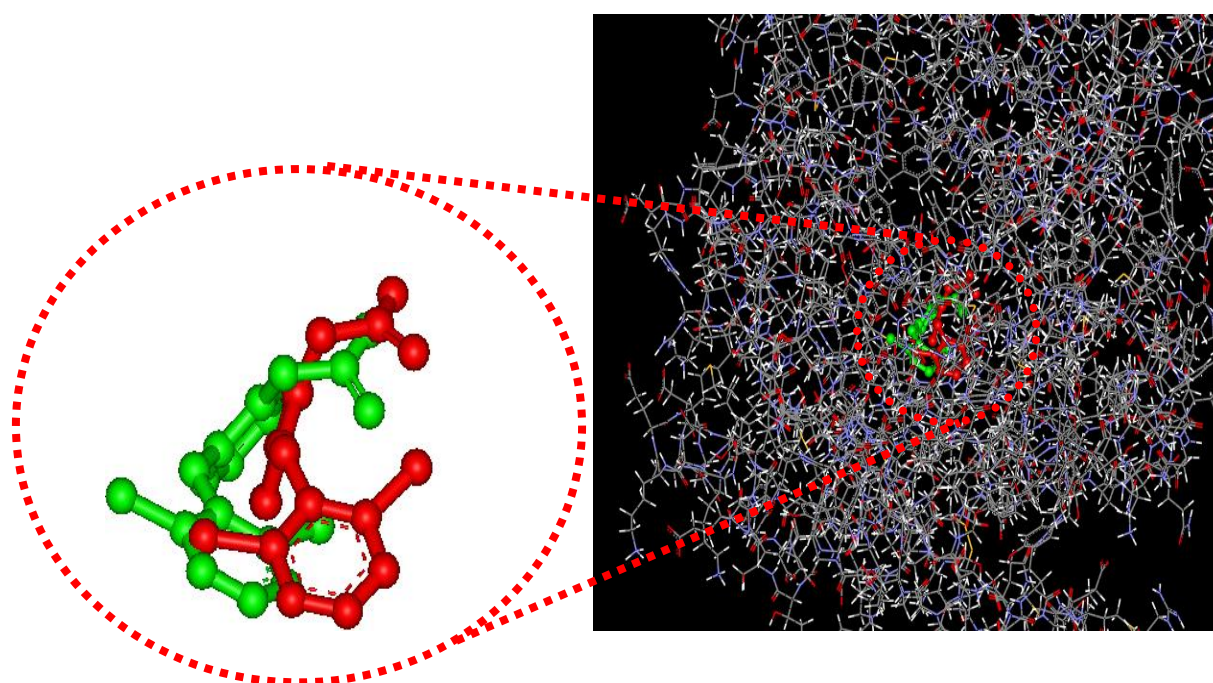


Figure V.2. Superposition du ligand LM8 du complexe 1PXX simulé par surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré vert).

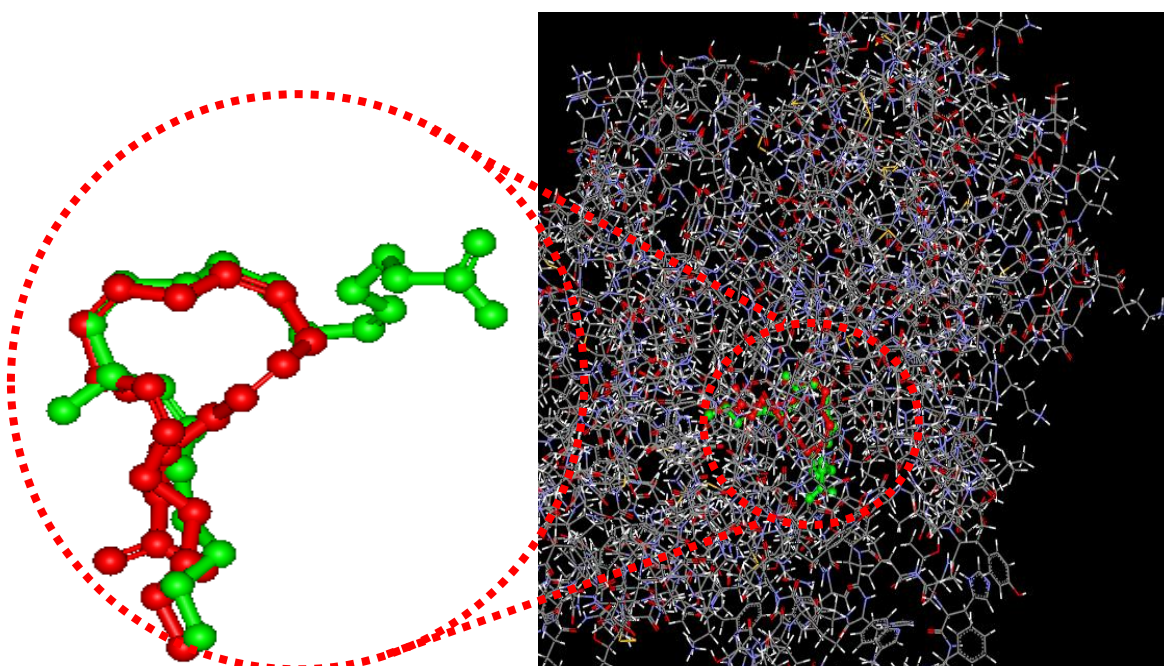


Figure V.3. Superposition du ligand DIF du complexe 4RUT simulé par surflex-dock (coloré en rouge) vis-à-vis de la conformation expérimentale (coloré vert).

D'après les résultats de docking moléculaire on obtient :

- ❖ Dans le cas de ligand S58, avec un RMSD de 0.902 Å ; la superposition est presque parfaite. Elle présente une conformation spatiale très proche voir même superposable à celle de ligand déterminé expérimentalement.
- ❖ Dans le cas de ligand DIF, avec un RMSD de 2.981 Å ; la superposition est moindre que dans le premier cas.
- ❖ Dans le cas de ligand LM8, avec un RMSD de 7.519 Å ; la superposition des deux inhibiteurs est mauvaise c'est-à-dire la figure V. 3 montre que le ligand simulé avec Surflex-dock se place très mal donc, il n'existe aucune superposition avec le ligand déterminé expérimentalement.

Dans le but d'expliquer ces résultats, nous avons ajouté un facteur qui peut être influents sur les valeurs de RMSD. Ce facteur est le nombre de liaisons rotatives (tableau V.3). Le nombre élevé des liaisons rotatifs (liaisons simples ou liaisons sigma pouvant tourner librement) présentes dans le ligand codé par LM8 est probablement la

raison pour laquelle il donne un mauvais RMSD, car il génère un très grand nombre de conformations [148].

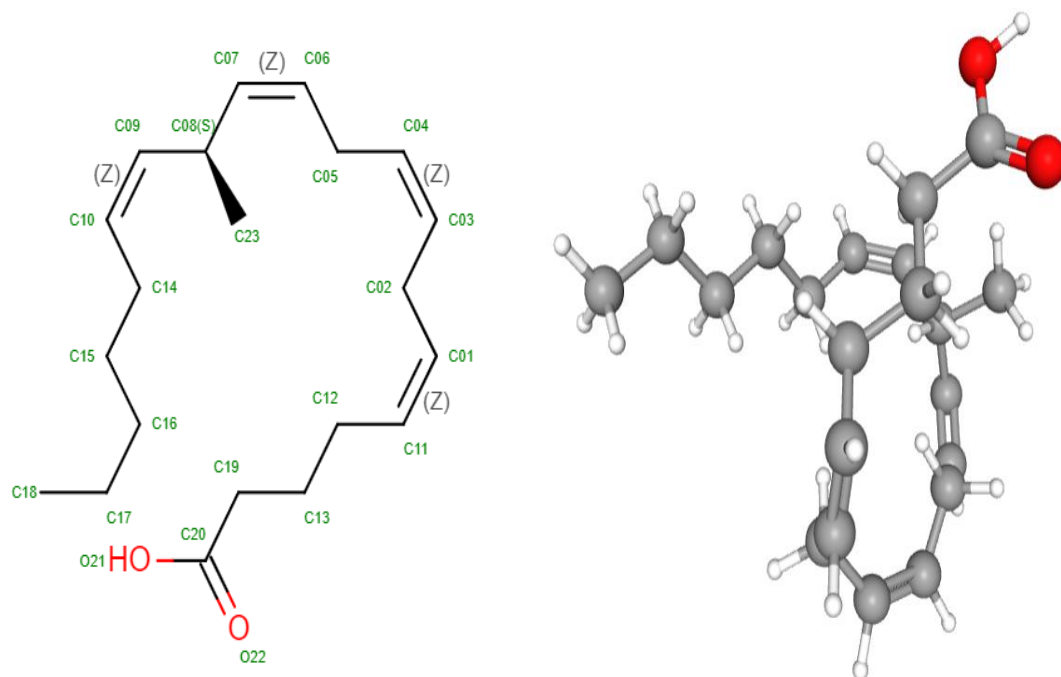


Figure V.4. Structure 2D et 3D du ligand LM8.

I.3. Conclusion

A la lumière de résultat de test de corrélation linéaire et l'analyse visuelle, on conclue que le logiciel Surflex-dock est fonctionné correctement, et peut être utilisé sans trop de risque d'erreurs pour générer par simulation informatique de nouveaux inhibiteurs de notre cible enzymatique la COX-2.

II. Etude des interactions intervenant dans l'inhibition de la COX-2 par diverses molécules provenant de la PDB

Dans le but de trouver de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme COX-2, nous avons appliqué la technique du docking moléculaire par le logiciel Surflex-dock afin de modéliser le mode d'interaction des inhibiteurs qu'on retrouve au niveau de la PDB avec notre cible protéique d'une part, et l'évaluation de l'affinité de complexes obtenus d'autre part.

II.1. Choix du complexe 4PH9

La structure de l'enzyme cyclooxygénase-2, objet de notre étude, provient de la PDB qui représente la principale source des complexe protéine-ligand sous forme de complexes cristallographiques 3D. Parmi les nombreux complexes de notre cible enzymatique nous avons

choisi celui portant le code 4PH9 car elle constitue un compromis entre une bonne résolution (1.81 Å) et la présence d'un inhibiteur dans le site actif. Les caractéristiques de cette enzyme sont regroupées dans le tableau V.4 ci-dessous.

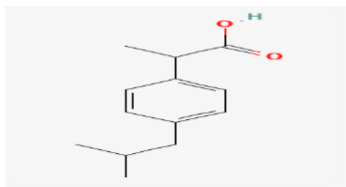
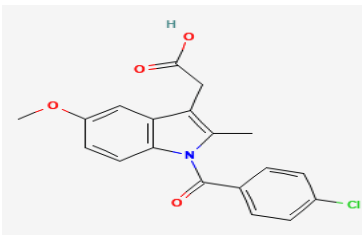
Tableau V.4. Les caractéristiques de l'enzyme 4PH9 [149].

