

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

Université 8 mai 1945 Guelma

Faculté des Mathématiques et de l'Informatique et des Sciences de la Matière

Département des Sciences de la Matière

Mémoire de fin d'études

Master



Spécialité : Chimie Physique

Présenté par : ZERARI Abdelheq

**Etude in Silico de l'inhibition enzymatique par des
molécules bioactives**

Sous la Direction de :

Dr. LACHI Nadia

Juin 2022

Remerciements

Premièrement, je veux remercier notre Dieu de m'avoir donné la force de faire ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie Computationnelle et Nanostructures (LCCN), Faculté des Sciences Mathématiques et des Sciences de la matière Université 8 Mai 1945 Guelma.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon encadrant, M^{me} LACHI Nadia, qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce mémoire, pour ses commentaires, ses conseils avisés, et sa grande miséricorde et de m'avoir guidé au mieux dans ce travail.

Je remercie M^{me} DJEMIL pour son aide.

Mes sincères remerciements et considérations sont exprimés aux membres du jury.

Je tiens à remercier tous les enseignants du Département de science de la matière pour la richesse et la qualité de leurs enseignements et leurs efforts pour offrir aux étudiants une formation actualisée.

Je remercie tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail et tous ceux qui m'ont apporté leur soutien et encouragements.

DEDICACE

Je Dédie Ce Travail A :

*Ma Mère Houriya , Ma Raison D'être, La Lanterne Qui Eclaire Mon
Chemin Et M'illumine D'affection Et D'amour,*

*Mon Père ammar, En Signe D'amour Et De Gratitude Pour Tous Les
Soutiens Et Les Sacrifices Dont Il A Fait Preuve A Mon Egard,*

Ma Chère Tante Medjeldi Fatiha,

Mes Frères Sohaïbe Et Abdelrahim,

Ma Sœur Asma,

Tous Mes Proches Et Mes Amis,

*Mon Encadreur, M^{ne} Lachi Nadia En Vous Souhaitant Un Avenir
Eclatant Et Plein De Bonnes Promesses,*

*A Tous Les Gens Qui Ont Cru En Moi Et Qui Me Donnent L'envie
D'aller En Avant, Vos Encouragements Et Votre Soutien Me Donnent
La Force De Continuer.*

Abdalheq

Résumé

L'activité inhibitrice sur la COX-2, de flavonoïdes appartenant à la catégorie des flavanones, flavones, flavonols et dont la structure comporte des fonctions hydroxyles, a été modélisée par des méthodes in silico. Ces flavonoïdes se lient avec les acides aminés du site actif de la COX-2, via des interactions hydrogène et hydrophobe, et de manière comparable aux inhibiteurs synthétiques de cette enzyme.

Mots clé : flavonoides, COX-2, docking moléculaire, inhibition.

Abstract

The COX-2 inhibitory activity of flavonoids belonging to the class of flavanones, flavones, flavonols and having hydroxyl functions in their structure has been modeled by in silico methods. These flavonoids bind with amino acids of the COX-2 active site, via hydrogen and hydrophobic interactions, and in a manner comparable to synthetic inhibitors of this enzyme.

Key words: flavonoids, COX-2, molecular docking, inhibition.

Liste des Figures

<i>N°</i>	<i>Intitulé</i>	<i>Page</i>
<i>Chapitre I : Docking Moléculaire</i>		
Figure 1	Représentationschématique du Docking.	4
Figure 2	Principe générale d'un programme de docking moléculaire	5
Figure 3	Interactions de Van der Waals.	8
Figure 4	Liaison hydrogène	9
Figure 5	Les interactions électrostatiques.	9
Figure 6	Schéma général du devenir d'un médicament dans l'organisme.	12
<i>Chapitre II : Les Cyclooxygénases</i>		
Figure 1	Formule développée d'acide arachidonique.	16
Figure 2	Structure de la Cyclooxygénase-1.	17
Figure 3	Structure de la Cyclooxygénase-2.	17
Figure 4	Représentation du site actif de la COX-1.	20
Figure 5	Représentation schématique du site actif de la COX-2.	21
<i>Chapitre III : Les flavonoïdes</i>		
Figure 1	Squelette de base des flavonoïdes	25
Figure 2	Structure des flavonoïdes et position des principaux substituants	30