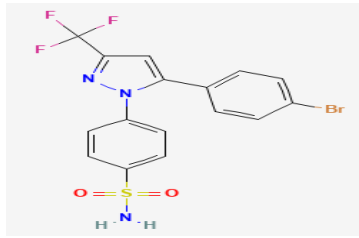
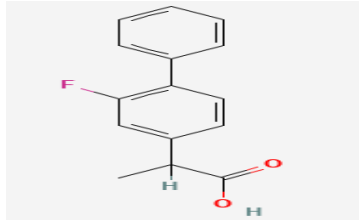
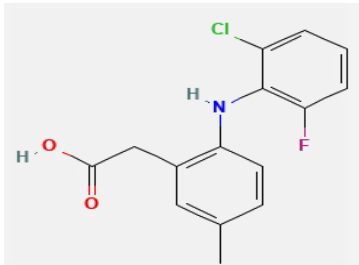
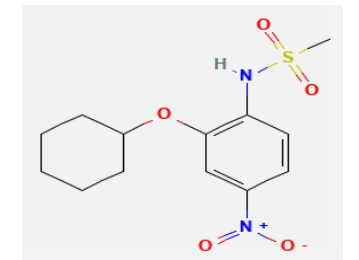
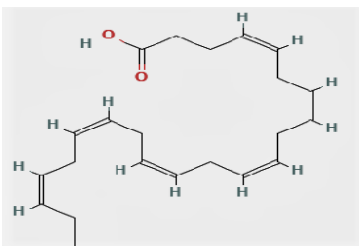
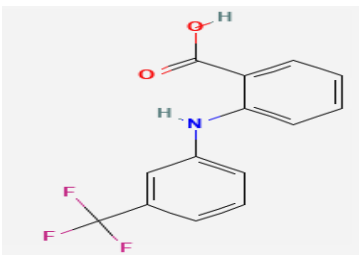
Code	Code de l'inhibiteur	Résolution (Å)	Classification	Nombre de chaîne	Nombre d'AA par chaîne	Nombre d'atome par chaîne
4ph9	IBP	1.81	Oxydoréductase	A.B	583	4516

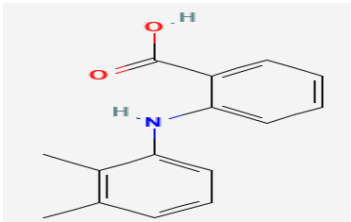
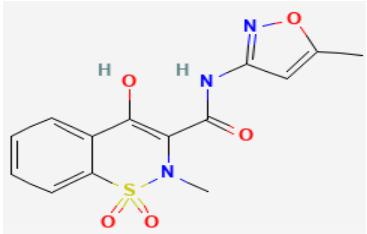
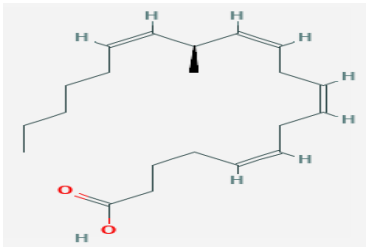
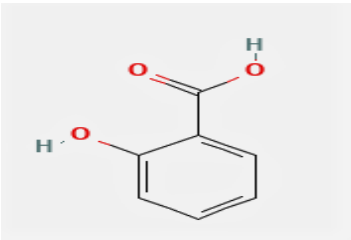
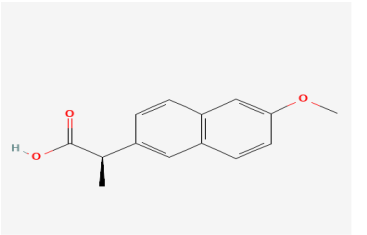
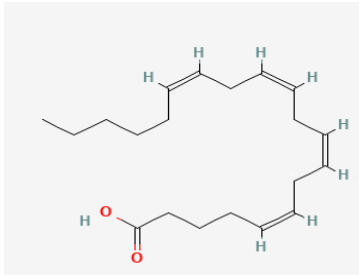
II.2. Interaction 4PH9-inhibiteurs

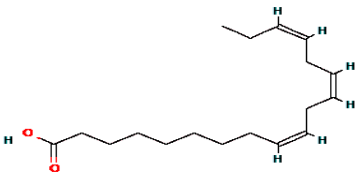
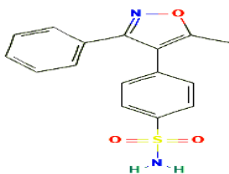
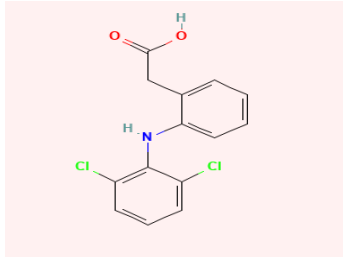
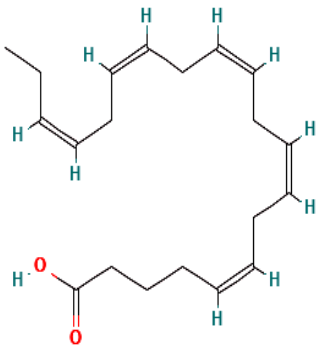
Le docking de 19 molécules téléchargées à partir de la banque PDB avec le format .mol2 portant des codes différents est effectué sur la structure cristallographique 4PH9. Les structures, les noms ainsi que les résultats du docking par Surflex-dock de ces inhibiteurs sont représentés dans le tableau V.5 suivant.

Tableau V.5. Les valeurs d'affinité des complexes 4PH9-inhibiteur.

Code de l'inhibiteur	Nom d'inhibiteur	Affinité (M ⁻¹)	Structure
IBP	2-(4 isobutylphenyl)propionic acid	4.55	
IMN	2-[1-(4-chlorophenyl)carbonyl-5-methoxy-2-methyl-indol-3-yl]ethanoic acid]	2.35	

G_S58	1-phenylsulfonamide-3-trifluoromethyl-5-parabromophenylpyrazole	3.77	
FLP	[(2S)-2-(3-fluoro-4-phenylphenyl)propanoic acid]	5.96	
LUR	{ 2-[(2-chloro-6-fluorophenyl)amino]-5-methylphenyl}acetic acid }	2.61	
NS4	N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methanesulfonamide	2.69	
HXA	docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoic acid	4.38	
FLF	2-[[3-(trifluoromethyl)phenyl]amino] benzoic acid	4.17	

ID8	2-[(2,3-dimethylphenyl)amino]benzoic acid	3.94	
ICD	4-hydroxy-2-methyl-N-(5-methyl-1,2-oxazol-3-yl)-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide	4.03	
LM8	(5Z,8Z,11Z,13S,14Z)-13-methylicos-5,8,11,14-tetraenoic acid	4.79	
SAL	2-HYDROXYBENZOIC ACID	3.79	
NPX	(2R)-2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)propanoic acid	4.73	
ACD	(5Z, 8Z,11Z,14Z)-icosa-5, 8,11,14-tetraenoic acid	3.99	

LNL	(9Z)-octadeca-9,12,15-trienoic acid	3.52	
COX	4-(5-methyl-3-phenyl-1,2-oxazol-4-yl)benzenesulfonamide	2.26	
DIF	2-[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]ethanoic acid	2.20	
EPA	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-icosa-5,8,11,14,17-pentaenoic acid	3.51	

Parmi les complexes 4PH9-inhibiteur qui figurent dans le tableau V.5, nous avons retenu le meilleur résultat uniquement. C'est-à-dire ce qui présente une activité inhibitrice non négligeable sur l'enzyme COX-2. Le composé FLP porte le nom [(2S)-2-(3-fluoro-4-phenyl-phenyl) propanoic acid] avec un score de docking égale à 5.96 M⁻¹ présente comme l'inhibiteur le plus puissant de notre cible COX-2.

Pour cette raison, nous avons choisis ce composé comme modèle afin d'interpréter leurs différents interactions établies avec l'enzyme cyclooxygenase-2.

II.3. Notion du site actif

Les enzymes sont en général des protéines globulaires possèdent une région particulière reconnue par le ligand spécifique de la protéine s'appelle le site actif [150]. Le site actif apparaît alors sous la forme d'une petite cavité de la protéine enzyme. Cette cavité est définie par des replis de la chaîne polypeptidique de l'enzyme qui rapprochent des acides aminés souvent éloignés le long de la séquence d'acides aminés. Ce repli présente sur la face interne de la cavité (souvent à dominante hydrophobe) des radicaux latéraux d'acides aminés (OH, NH ou NH₂, protons échangeables) dans une disposition caractéristique. Les molécules ou les ligands sur lesquelles agit une enzyme sont définies comme les substrats de la réaction enzymatique [151]. Elles se fixent dans le site actif de l'enzyme en formant des interactions avec la surface de la cavité du site actif. Ces interactions permettent en particulier d'orienter le substrat pour favoriser la réaction. Les groupements fonctionnels de certains des résidus d'acides aminés qui forment la cavité du site actif peuvent alors participer à la réaction. On parle de résidus catalytiques ou de résidus du site actif. Le site actif est subdivisé en deux parties : le site de liaison/fixation/reconnaissance qui reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme et le site catalytique qui permet la réaction transformant le substrat en produit [150].



Figure V.5. Structure 3D de l'enzyme COX-2 avec les acides aminés de site actif, code : 4PH9.

II.4. Les acides aminés du site actif de l'enzyme COX-2

La détermination des acides aminés de site actif de notre cible enzymatique intervenant dans le processus de reconnaissance du ligand est cruciale pour pouvoir réaliser un docking moléculaire. Selon le logiciel *Discovery studio* visualiser les acides aminés du site actif sont :

Leu 93, Met 114, Val 117, Arg 121, Tyr 349, Val 350, Gln 351, Leu 353, Ser 354, Tyr 356, Leu 360, Phe 382, Leu 385, Tyr 386, Trp 388, Phe 519, Met 523, Val 524, Glu 525, Leu 527, Ala 528, Pro 529, Ser 531, Leu 532.

II.5. Analyse visuelle des interactions« 4PH9-FLP»

La construction du complexe 4PH9- FLP par docking moléculaire avec le programme Surflex-dock donne une affinité égale à 5.96 M^{-1} qui s'exprime par la mise en place de deux liaisons hydrogène et neuf interactions hydrophobiques dans le site actif de l'enzyme. En effet :

L'analyse visuelle montre que ce complexe est stabilisé par la formation de deux liaisons hydrogène (figure V.6).

- ❖ La 1^{ère} liaison est formée entre l'hydroxyle de l'inhibiteur FLP et le groupement hydroxyle du résidu Tyr356 (O-H13.....O-H Tyr356) avec une distance de 2,45 Å.
- ❖ La 2^{ème} liaison est formée entre l'hydroxyle de l'inhibiteur FLP et la fonction amine de résidu Arg121 (H-O..... H-N_E Arg121) avec une distance égale à 2,00 Å.

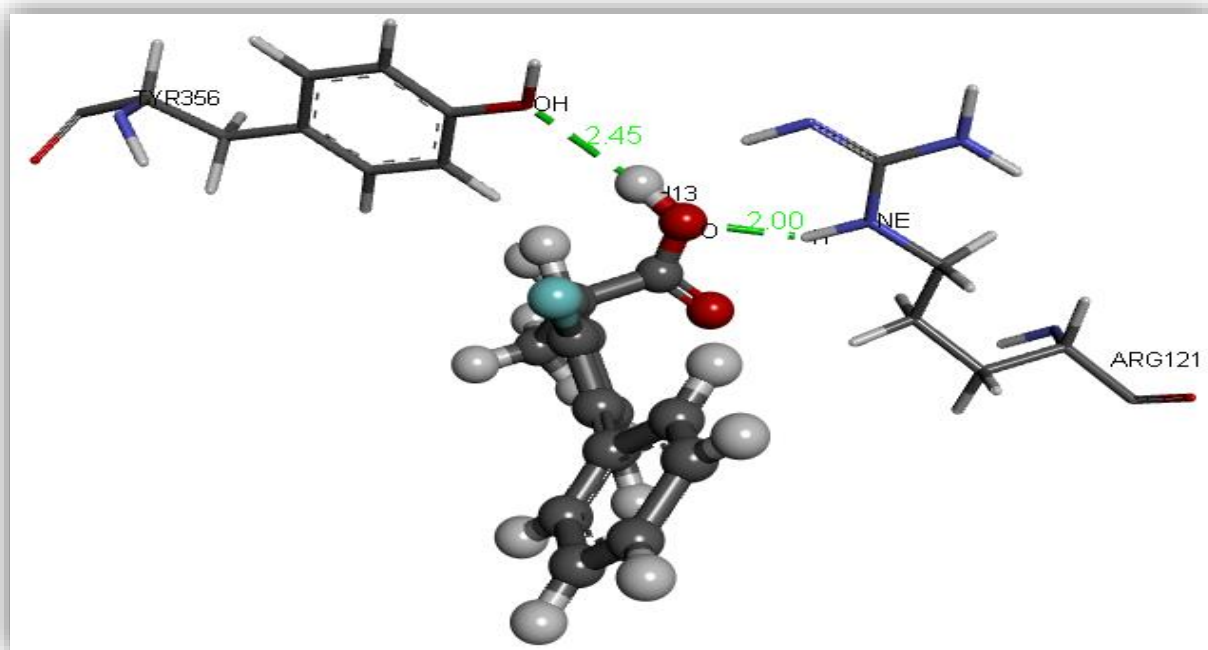


Figure V.6. Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur FLP dans le site actif de la COX-2.

De plus, cet inhibiteur est stabilisé également par plusieurs interactions hydrophobiques. Elles sont réalisées avec les résidus Val 117, Val 350, Tyr 356, Leu 360, Leu 532, Ser 531, Ala 528.

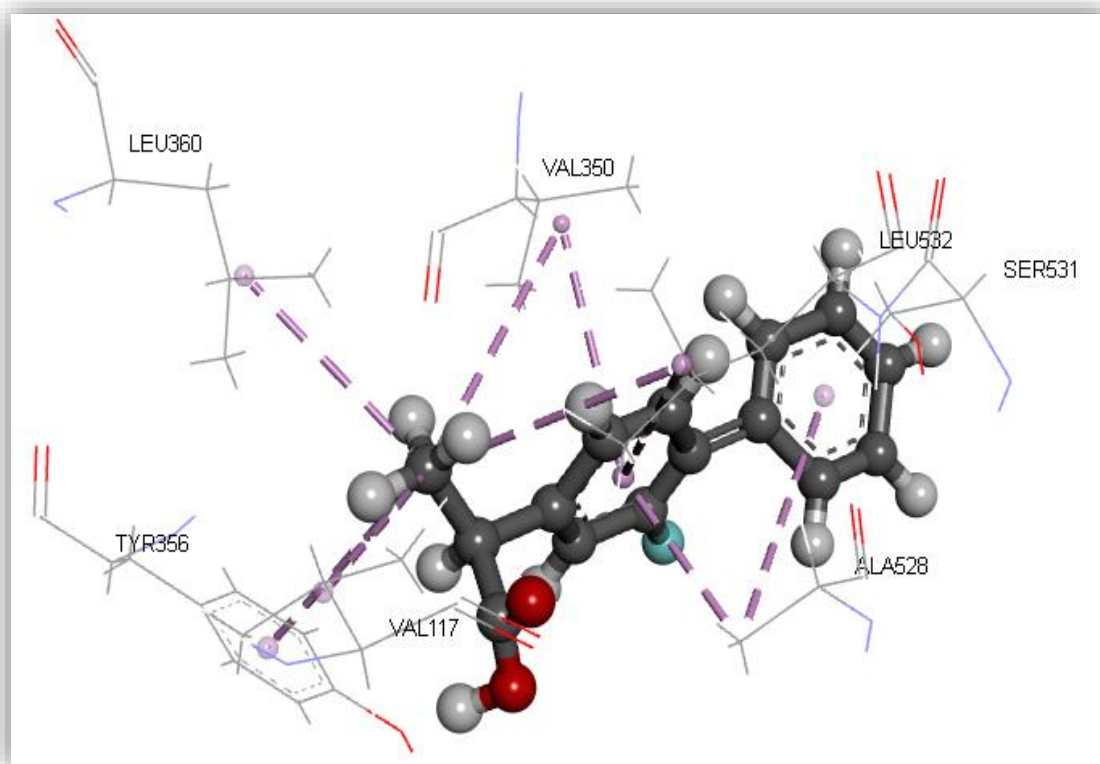


Figure V.7. Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur FLP.

III. Proposition de nouveaux inhibiteurs du COX-2

III.1. Inhibition du COX-2 par les similaires de l'inhibiteur FLP

Afin de trouver de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la COX-2, nous avons réalisés le docking moléculaire d'une collection de 297 similaires de l'inhibiteur FLP avec 95% de similarité. Ces composés chimiques sont téléchargés à partir de la chimiothèque « PubChem ». Les résultats de la simulation par Surflex-dock de ces similaires sont représentés dans le tableau V.6 suivant.

Tableau V.6. Valeurs de l'affinité des similaires de FLP par Surflex-dock.

Code CID	Affinité (M^{-1})	Code CID	Affinité (M^{-1})
CID_3394	6.39	CID_67698931	4.41
CID_15890	0.35	CID_67699516	4.68
CID_22810	6.57	CID_68142451	7.48

CID_72099	7.59	CID_68686475	3.07
CID_92337	6.40	CID_69084103	7.09
CID_3151587	4.05	CID_69114099	3.39
CID_11831237	6.93	CID_69633185	2.76
CID_20496664	6.90	CID_70148147	5.90
CID_40424080	6.23	CID_70486007	5.27
CID_21101	6.98	CID_70699645	6.62
CID_21106	6.91	CID_70699674	5.61
CID_162730	6.41	CID_70699803	6.16
CID_219068	6.63	CID_70699875	6.42
CID_448006	7.54	CID_76967121	7.24
CID_1393660	6.80	CID_76967122	6.35
CID_1393937	6.14	CID_82023339	4.29
CID_3013871	5.36	CID_83696535	5.85
CID_3687814	3.37	CID_89027446	5.96
CID_9972775	3.32	CID_90028720	1.05
CID_10042056	0.13	CID_90167621	5.32
CID_10198728	6.58	CID_90254902	5.35
CID_10657913	7.39	CID_90254904	3.28
CID_11253568	6.52	CID_91172561	6.91
CID_11507608	3.39	CID_91364882	4.86

CID_11777274	6.27	CID_94737999	3.45
CID_13511684	4.34	CID_117682217	6.96
CID_20333459	6.21	CID_117682218	7.33
CID_20559789	6.77	CID_117701472	6.34
CID_21405816	7	CID_117975074	6.12
CID_21406751	6.25	CID_123414117	4.13
CID_21566267	6.48	CID_24256009	2.53
CID_21566291	6.22	CID_124351910	3.37
CID_24814872	7.09	CID_127018551	5.99
CID_40424093	5.96	CID_134951742	5.26
CID_45039292	6.60	CID_140306103	4.66
CID_46312684	7.10	CID_140306106	2.56
CID_46312686	6.19	CID_140306107	2.87
CID_46314799	6.91	CID_140970722	3.58
CID_52936825	6.97	CID_140990806	-1.37
CID_57068015	3.05	CID_140990807	2.61
CID_57089684	4.53	CID_141329356	0.10
CID_57740637	5.71	CID_142022002	6.46
CID_65430022	1.93	CID_144558881	4.49
CID_65431327	4.36	CID_1393927	6.14
CID_66839112	2.66	CID_150778797	5.75

CID_66893375	6.30	CID_150832531	4.09
CID_67074565	5.61	CID_153835135	3.55
CID_67317446	2.05	CID_154224040	5.82
CID_67450670	7.49	CID_154308273	5.72
CID_67698539	4.41	CID_159069434	6.20
CID_24256076	2.97	CID_82023340	2.63
CID_42050515	3.21	CID_82023341	0.40
CID_42050655	2.50	CID_82023342	4.65
CID_42050657	3.49	CID_82023345	2.38
CID_42050669	3	CID_82038931	5.96
CID_42050675	5.15	CID_82039384	6.20
CID_42050677	3.39	CID_82089511	6.11
CID_42073785	4.74	CID_82089512	6.54
CID_42073787	3.99	CID_82093358	5.38
CID_44336320	4.03	CID_82093359	5.13
CID_44336321	5.86	CID_82093360	4.72
CID_45039292	6.60	CID_82093361	3.84
CID_46218270	6.59	CID_82093362	2.56
CID_46312681	7.09	CID_82094757	1.08
CID_46312682	6.81	CID_82140108	-0.54
CID_46312683	6.14	CID_82140151	1.12

CID_46312685	6.48	CID_82140158	0.89
CID_53674906	2.28	CID_82140392	3.03
CID_54331620	6.69	CID_82140393	-0.28
CID_65430209	1.81	CID_82160579	1.48
CID_65430759	4.27	CID_82919383	1.72
CID_71683692	6.23	CID_82919678	1.30
CID_79015322	2.74	CID_82920453	3.70
CID_79015564	4.66	CID_83702854	3.54
CID_79015681	4.07	CID_83702855	5.81
CID_79366343	6.48	CID_83839440	6.48
CID_79434046	1.72	CID_83842211	7.15
CID_79434592	3.69	CID_83950992	2.65
CID_79435011	3.96	CID_83952418	4.35
CID_79435016	1.27	CID_83952426	2.64
CID_79436218	1.01	CID_83952705	3.03
CID_79436545	3.64	CID_83952829	3.25
CID_79436995	1.89	CID_83952838	4.67
CID_79438810	3.24	CID_83953172	1.60
CID_79439172	4.27	CID_83954296	4.43
CID_79439247	3.70	CID_83954902	1.69
CID_79439801	1.53	CID_83955040	0.93

CID_79440250	3.32	CID_83955661	5.15
CID_79440629	3.89	CID_84026164	6.49
CID_79440934	3.94	CID_84182615	6.61
CID_79440938	1.99	CID_84182616	6.69
CID_80694136	5.66	CID_84182617	6.83
CID_81007733	2.86	CID_84666821	6.05
CID_81008059	3.39	CID_84666885	5.69
CID_81008283	3.84	CID_84677710	6.42
CID_81008284	2.30	CID_84677761	5.86
CID_81114010	6.41	CID_84718638	5.46
CID_82023325	0.43	CID_84781252	5.97
CID_82023326	2.23	CID_84781266	3.99
CID_82023327	4.45	CID_84789733	6.10
CID_84799237	5.46	CID_24255978	2.16
CID_84820628	3.82	CID_24255979	4.37
CID_88360021	6.60	CID_24255986	3.78
CID_88360081	6.18	CID_24255999	4.67
CID_88360118	7.57	CID_24256000	3.32
CID_21955825	2.80	CID_24256001	3.42
CID_40387	4.23	CID_24759762	6.93
CID_755479	2.24	CID_26249042	2.16