Chapitre IV: Résultats et discussion

Figure 1	Positionnement de la Grid Box dans le site actif.	36
Figure 2	Structure cristallographique de la chaîne A des complexes : a) 5IKR@ID8, b) 3NT1@NPX. Générée par la PDB	39
Figure 3	Superposition du ligand ID8 du complexe 5IKR : Couleur bleu X-ray, couleur vert résultat du docking.	40
Figure 4	Superposition de la conformation de référence du ligand NPS (coloré en bleu) et celle du docking moléculaire (coloré en vert) du complexe 3NT1.	40
Figure 5	Superposition de la conformation de référence du ligand 52B (coloré en bleu) et celle du docking moléculaire (coloré en vert) du complexe 3LN0.	41
Figure 6	Les composés ayant meilleurs affinités avec 5IKR.	43
Figure 7	Les composés ayant meilleurs affinités avec 3NT1.	43
Figure 8	Visualisation 3D et 2D des interactions de : a) ligand de référence, b) flavonoïdes ayant meilleures affinités avec les résidus du site actif de 5IKR.	47
Figure 9	Visualisation 3D et 2D des interactions de : a) ligand de référence, b) flavonoïdes ayant meilleures affinités avec les résidus du site actif de 3NT1.	48

Liste des Tableaux

<i>N°</i>	<i>Intitulé</i>	<i>Page</i>
<i>Chapitre II: Les Cyclooxygénase</i>		
Tableau 1	Différences entre COX-1, OX-2 et COX-3.	18
<i>Chapitre III : les flavonoïdes</i>		
Tableau 1	Les différentes classes de flavonoïdes	28
Tableau 2	Quelques sources naturelles de flavonoïdes	30
<i>Chapitre IV: Résultats et discussion</i>		
Tableau 1	Les boîtes GRID BOX des protéines	37
Tableau 2	Propriétés des COXs-2 et RMSD.	38
Tableau 3	Résultats de calcul d'affinité.	42
Tableau 4	Propriétés physicochimiques des composés ayant meilleur affinité (calcul ADME).	50

Liste des Abréviations

AA	Acide Arachidonique
Å	Angström
AINS	Anti inflammatoires non stéroïdiens
COX	Cyclooxygénase.
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2.
2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
HBA	Num. H-bond acceptors;
HBD	Num. H-bond donors;
LogP	Log Po/w (XLOGP3)
MR	Molar Refractivity.
MW	Molecular Weight;
PDB	Protein Data Bank
RB	Rotatable Bonds ;
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root Mean Square Deviation
TPSA	Topological Polar Surface Area

Acides Aminés

ALA	Alanine
ARG	Arginine
GLN	Glutamine
GLU	Acide glutamique

GLY	Glycine
HIS	Histidine
ISO	Isoleucine
LEU	Leucine
LYS	Lysine
SER	Sérine
TYR	Tyrosine
VAL	Valine

SOMMAIRE

Remerciements

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction Générale 1

Références 3

Chapitre I : Docking Moléculaire

I.	Introduction	4
II.	Docking Moléculaire.	4
II.1.	Définition	4
II.2.	Les étapes de docking	5
III.	Les types de docking moléculaire	5
IV.	Les outils du docking	6
V.	Le RMSD (Root Mean Square Deviation)	7
VI.	Les interactions récepteur-ligand	7
VII.	Les propriétés ADME-T	10
	Références	13

Chapitre II : Les cyclooxygénases

I.	Introduction	15
II.	L'Acide arachidonique (AA)	15
III.	Fonction de la cyclooxygénase	16
III.1.	La Cyclo-Oxygénase-1 (COX-1)	16
III.2.	La Cyclo-Oxygénase-2 (COX-2)	17
III.3.	La Cyclo-Oxygénase-3 (COX-3)	18

IV.	Notion de site actif	19
V.	Sites actifs des COXS	19
V.1.	Site actif des COX-1	19
V.2.	Site actif des COX-2	20
VI.	Les inhibiteurs des COXS	21
VI.1.	Les inhibiteurs réversibles	21
VI.2.	Inhibiteurs irréversibles	22
VI.3.	Inhibiteurs naturels	22
VI.4.	Les inhibiteurs synthétiques	23
VII.	Inhibition de la cyclooxygénase-2 par les flavonoïdes	23
	Références	24

Chapitre III : Les Flavonoïdes

I.	Introduction	25
II.	Structure Chimique et Classification	25
III.	Les différentes classes des flavonoïdes	26
IV.	Les sources de flavonoïdes	28
V.	Les propriétés	30
	Références	32

Chapitre IV : Résultats et discussions

I.	Introduction	34
II.	Matériels	34
III.	Méthodologie des calculs	35
IV.	Résultats et interprétations	37
IV.1.	Choix des cibles	37
IV.2.	Amarrage moléculaire	41
IV.3.	Les interactions protéine – ligand	45

V.	Les propriétés ADME	49
	Références	51
	Conclusion générale	52
	Annexe 1	
	Annexe 2	

Introduction générale

La recherche de nouvelles molécules bioactives utilisables en thérapeutique est un enjeu majeur de santé publique en particulier dans le traitement de certaines maladies.