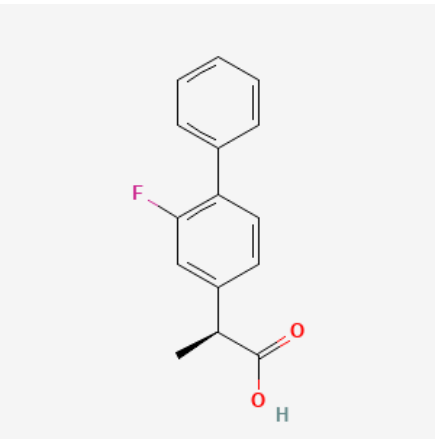
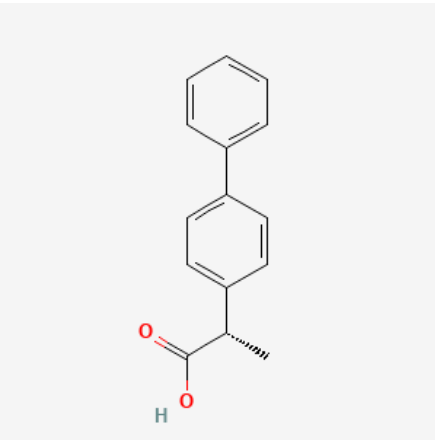
CID_795471	3.87	CID_40418540	3.07
CID_1392312	6.10	CID_82140111	1.76
CID_6992950	3.40	CID_90028720	1.05
CID_6999905	0.32	CID_97455909	5.80
CID_9794824	7.64	CID_97455910	3.82
CID_10014749	7.59	CID_101516461	3.90
CID_10082414	6.58	CID_105404800	1.71
CID_11230781	6.51	CID_105404803	3.15
CID_11658795	2.52	CID_105404807	3.73
CID_11715848	4.64	CID_105404812	3.50
CID_11737087	6.27	CID_107129344	5.99
CID_12264301	6.11	CID_107129347	5.91
CID_19601131	6.41	CID_107129350	5.18
CID_20273701	4.07	CID_107514212	6.24
CID_20302449	6.13	CID_107514216	6.19
CID_21405818	7.12	CID_107514217	6.56
CID_21406809	6.02	CID_107514227	4.87
CID_21454180	6.51	CID_107514691	2
CID_21479673	5.28	CID_110282021	2.66
CID_21523267	6.71	CID_114930821	1.37
CID_21554186	7.37	CID_114930823	2.40

CID_21798820	2.89	CID_114930826	-1.26
CID_21957437	6.90	CID_114930829	1.50
CID_22215040	3.32	CID_117349421	6.65
CID_23358759	2.17	CID_122470832	6.16
CID_23464965	6.70	CID_124303551	5.28
CID_23530560	6.54	CID_124351908	4.14
CID_23530563	6.32	CID_124351909	6.70
CID_24255934	3.01	CID_124351917	3.62
CID_24255949	3.47	CID_124351918	5.41
CID_24255952	1.01	CID_131667431	6.64
CID_24255953	4.13	CID_132568185	6.39
CID_24255954	2.80	CID_134617322	6.64
CID_24255955	5.56	CID_134622732	6.69
CID_24255962	2.58	CID_134658412	6.10
CID_24255973	1.52	CID_139030317	5.75
CID_24255976	4.04	CID_141922917	6.27
CID_24255977	0.32	CID_151930463	4.48
CID_155887510	6.68	CID_160974446	3.75
CID_162623496	3.12	CID_162641548	6.90
CID_162641760	7.59		

III.2. Molécules sélectionnées comme candidats

Parmi les molécules dockées et représentées dans le tableau V.6, les composés portants les codes CID72099 [Acide (2 S)-2-(3-fluoro-4-phénylphényl) propanoïque] et CID448006 [Acide (2 S)-2-(4-phénylphényl) Propanoïque] ont montrés les scores de docking les plus élevés. Ils sont considérés comme les meilleurs inhibiteurs de notre cible enzymatique.

Tableau V.7. Données chimiques et structurales des composés sélectionnés comme candidats.

Code de l'inhibiteur	Structure	Nom chimique	Affinité (M ⁻¹)
CID72099		Acide (2 S)-2-(3-fluoro-4-phénylphényl)propanoïque	7.59
CID448006		Acide(2S)-2-(4-phénylphényl) Propanoïque	7.54

III.3. Prédiction du mode d'interaction des meilleurs composés

La visualisation des différentes interactions ainsi que le positionnement des inhibiteurs au sein du site actif de la COX-2 a été réalisée à l'aide de logiciel Discovery studio visualizer.

III.3.1. Interaction 4PH9-CID72099

Le score de docking calculé par le programme Surflex-dock est traduit par la formation de différentes liaisons (hydrogène et hydrophobique) entre l'enzyme et cet inhibiteur. Le complexe 4PH9-CID72099 est stabilisé par la formation des interactions hydrophobiques entre l'inhibiteur et les acides aminés de site actif suivants : Val350, Leu353, Tyr356, Leu360 et Ala528. Les liaisons de type hydrophobique observées lors de l'interaction sont représentées dans la figure V. 8 ci-dessous.

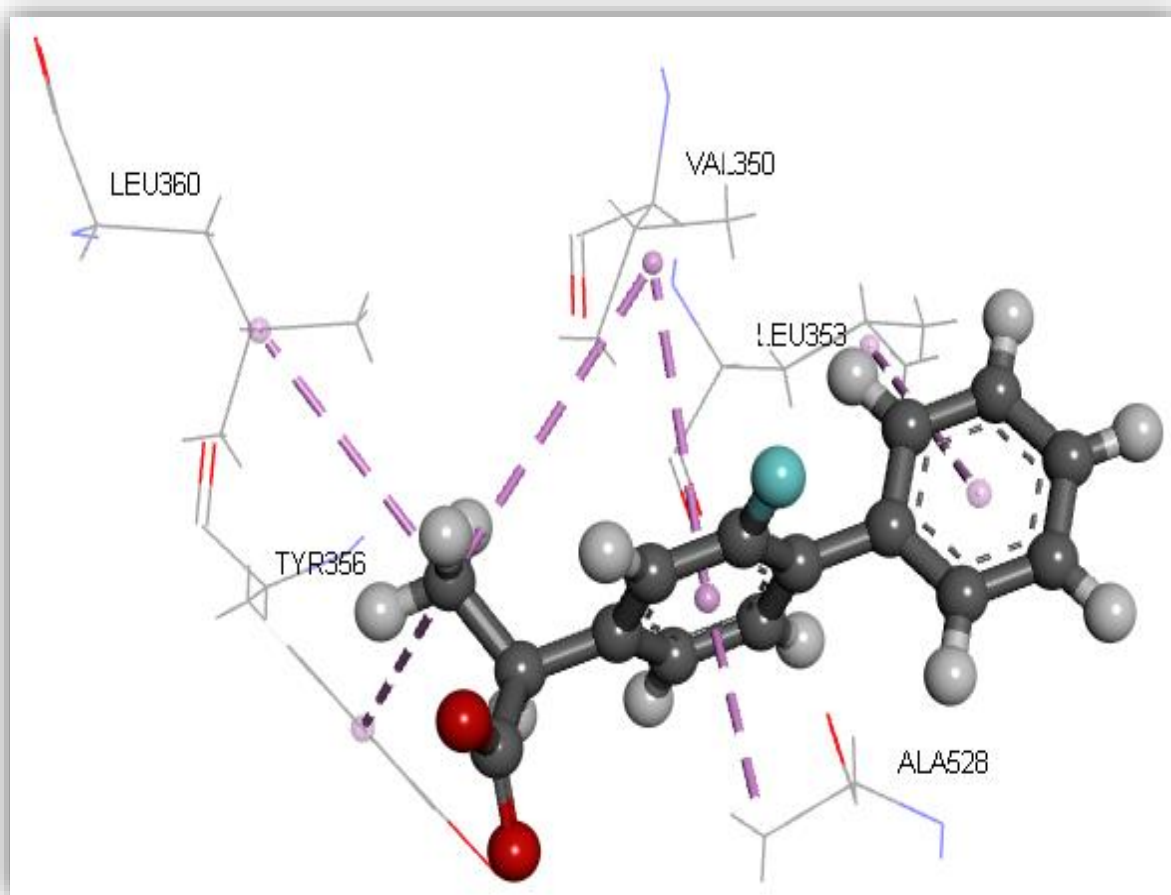


Figure V.8. Représentation des interactions hydrophobiques formées par l'inhibiteur CID72099.

De plus, l'analyse visuelle montre la présence de trois liaisons hydrogène :

- La première liaison est établie entre l'oxygène de l'inhibiteur et l'hydrogène de groupement amine du résidu Arg121 (O.....H-N_{H2}-Arg121) avec une distance 1.98 Å.
- La deuxième liaison est formée entre l'oxygène de l'inhibiteur et l'hydrogène de groupement amine du résidu Arg121 (O.....H-N_{E2}- Arg121) avec une distance égale à 1.93 Å.

- La troisième liaison est formée entre le fluor de l'inhibiteur et l'un des atomes de l'hydrogène du résidu de Ser531 (F.....H-C_B- Ser531) avec une distance 2.32 Å.

Dans la figure V.9 suivante nous avons résumé les paires d'atomes interagissant dans les différentes interactions.

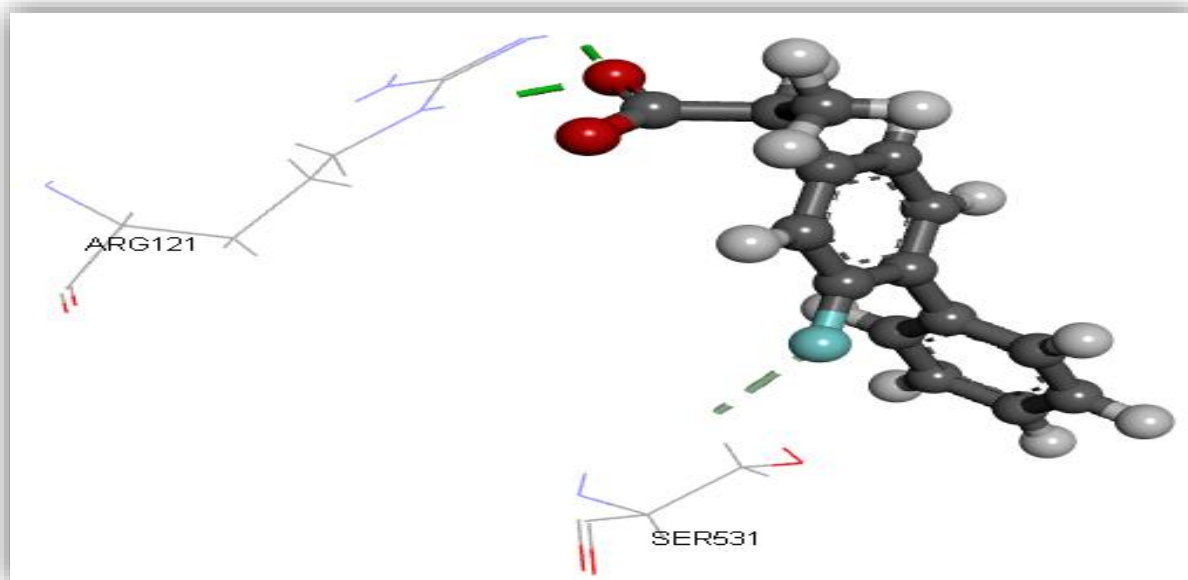


Figure V.9. Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur CID72099.

III.3.2. Interaction 4PH9-CID448006

À la lumière des résultats obtenus, l'inhibiteur dont le code ID est CID448006, donne la meilleure affinité (7.54 M^{-1}), ainsi qu'une bonne pénétration au niveau du site actif. L'analyse visuelle des interactions entre ce composé et l'enzyme COX-2 est représentée dans les figures V.10 et V.11 suivantes. Cet inhibiteur forme deux liaisons hydrogène avec les acides aminés suivants.

- La première liaison est établie entre le carbonyle de l'inhibiteur CID448006 et l'hydrogène de la fonction amine du résidu Arg121 (O.....H-N_E- Arg121) avec une distance égale à 2.04 Å.
- La deuxième liaison est formée entre l'hydroxyle de l'inhibiteur CID448006 et le groupement amine du résidu Arg121 (O.....H-N_{H2}- Arg121) avec une distance de 1.96 Å.

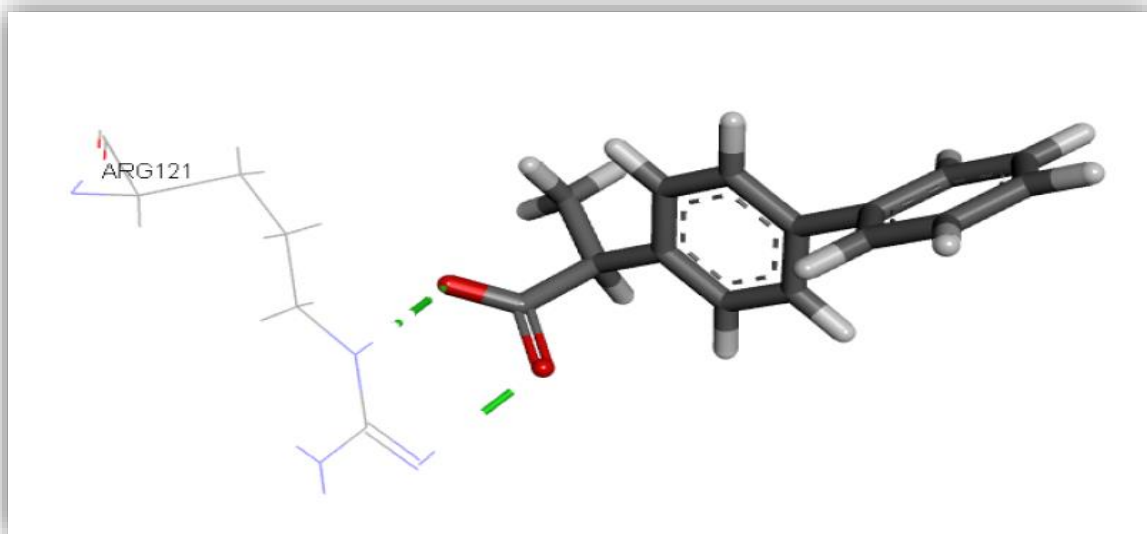


Figure V.10. Représentation des liaisons hydrogène formées par l'inhibiteur CID448006.

De plus, la visualisation des résultats du docking montre que l'inhibiteur CID448006 forme avec le site actif de la 4PH9 plusieurs interactions hydrophobes avec les résidus suivantes Val11, Leu353, Val350, Leu360, Leu532, Ala528. Ces interactions sont représentées dans la figure V.11 ci-dessous :

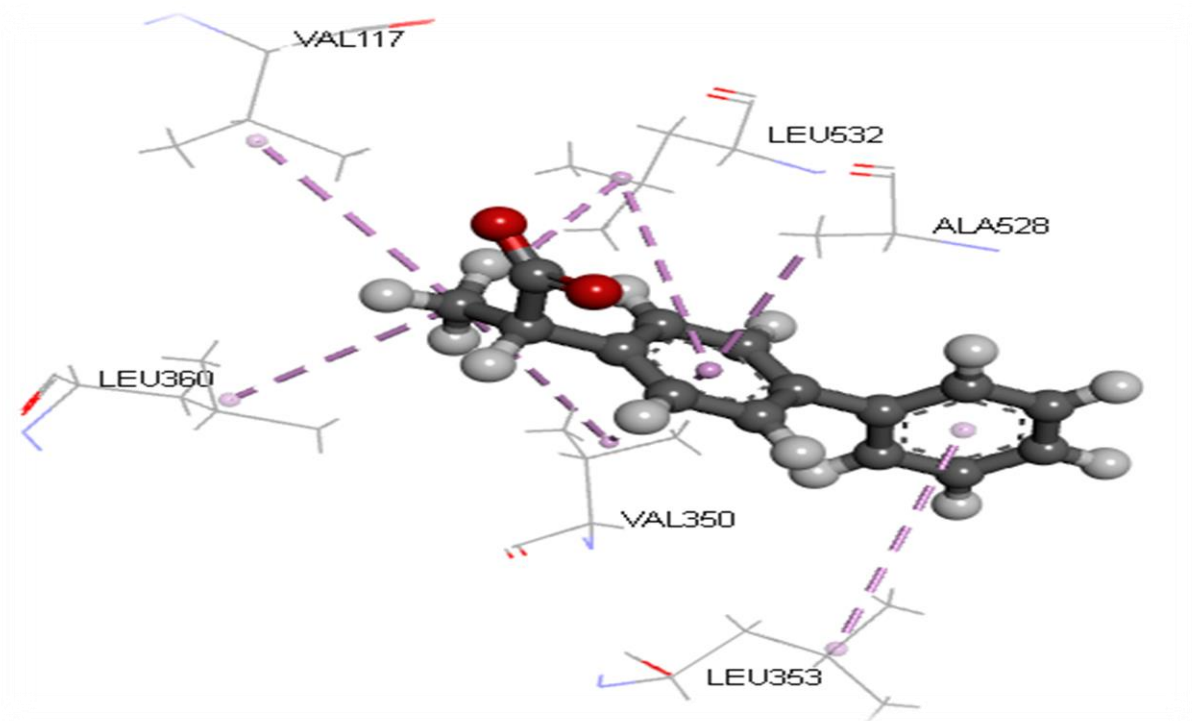


Figure V.11. Représentation des liaisons hydrophobes formées par l'inhibiteur CID448006.

IV. Prédiction de la similarité médicamenteuse

Nous avons jugé utile de compléter notre recherche en déterminant les propriétés ADME-Tox des principales molécules sélectionnées. A ce titre, nous avons utilisé le serveur SwissADME pour prédire *in silico* les propriétés physico-chimiques et pharmacocinétique des meilleurs composés, et le serveur PreADMET pour prédire les propriétés toxicologiques. Ces résultats sont ensuite comparés à ceux de la molécule de référence FLP. Les valeurs des propriétés observées sont montrées dans les tableaux qui suivent

IV.1. Propriétés physico-chimiques

Nous avons prédit les paramètres physico-chimiques des meilleurs inhibiteurs de la COX-2 en utilisant le serveur SwissADME.

Tableau V.8. Critères de la règle de *Lipinski* pour les inhibiteurs à partir de serveurs SwissADME

Code CID Propriété	FLP	CID72099	CID448006
Poids moléculaire (g/mol)	206.28	244.26	226.27
Nombres donneurs de liaison H	1	1	1
Nombre d'accepteurs de liaison H	2	3	2
LogP	2.17	2.19	2.06
Nombre de liaison de rotation	4	3	3
TPSA(Å ²)	37.30	37.30	37.30

Le tableau V.8 montre que les deux inhibiteurs CID72099 et CID448006 comme le FLP répondent favorablement à la règle de *Lipinski* ainsi que celle de *Veber*. Pour la règle de *Lipinski*, les trois composés possèdent un poids moléculaire inférieurs de 500 Da et un coefficient de partage inférieur à 5. Concernant la règle de *Veber*, la surface polaire de ces composés est moins de 140 Å². Ainsi que, un nombre inférieur ou égale à 10 de liaisons de rotation pour les trois inhibiteurs. Donc on peut dire, que les résultats des deux règles nous

permettent de conclure que les deux inhibiteurs proposés possèdent une bonne biodisponibilité orale.

IV.2. Propriétés pharmacocinétiques

Nous avons prédit *in silico* les paramètres pharmacocinétiques afin d'affirmer notre sélection en utilisant le serveur SwissADME.

Tableau V.9. Propriétés pharmacocinétiques des inhibiteurs à partir de serveurs SwissADME.

Code ID Propriété	FLP	CID72099	CID448006
GI absorption	Haute	Haute	Haute
BBB perméabilité	Oui	Oui	Oui
CYP1A2 inhibition	Non	Non	Non
CYP2C19 inhibition	Non	Non	Non
CYP2C9 inhibition	Non	Non	Non
CYP2D6 inhibition	Non	Non	Non
CYP3A4 inhibition	Non	Non	Non

Les résultats de tableau V.9 montrent que l'inhibiteur FLP comme les deux inhibiteurs CID72099 et CID448006 possèdent d'une perméabilité gastro-intestinale élevée, ce qui permet de traverser la barrière gastro-intestinale pour arriver au sang. Par ailleurs, ces composés peuvent traverser facilement la barrière hémato-encéphalique. Concernant l'inhibition des isoenzymes du cytochrome P450 (CYP), nous remarquons que les trois molécules n'inhibent aucun CYP. En effet, la prédiction de cette inhibition est importante pour découvrir les interactions médicamenteuses et éviter leur risque.

IV.3. La toxicité

Dans le but d'examiner la toxicité des inhibiteurs proposés pour notre cible enzymatique. Dans le tableau V.10 ci-dessous nous avons présenté quelques critères déterminés *in silico* en utilisant le serveur PreADMET.

Tableau V.10. Le profil de toxicité des composés étudiés obtenus à partir de serveur PreADMET.

Code ID / Paramètre	FLP	CID72099	CID448006
Carcino_souris	positive	Positive	Négative
Carcino_Rat	Négative	Négative	Négative
Test d'Ames	Mutagène	Mutagène	Mutagène
HERG_inhibition	Risque medium	Risque medium	Risque medium

D'après le tableau V.10 La prédiction de la toxicité montre que :

- Le pouvoir carcinogène des inhibiteurs FLP et CID72099 pour les souris est positif. Par contre, il est négatif pour l'inhibiteur CID448006.
- Le pouvoir carcinogène des trois composés pour les rats est négatif.