De tous temps, les produits d'origine naturelle ont été utilisés par l'homme pour le traitement de maladies. Au début du 20ème siècle, ils sont encore considérés comme une source précieuse de substances médicamenteuses et ce malgré les progrès de la biologie moléculaire et de la chimie organique qui permettent la synthèse de molécules médicamenteuses sophistiquées moins onéreuses et plus efficaces [1].

Les flavonoïdes sont des produits largement distribués dans le règne végétal et ainsi présents dans notre alimentation quotidienne sous forme de fruits, légumes et boissons.

Les différentes classes de flavonoïdes (anthocyanes, chalcones, flavanones, flavones, flavonols ...) présentent de nombreuses propriétés biologiques dont une activité anti-inflammatoire via une inhibition de la COX-2[1,2].

La cyclooxygénase-2 (COX-2) est une enzyme qui catalyse l'étape initiale du métabolisme d'un acide gras, l'acide arachidonique, présent dans les phospholipides membranaires. Elle joue un rôle majeur dans les phénomènes inflammatoires. La COX-2 représente ainsi la cible moléculaire d'une classe d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) qui présentent moins d'effets indésirables sur la sphère gastro-intestinale que les AINS traditionnels mais pour lesquels demeure néanmoins une certaine cardio-toxicité.

À la fin des années 1990, le rofécoxib et le célécoxib, les deux premiers inhibiteurs sélectifs de la COX-2, ont été mis sur le marché [3,4]. Par la suite, d'autres inhibiteurs sélectifs de cette enzyme, tels que le valdécoxib et l'étoricoxib, ont été développés. L'utilisation de ces composés, appartenant à la famille des AINS spécifiques de la COX-2, est associée à une amélioration de la sécurité gastro-intestinale par comparaison aux AINS traditionnels. Cependant, les données de pharmacovigilance ont montré une augmentation de la survenue d'événements cardiovasculaires graves. De ce fait, certains de ces AINS spécifiques de la COX-2, dont le rofécoxib et le valdécoxib, ont été retirés du marché [5-7].

Des travaux réalisés in vitro révèlent que ces composés peuvent inhiber l'induction et/ou l'activité de la COX-2[2].

Des travaux réalisés in vitro révèlent que les flavonoïdes constituent la principale catégorie de composés d'origine végétale présentant une activité inhibitrice sur la COX-2.

Ils sont reconnus par La grande variété de structures et d'activités biologiques citons par exemple les activités antiallergiques, antivirales, anti-inflammatoires et l'inhibition enzymatiques. Donc ces molécules sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires.

Dans le présent travail un amarrage moléculaire protéine-ligand a été réalisé à l'aide du logiciel AutoDock vina, l'un des programmes de docking moléculaire les plus performants et les plus utilisés afin de prédire l'activité biologique des flavonoïdes In-siliconé sur la base des résultats expérimentaux.

Le plan de ce manuscrit est réparti comme suit :

Introduction générale,

Chapitre 1 : Docking Moléculaire,

Chapitre 2 : présente un aperçu général sur les cyclooxygénases,

Chapitre 3 : les flavonoïdes et leurs propriétés biologiques,

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

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

Références

- [1] García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation research*, 58(9), 537-552.
- [2] Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 96 (3), 229-245.
- [3] Scheen, A. J. (2004). Withdrawal of rofecoxib (Vioxx): What about cardiovascular safety of COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs?. *Revue médicale de Liège*, 59(10), 565-569..
- [4] Brueggemann, L. I., Mani, B. K., Mackie, A. R., Cribbs, L. L., & Byron, K. L. (2010). Novel actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on vascular ion channels: accounting for cardiovascular side effects and identifying new therapeutic applications. *Molecular and cellular pharmacology*, 2(1), 15.
- [5] Lelong, H., Ly, C., & Blacher, J. (2012). Risque cardiovasculaire des anti-inflammatoires non stéroïdiens: Cardiovascular risk of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Médecine des maladies métaboliques*, 6(1), 19-24.
- [6] Chakraborti, A. K., Garg, S. K., Kumar, R., Motiwala, H. F., & Jadhavar, P. S. (2010). Progress in COX-2 inhibitors: a journey so far. *Current medicinal chemistry*, 17(15), 1563-1593.
- [7] Marnett, L. J. (2009). The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49, 265-290.

Chapitre I: Docking Moléculaire

I. Introduction

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*.

Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée [1].