- Les trois inhibiteurs étudiés ont un effet mutagène, ayant la capacité de modifier la structure chromosomique et pouvant induire des transformations génétiques et provoquer des mutations sur l'ADN.
- Concernant le test d'inhibition du gène hERG, nous avons remarqué un bon résultat pour les trois inhibiteurs. Il a été démontré que l'inhibition du gène hERG prolonge le potentiel d'action cardiaque.

En fin, les deux inhibiteurs de la COX-2 étudiés répondent favorablement aux critères physicochimiques, pharmacocinétiques et toxicologiques. Ces informations sont très utiles lors de leur optimisation et développement pour devenir des candidats médicaments.



CONCLUSION



CONCLUSION

L'objectif principal de notre travail est la recherche *in silico* par le programme de docking moléculaire Surflex-dock des nouveaux inhibiteurs de la cyclooxygenase-2 cible enzymatique impliqué dans les phénomènes d'inflammation. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé plusieurs étapes.

Dans la première partie de notre travail, nous avons affirmé que Surflex-dock est un programme adapté à notre étude selon deux critères :

- Le coefficient de corrélation linéaire (r) existant entre le score de docking moléculaire calculé par Surflex-dock (Affinité ou Final-0) et l'activité biologique déterminée expérimentalement (IC_{50}) de 71 complexes protéine-ligand téléchargés à partir de la PDB de façon aléatoire. Un coefficient de corrélation d'une valeur de -0.63 a été obtenu.
- L'analyse visuelle réalisée par le programme *discovery studio visualizer* permettant de montrer s'il y a ou pas superposition des ligands simulés par Surflex-dock par rapport au ligand co-cristallisé de la PDB.

Ces deux tests nous permettent de considérer Surflex-dock comme un logiciel de docking moléculaire hautement performant, et peut être utilisé sans trop de risque d'erreurs pour générer par simulation informatique de nouveaux inhibiteurs de notre cible enzymatique la COX-2.

Dans la deuxième partie, nous avons pu élucider les mécanismes d'interaction entre la COX-2 et ses divers inhibiteurs tirés de la PDB par visualisation de différentes liaisons mis en jeu. Les résultats montrent que le composé FLP possède le meilleur effet inhibiteur de l'enzyme COX-2 avec une affinité égale à 5.96 M^{-1} .

Dans la troisième partie, nous avons tenté de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la COX-2. Pour ce faire nous avons réalisés un docking moléculaire de la collection de 297 similaires de l'inhibiteur FLP issus de la chimiothèque PubChem avec 95% de similarité. Cette étude met en évidence les composés suivants : CID72099 et CID448006 comme les meilleurs inhibiteurs pour notre cible enzymatique qui ont une affinité égale à 7.59 M^{-1} pour le premier et 7.54 M^{-1} pour le second.

Afin de valider ces résultats, la dernière étape de notre recherche consiste à vérifier certains critères physicochimiques, pharmacocinétiques et toxicologiques des composés CID72099 et CID448006 grâce aux serveurs SwissADME et PreADMET. L'évaluation de ces différentes propriétés a montré que les deux inhibiteurs proposés possèdent un bon profil ADME-Tox. De

ce fait, on peut dire que les résultats obtenus sont encourageants et très utiles lors de leur optimisation et développement pour devenir des candidats médicaments.

Il conviendrait dans le prolongement de cette étude, de tester l'activité biologique des composés nouvellement proposés par une étude expérimentale *in vitro* et/ou *in vivo* pour confirmer les résultats théoriques réalisés *in silico*.

Références

Bibliographiques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Debillon T., Hoffman P., Cneude F., Andrini P. 2009. Le syndrome de réponse inflammatoire fœtale : définition, causes et conséquences. *Périnatalité*. **1** : 77-81.
- [2] Cyclooxygenases et inflammation. Dossier - Futura Sciences. [En ligne] : <https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-etude-reaction-inflammatoire-partie-2-205/page/3/>. Consulté le : [14/05/2023].
- [3] Hermans C. 2017. Bénéfices, risques et indications des anti-inflammatoires COX-2 sélectifs revisités : focus sur le Célécoxib. *Actualitésthérapeutiques*. **136** (5): 302-309.
- [4] Kitchen D. B., Decornez H., Furr J. R., Bajorath J. 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews/ drug discovery*. **3**: 935-945.
- [5] Gaubert C. 2018. Inflammation : définition, causes, traitements. *SYSTÈME SANGUIN*. [En ligne]. https://www.sciencesetavenir.fr/sante/systeme-sanguin/inflammation-definition-causes-traitements_120001. Consulté le : [21/12/2022].
- [6] Hellal M. Phtalazinones et 2,3-benzodiazépinones dérivées de l'azélastine : Synthèses et activités anti-cytokine. Thèse de Doctorat en Chimie Organique. Université Louis Pasteur Strasbourg I. France. 2007. 324p.
- [7] Prin L., Hachulla E., Hennache B., Bonnotte B., Dubucquoi S., Abbal M., Faure G., Bouletreau P. La réaction inflammatoire. 2009. [en ligne]. <https://www.yumpu.com/fr/document/read/16548796/la-reaction-inflammatoirebibliotheques-de-luniversite-de-lorraine>. Consulté le : [19/ 02/2020].
- [8] Gnemmi V. Réaction inflammatoire – Inflammations. [En ligne]. <https://www.sfpathol.org/564-manuel-3-reaction-inflammatoire-inflammations.html>. Consulté le : [18 /11 / 2022].
- [9] Gaubert C. Inflammation : définition, causes, traitements. https://www.sciencesetavenir.fr/sante/systeme-sanguin/inflammation-definition-causes-traitements_120001. Consulté le : [19/01/2018].
- [10] Fermeaux V., Maubon A. 2004. Inflammation et infection féminine : approche physiologique et anatomo-pathologique. *Journal de Radiologie*. **85** : 1249

- [11] Les étapes de la réaction inflammatoire. [En ligne]. <https://www.soignantenehpad.fr/pages/formation/infirmier-diplome-d-etat/exercices-soins/les-etapes-de-la-reaction-inflammatoire.html>. Consulté le : [19/01/2018].
- [12] La réaction inflammatoire aiguë. [En ligne]. <https://www.maxicours.com/se/cours/la-reaction-inflammatoire-aigue/>. Consulté le : [19/01/2018].
- [13] Matricon J. 2010. Immunopathogénèse des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *médecine/sciences*. **26** : 405-410.
- [14] Guedj J., Piorkowski G., Jacquot F., Madelain V., Nguyen T. H. T., Rodallec A., Gunther S., Carbonnelle C., Mentré F., Raoul H., DeLamballerie X. 2018. Antiviral efficacy of favipiravir against Ebola virus: A translational study in cynomolgus macaques. *PLoS medicine*, **15**(3) : 1-21.
- [15] Chenillot O. CRP, haptoglobine, orosomucoïde: variations biologiques et valeurs de références, relation entre CRP et risque cardiovasculaire. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Henri Poincaré Nancy I. France. 2000. 160p.
- [16] Battu V., Paul A. S. 2014. L'asthme : maladie et diagnostic Asthma:disease and diagnosis. *Actualités Pharmaceutiques*. **53**: 537.
- [17] Damotte D., Terris B. 2017. Inflammation et cancer : une histoire qui dure. *Dossier thématique*. **4** : 147-148.
- [18] Rousselet M.C., Vignaud J.M., Hofman P., Chatelet F.P. 2005. Inflammation et pathologie inflammatoire. [En ligne]. <https://docplayer.fr/8700797-Inflammation-et-pathologie-inflammatoire-chapitre-3-des-phenomenes-generaux-des-phenomenes-locaux.html>. Consulté le : [20/01/2018].
- [19] Alzheimer A. 1907. Übereineigeneartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin*. **64** :146-8.
- [20] Alzheimer A., Stelzmann R.A., Schnitzlein H.N. and Murtagh F.R. 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Übereineigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Clinical anatomy*. **8**: 429-31.
- [21] Carlomagno R., Hentgen V. 2018. Fièvres récurrentes auto-inflammatoires : la bonne démarche diagnostique. *Pédiatrie*. **14** : 378-83.

- [22] Baillet A., Soulard J., Gastaldi R., Baillieul S. 2021. Activité physique au cours des Rhumatismes inflammatoires Physicalactivity and chronic inflammatory rheumatic diseases. *Revue du Rhumatisme Monographies*. **88** : 187-193.
- [23] D. Muster. 2005. Médicaments de l'inflammation Anti-inflammatorydrugs. *EMC - Stomatologie*. **1** : 21-29.
- [24] Shmidt H. Les anti-inflammatoires, ça marche comment. [En ligne]. <https://goodmed.com/fr/blog/anti-inflammatoires>. Consulté le : [01/04/2022].
- [25] Faure S. 2009. Anti-inflammatoires stéroïdiens. *Actualités Pharmaceutiques*. **48**(487) : 51-56.
- [26] Hernandez J. 2020. Médicaments anti-inflammatoires : comment les consommer.futura-sciences. [En ligne]. <https://www.futura-sciences.com/sante/questions-reponses/medecine-medicaments-anti-inflammatoires-consommer-13263/>. Consulté le : [19/01/2018].
- [27] Malaise M. 1996. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Revue Médicale de Liège*. **51**(1) :123-125.
- [28] Vane J. R. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for the aspirinlike drugs. *Nature*. **231** : 232-235.
- [29] Tréchet P., Jouzeau J.Y. 2014. Bases chimiques et pharmacologiques des AINS. *Chemical and pharmacological basics of NSAIDs*. **54** : 212-217.
- [30] Piper P. J., Vane J. R., Wyllie J. H. 1970. Inactivation of Prostaglandins by the Lungs. *Nature*. **225** : 600-604
- [31] Blain H., Jouzeau J. Y., Nette P., Jeandel C. 2000.Les anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase 2.Intérêt et perspectives Non-steroidal anti-inflammatory drugs with selective inhibitory activity on cyclooxygenase 2. Interest and future prospects. *Médecine Interne*. **21** : 978-988.
- [32] Pillon F. 2014. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités Pharmaceutiques*. **53** : 43-46.
- [33] Wirtha H. P., Hürlimannb R., Flückigera T. 2006. Les AINS et les inhibiteurs de la COX-2 : principaux effets indésirables. *Forum Médical Suisse*. **6**:284-290.
- [34] Cuvillon P., Viel É. 2002. Anti-inflammatoires non stéroïdiens anti-COX-2. *Le Courrier de l'algologie*. **1** : 19-23.

- [35] Chandrasekharan N.V., Simmons D.L. 2004. The cyclooxygenases. *Genome Biology*. 5 : 241.
- [36] Mitchell. J. A., Warner T. D. 1999. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *British Journal of Pharmacology*. **128**: 1121-1132.
- [37] Wu G., Kulmacz R.J., Tsai A. 2003. Cyclooxygenase Inactivation Kinetics during Reaction of Prostaglandin H Synthase-1 with Peroxide. *Biochemistry*. **42**: 13772–13777.
- [38] Zarghi A., Arfaei S. 2011. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Pharmaceutical Research*. **10** : 655-683.
- [39] Blobaum A. L., Marnett L. J. 2007. Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Medicinal Chemistry*. **50** : 1425-1441.
- [40] Smith W. L., Malkowski M. G. 2019. Interactions of fatty acids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and coxibs with the catalytic and allosteric subunits of cyclooxygenase-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*. **294** (5) : 1697-1705
- [41] Cyril S. Effets d'inhibiteurs de la cyclooxygénase-2 sur la prolifération et la survie de cellules cancéreuses hématopoïétiques. Thèse de doctorat en Mention Sciences de la Vie et de la Santé. Université Henri Poincaré, Nancy-I. France. 2011. 224p.
- [42] Meric J.B., Rottey S., Olaussen K., Soria J.C., Khayat D., Rixe O., Spano J.P. 2006. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. **59**: 51-64
- [43] Xie W.L., Chipman J.G., Robertson D. L., Erikson R. L., Simmons D. L. 1991. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *National Academy of Sciences*. **88**:2692-2696.
- [44] Botting R. M. 2006. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). *Journal of Thermal Biology*. **31**: 208-219.
- [45] Carol A. R., Lawrence J. M. 2009. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*. **50**: 29-34.
- [46] Minghetti L. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *Neuropathology and Experimental Neurology*. **63**: 901-910.

- [47] Williams C., Maim M., Du Bois R. 1999. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogenes*. **18**: 7908-7916.
- [48] Needleman P., Turk J., Jakschik B. A., Morrison A. R., Lefkowitz J. B. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*. **55**: 69-102.
- [49] Smith W. L. 1992. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol. organic physiology*. **263**: 181-191
- [50] Dhanjal J. K., Sreenidhi A. K., Bafna K., Katiyar S. P., Goyal S., Grover A., Sunda D. 2015. Computational Structure-Based De Novo Design of Hypothetical Inhibitors against the Anti- Inflammatory Target COX-2. *Journals Plos One*. **10** : 1371p.
- [51] Hla T., Bailey D. B. Liu C. H., Schaefer H. J., Trifan O. C. 1998. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Biochemistry and Cell Biology*. **31** : 551-557
- [52] Spencer A. G., Woods J. W., Arakawa T., Singer I. I., Smith W. L. 1998. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**: 9886-93.
- [53] Garavito R. M., Anne M. M. 2003. The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **32**:183-206.
- [54] Smith W. L., Malkowski M. G. 2019. Interactions of fatty acids, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and coxibs with the catalytic and allosteric subunits of cyclooxygenases-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*. **294**(5): 1697-1705.
- [55] Mitchell J. A., Warner T. D. 1999. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *British Journal of Pharmacology*. **128** : 1121-1132.
- [56] Hinz B., Brun K. 2002 Cyclooxygenase-2—10 Years Later. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **300**: 367- 375.
- [57] Minghetti L. 2004. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. **63** : 901- 910.
- [58] Hla T., Bailey D. B. Liu C. H., Schaefer H. J., Trifan O. C. 1998. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Biochemistry and Cell Biology*. **31** : 551-557 .
- [59] Jacquemin C. 2000. Rôles biologiques de la cyclo-oxygénase 2 : contrôle de son expression et de son activité. *Journal de la Société de Biologie*. **194** : 189-193.

- [60] Howardell M. J. 2006. Trends in Cox-2 Inhibitor Research. Nova Science Publishers, Inc.160021: 29p.
- [61] MarnettL. J., Rowlinson S. W., Goodwin D. C., Kalgutkar A. S., Lanzo C. A. 1999. Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2. *Journal of Biological Chemistry*. **274** : 22903-22906.
- [62] Smith W. L., Garavito R., De Witt D. L. 1996. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*. **271** : 33157-33160.
- [63] Walker M. C., Kurumbail R. G., Kiefer J. R., Moreland K. T., Koboldt C. M., Isakson P. C., Seibert K., Gierse J. K. 2001. A three-step kinetic mechanism for selective inhibition of cyclo-oxygenase-2 by diarylheterocyclic inhibitors. *Biochemical Society*. **357** : 709-718.
- [64] Nuhrich A. 2015. Antiinflammatoires non stéroïdiens (AINS). En France. [En ligne]. http://untori2.crihan.fr/unspf/2015_Bordeaux_Nuhrich_AINS/res/AINS_A_Nuhrich_2015.pdf . Consulté le: [31/03/2331].
- [65] Kurumbail R. G., Stevens A. M., Gierse J. K., McDonald J. J., Stegeman R. A., Pak J. Y., Gildehaus D., Miyashiro J. M., Penning T. D., Seibert K., Isakson P. C., et Stallings W. C. 1996. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*. **384** : 644-8.
- [66] Kurumbail R.G., Kiefer J. R., Marnett L. J. 2001. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Current Opinion in Structural Biology*. **11** : 752-760
- [67] Garavito R. M., De Witt D. L. 1999. The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1441**: 278-287.
- [68] Garg R., Kurup A., Mekapati S. B., Hansch C. 2003. Cyclooxygenase (COX) inhibitors: a comparative QSAR study. *Chemical Reviews*. **103** :703-732.
- [69] Jongkon N., Seaho B., Tayana N., Prateeptongkum S., Nongnaphat D., Jaiyong P. 2022. Computational Analysis and Biological Activities of Oxyresveratrol Analogues, the Putative Cyclooxygenase-2 Inhibitors. *Molecules*. **27**: 2346.
- [70] Sobolewski C., Cerella C., Dicato M., Ghibelli L., Diederich M. 2009. The Role of Cyclooxygenase-2 in Cell Proliferation and Cell Death in Human Malignancies. *Journal of CellBiology*. **2010**: 215158.

- [71] Theiler R., Dudler J. 2013. Traitement médicamenteux de la douleur en Suisse, ou quand l'émotion l'emporte sur la raison. *Revue Médicale Suisse*. **9** : 1846-53.
- [72] Garg R., Kurup A., Mekapati S. B., Hansch C. 2003. Cyclooxygenase (COX) inhibitors: a comparative QSAR study. *Chemical Reviews*. **103** : 703-732.
- [73] Gallois C. Rôle clé de la COX-2 dans l'inhibition de la prolifération des cellules étoilées du foie myofibroblastiques humaines. Thèse de doctorat en Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire. Université Pierre et Marie Curie. France. 2020. 107p.
- [74] Jouzeau J.Y., Daouphars M., Benani A., Netter P. 2004. Pharmacologie et classification des inhibiteurs de la cyclooxygénase. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. **28** : 7-17.
- [75] Beziere N. Optimisation du concept d'inhibition de Cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate. Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique. Université de Lille 2. France. 2008. 229p.
- [76] Brunelle M. Expression et régulation de la cyclooxygénase-2 dans les cellules mammaires canines normales et néoplasiques in vitro. Pathologie et microbiologie. Université de Montréal. Canada. 2003. 89p.
- [77] Jacquemin C. 2000. Rôles biologiques de la cyclo-oxygénase 2 : contrôle de son expression et de son activité. *Pharmacologie Cellulaire*. **194** : 189-193.
- [78] Beautrait A. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel. Thèse de Doctorat en Chimie informatique et théorique. Université de Nancy. France. 2008. 122p.
- [79] Agarwal S., Mehrotra R. 2016. An overview of Molecular Docking. *JSM Chemistry*. **4**(2): 1024.
- [80] Sethi A., Joshi K. H., Sasikala K., Alvala M. 2019. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. *Drug Discovery and Development – New advances*. 1-22.
- [81] Ferreira L. G., Dos Santos R. N., Oliva G., Andricopulo A. D. 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. **20** :13385-13421.
- [82] Lengauer T., Rareyt M. 1996. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*. **6** (3):402-406.
- [83] Warren G., Andrews C.W., Capelli A.M., Clarke B. 2006. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *Journal of Medicinal Chemistry*. **49**:5912-5931.

- [84] A. Grosdidier. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse pour l'obtention de docteur en pharmacie. Université Joseph Fourier. France. 2007. 92p.
- [85] Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Hioual K. S., El Mokrani H. 2013. L'amarrage moléculaire : une nouvelle approche pour lutter contre le développement de la tuberculose. *Microbiology*. **7** : 133-149.
- [86] Meng X. Y., Zhang H. X., Mezei M., Cui M. 2011. Amarrage moléculaire : une approche puissante pour la découverte de médicaments basée sur la structure. *Courant Calcul Des médicaments aidés*. **7** : 146-157.
- [87] Schulz-Gasch T., Stahl M. 2004. Scoring Functions for Protein-ligand Interactions : A Critical Perspective. *Drug Discovery Today: Technologies*. **1**(3) : 231-239.
- [88] Wang R., Lu Y., Fang X et Wang S. 2004. An Extensive Test of 14 Scoring Functions Using the PDBbind Refined Set of 800 Protein-ligand Complexes. *The Journal for Chemical Information and Computer scientists*. **44**(6) : 2114-2125.
- [89] Boucherit H. Recherche in silico de nouveaux composés bioactifs et applications à l'inhibition de la méthionine aminopeptidase. Thèse de doctorat en biochimie appliquée. Université Frères Mentouri Constantine 1. Algérie. 2020. 116p.
- [90] De Oliveira E. B. Simulation moléculaire appliquée à l'acétylation de flavonoïdes catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la régiosélectivité de la bioconversion. Thèse de doctorat. Université de Lorraine. France. 2009. 207p.
- [91] Tu M., Cheng S., Lu W., Du M. 2018. Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **105** : 7-17.
- [92] Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de l'alpha-glucosidase. [En ligne] : www.fac.umc.edu.dz pdf. Consulté le : [11/03/2022].
- [93] Bessadok A. La multiplicité de transport de la P-glycoprotéine : Etudes de modélisation comparative et de docking au sein de la famille des protéines ABC. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie. France. 2011. 188p.
- [94] Récepteur : qu'est-ce que c'est ? [En ligne]. <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-recepteur-243/>. Consulté le : [07/06/2022].

- [95] Shibata D., Slusarenko A., Casey R., Hildebrand D., Bell E. 1994. Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter*. **12** .41p.
- [96] Monge A. 2006. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat en Chimie Informatique et Théorique. Université d'Orléans. France. 154p.
- [97] Mokrani E. H. 2012. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Mémoire de magister en Biochimie. Université Mentouri Constantine. Algérie. 121p.
- [98] Leach A. R. 2001. Molecular Modelling: Principles and applications. Baton Rouge Library. 744p.
- [99] Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de l'alpha-glucosidase. [En ligne] : www.fac.umc.edu.dz/pdf. Consulté le : [11/03/2022].
- [100] Les interactions intermoléculaires [En ligne]. https://moodle1.u-bordeaux.fr/pluginfile.php/665811/mod_folder/content/0/CH08-Interactions_intermoléculaires.pdf?forcedownload=1. Consulté le : [11/03/2022].
- [101] Hoffer L. Développement et validation du logiciel S4MPLE : application au dockingmoléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du fragment-baseddrug design. Thèse de doctorat en Chimie. Université de Strasbourg. France. 2013 165p.
- [102] Atkins, Peter et Julio de Paula. Physico-chimie pour les sciences du vivant. Oxford, Royaume-Uni : Oxford UniversityPress. 2006. 95.
- [103] Physique et chimie. 2021. Interactions, champs électrostatiques et gravitationnels. [En ligne]. www.https://webphysique.fr/force-electrique-gravitation-champ. Consulté le [4/06/2022].
- [104] Onodera K., Satou K., Hirota H. 2007. Evaluations of molecular docking programs for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*. **47** (4): 1609-16187.
- [105] Meng X.Y., Zhang H.X., Mezei M., Cui M. 2012. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*. **7**(2): 146-157.

- [106] Taylor R. D., Jewsbury P. J., Essex J. W. 2003. FDS: Flexible Ligand and Receptor Docking with a Continuum Solvent Model and Soft-Core Energy Function. *The Journal of Computational Chemistry*. **24** (13): 1637-1656.
- [107] Carlson H. A. 2002. Protein flexibility is an important component of structure-based drug discovery. *Current Pharmaceutical Design*. **8**: 1571-1578.
- [108] Bouchagra S. Modélisation des interactions protéine-petites molécules : étude de la relation structure – fonction dans le cas des lipases. Thèse de doctorat en chimie organique et bioorganique. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie. 2018. 145p.
- [109] Morris G. M., Lim-Wilby M. 2008. Molecular docking. *Molecular modeling of proteins*. **443**: 365-382
- [110] Feher M. 2006. Consensus scoring for protein–ligand interactions. *Drug discovery today*. **11**: 421-428.
- [111] Heberlé G., De Azevedo W. F. 2011. Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations. *Current medicinal chemistry*. **18**(9): 1339-1352.
- [112] Jain A. N. 2003. Surflex: Fully Automatic Flexible Molecular Docking Using a Molecular Similarity-Based Search Engine. *Journal of medicinal chemistry*. **46**(4): 499–511.
- [113] Zhang M., White R. A., Wang L., Goldman R., Kaviraki L., Hassett B. 2005. Improving conformational searches by geometric screening. *Journal of Bioinformatics*. **21**: 624-630.
- [114] Sethi A., Joshi K. H., Sasikala K., Alvala M. 2019. Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications. *Drug Discovery and Development-New advances*.1-22.
- [115] Chuan J. Ranganathan T.S. 2013. Scientific publications and databases. *Computer-Aided Vaccine Design*. **10** : 21-46.
- [116] Faezov B., Dunbrack R. L. 2021. PDBrenum: A webserver and program providing Protein Data Bank files renumbered according to their UniProt sequences. *PLOS ONE*. **16**(7): e0253411.
- [117] Stanzione F., Giangreco I., Cole J. C. 2011. Use of molecular docking computational tools in drug discovery. *Progress in Medicinal Chemistry*. **60** : 273-343.

- [118] Kim S., Thiessen P. L., Bolton E. E., Chen J., Fu G., Gindulyte A., Han L., He J., He S., Shoemaker B. A., Wang J., Yu B., Zhang J et Bryant S. H. 2016. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*. **44**(1): 1202-1213.
- [119] Boucherit H. 2012. Etude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase de *Mycobacterium tuberculosis* par diverses molécules. Mémoire de magistère en biologie cellulaire et moléculaire. Université Mentouri Constantine I. Algérie. 110p.
- [120] BioPharmics. LLC | info@biopharmics.com | [@biopharmics](https://www.biopharmics.com). Consulté le : [28 /05/2021].
- [121] Jay A., Jain N. 2007. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **21**: 281-306.
- [122] Hutchison G. R., Morley C., James C., Swain C., Winter H. D., Vandermeersch T. 2011. Open Babel Documentation. [En ligne]. <http://openbabel.sourceforge.net>. Consulté le : [18/05/2022].
- [123] Introduction to the Discovery Studio Visualizer. [En ligne]. http://www.adrianomartinelli.it/Fondamenti/Tutorial_0.pdf. Consulté le : [01/05/2023].
- [124] SwissADME. (<http://www.swissadme.ch>). Consulté le : [10 /05/2023].
- [125] PreADMET. (<https://preadmet.bmdrc.kr/>). Consulté le : [10 /05/2023].
- [126] Fox W. 1999. Statistiques Sociales. 3ème édition. France. 374p.
- [127] Kirchmair J., Markt P., Distinto S., Wolber G., Langer T. 2008. Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD. *Journal of Computer Aided Molecular Design*. **22**:213-228.
- [128] Lipinski's rule of five. [En ligne]. <https://dev.drugbank.com/guides/terms/lipinski-s-rule-of-five>. Consulté le : [18/05/2023].
- [129] Boucherit H, Chikhi A, Bensegueni A, Merzoug A, Hioual K .S et Mokrani E. 2013. L'amarrage moléculaire : une nouvelle approche pour lutter contre le développement de la tuberculose. *Revue de Microbiologie Industrielle Sanitaire et Environnementale*. **7** (2) :133-149.

- [130] Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W et Feeney P. J. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **46**: 3-26.
- [131] Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K.W., Kopple K. D. 2002. *Journal of Medicinal Chemistry*. **45**: 2615-2623.
- [132] Kola I., Landis J. 2004. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov*. **3**(8) : 711-715.
- [133] Rizk A. A., Plitman E., Senthil P., Venkatraghavan L and Chowdhury T. 2022. Effects of Anesthetic Agents on Blood Brain Barrier Integrity: A Systematic Review. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. **First View** : 1-8.
- [134] Allam L. 2020. Conception et évaluation des molécules anticancéreuses par approches in silico inhibiteurs des kinases AKT1 et LMTK3. Thèse de doctorat en biotechnologie et biologie moléculaire. Université Mohammed V. Rabat. Maroc. 202p.
- [135] Lynch T., Price A. 2007. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American Family Physician American*. **76**: 391-396.
- [136] Michaud V., Turgeon M. J. 2002. Les cytochromes P450 et leur rôle clinique. *Le Médecin du Québec*. **37** (8) : 1-12.
- [137] Etame L. G., Yinyang J., OkallaEbongue C., Makondo B.V., Ngaba G.P., Mpondo E., Dibong S. D. 2017. Étude de la toxicité aigüe et subaigüe de l'extrait au vin des graines de Caricapapaya Linn. *Journal of Applied Biosciences*. **120**: 12077-12085.
- [138] Rognan D. 2014. Méthodes de criblage in silico de chimiothèques. [En ligne]. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharma-th15/chimie-pharmaceutique-42609210/methodes-de-criblage-in-silico-de-chimiotheques-pha1020/>.
- [139] Maron D and Ames B.N. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research*. **113** : 173-215.
- [140] De Méo M., Laget M., Di Giorgio C., Guiraud H., Botta A., Castegnaro M and Duménil D. 1996. Optimization of the salmonella/mammalian microsome assay for urine mutagenesis by experimental designs. *Mutation Research*. **340**: 51-65.

- [141] Aryal S. 2022. Ames Test – Introduction, Principle, Procedure, Uses and Result Interpretation. [En ligne]. <https://microbiologyinfo.com/ames-test/>. Consulté le : [01/06/2022].
- [142] Thibaut B. 2016. Approche toxicologique lors du développement d'un médicament radiopharmaceutique, application à une étude préclinique d'un nouveau traceur de la plaque d'athérome vulnérable. Thèse de doctorat en Sciences pharmaceutiques. Grenoble. France. 129p.
- [143] Sanguinetti M. C., Jiang C., Curran M.E., Keating M.T. 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I_{Kr} potassium channel. *Cell*. **81**: 299-307
- [144] Smith G. A. M., Tsui H. W., Newell E. W., Jiang X., Zhu X. P., Tsui F. W. L., Schlichter L. S. 2002. Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(21):18528-34
- [145] Bensegueni A. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de doctorat en Biochimie appliquée. Université Mentouri Constantine I. Algérie. 2007. 76p.
- [146] Boucherit H. étude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase de Mycobacterium tuberculosis par diverses molécules. Mémoire de magistère en Biochimie. Université Mentouri Constantine 1. Algérie. 2012. 110p.
- [147] Boucherit H., Chikhi A., Bensegueni A., Merzoug A., Hioual K. S., Mokrani E. H. 2014. Theoretical study of the interactions involved in the inhibition of Mycobacterium tuberculosis methionine aminopeptidase by several molecules. *Computational Biology and Bioinformatics*. **2**: 63-73.
- [148] Jocley Q. A., Josélia A. L., Angelo . P., Ricardo B. A., Magaly G. A. 2011. Docking of the alkaloid geissospermine into acetylcholinesterase: a natural scaffold targeting the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Modeling*. **17**: 1401-1412.
- [149] Orlando B. J., Lucido M. J., Malkowski M. G. 2015. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *Journal of Structural Biology*. **189** : 62-66.
- [150] Enzyme. [En ligne]. <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Enzyme.html>. Consulté le : [13/05/2023].
- [151] Anonyme : Site actif : définition, explications. [En ligne].

<https://www.aquaportail.com/definition-12380-site-actif.html>. Consulté le : [13/05/2023].

Présentée par :

Date de Soutenance : 22 /06/2023

KHENIOUI Aya

BENDALI HOUSSINE Zeyneb

CHAKROUD Chaima

Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de Master

Thème : Étude *in silico* des interactions de nouveaux inhibiteurs sur la Cyclooxygénase, cible enzymatique impliquée dans les phénomènes d'inflammation

Résumé

De nos jours, les méthodes *in silico* sont de plus en plus employées dans les stratégies de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Au cours de cette recherche, nous nous sommes appuyés sur le traitement de maladies inflammatoires basé sur l'inhibition de la cyclooxygénase-2, une enzyme importante qui est impliquée dans la production de prostaglandines, des substances qui jouent un rôle clé dans l'inflammation.

L'objectif principal de notre travail, consiste à étudier au moyen du docking moléculaire par le programme Surflex-dock, les modes de liaison d'une série de petites molécules chimiques sur la cible COX-2 et, ensuite à proposer des nouveaux inhibiteurs potentiels pour cette cible.

Le logiciel Surflex-dock est hautement performant, avec un bon coefficient de corrélation linéaire ($r = -0,63$) entre l'affinité et l'activité biologique IC_{50} . On peut donc, utiliser ce programme sans trop de risque d'erreurs pour générer par simulation informatique de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme COX-2. L'évaluation de l'affinité des inhibiteurs issus de la PDB a permis de dégager celles présentant le meilleur effet inhibiteur. Il s'agit de composé FLP dont le score de docking est égale à 5.96 M^{-1} . Le docking moléculaire par Surflex-dock d'une collection de 297 similaires de l'inhibiteur FLP issus de la chimiothèque PubChem avec 95% de similarité, fait ressortir les composés CID72099 et CID448006 comme meilleurs inhibiteurs de la COX-2 qui ont des affinités égale à 7.59 M^{-1} pour le premier et 7.54 M^{-1} pour le second.

Afin de valider ces résultats, la prédiction *in silico* de la similarité médicamenteuse nous informe de manière positive sur les propriétés ADME-Tox des inhibiteurs proposés.

Mot clés : Cyclooxygénase-2, l'inflammation, docking moléculaire, Surflex-dock, filtrage ADME-Tox

Devant le jury :

Présidente : BENDJADDOU Mouna

M.C.B Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Promotrice : BOUCHERIT Hanane

M.C.B Centre.Univ.A.Boussouf - Mila

Examinatrice : MERZOUG Amina

M.C.A Centre.Univ.A.Boussouf - Mila