II. Docking Moléculaire

II.1. Définition

Le docking ou l'amarrage moléculaire décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace tridimensionnel (3D). Deux aspects sont importants : la prédiction de l'affinité du complexe ligand- protéine, 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.

L'objectif du docking consiste généralement à déterminer la manière dont ces molécules s'arrangent les unes par rapport aux autres tout en prenant compte de l'environnement de leurs acides aminés [2].

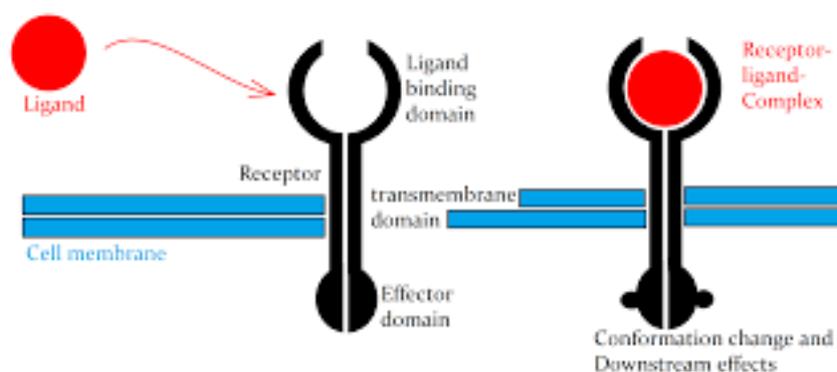


Figure1 : Représentation schématique du Docking.

II.2 Les étapes de docking

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

- 1. Le Docking** : Le docking (ancrage ou amarrage) est l'expression donnée aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches chimique, physique et biologique sont combinées pour étudier au niveau atomique les interactions entre deux molécules. L'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- 2. Le Scoring** : est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine, et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées [3].

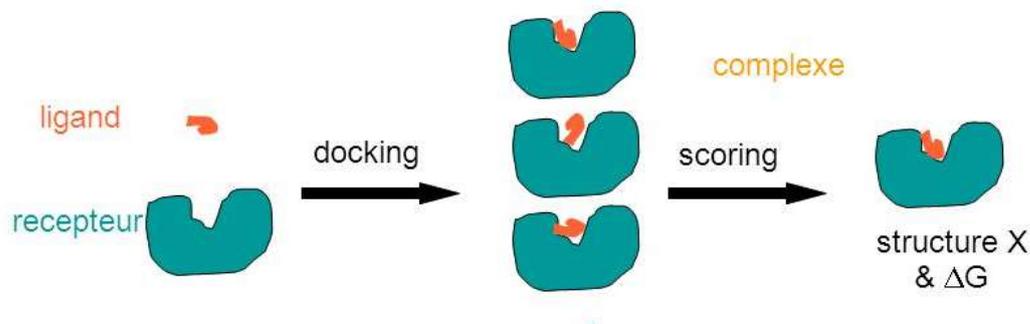


Figure2 : Principe générale d'un programme de docking moléculaire

III. Les types de docking moléculaire

Il ya trois types de docking moléculaire : (docking corporel rigide, docking de ligand flexible et docking flexible).

- **Docking corporel rigide**, où les récepteurs et les petites molécules sont traités comme ennuyés.
- **Docking de ligand flexible**, où le récepteur reste rigide mais le ligand est considéré comme souple (flexible).
- **Docking flexible**, compte tenu de la flexibilité des récepteurs et des ligands.

Les algorithmes d'amarrage les plus courants utilisent des modèles de récepteurs rigides et ligands flexibles, qui sont basés sur le principe de «la clé dans la serrure », lorsque le ligand est amarré dans la cavité (site de liaison) de la protéine. Ce processus est détaillé dans la Figure 1.

IV. Les outils du docking

Les outils qui sont très utilisés en docking sont : une petite molécule appelée ligand. Une cible biologique d'intérêt thérapeutique appelée protéine et un programme de docking.

1. Ligand

Un ligand est une molécule qui se lie de manière non-covalente et spécifique à une macromolécule ciblée, une protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal.

Dans l'amarrage moléculaire, la sélection des ligands est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent car la spécificité du site actif d'intérêt évite les tests moléculaires inutiles car le ligand permet d'améliorer ce changement conformationnel. Par conséquent, cette modification structurelle peut moduler son état fonctionnel et son activité [5].

2. Récepteur

Un récepteur est une macromolécule, généralement une protéine spécialisée qui peut se lier spécifiquement et de manière réversible à une autre molécule appelée ligand.

Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la Protein Data Bank (PDB), un référentiel mondial d'informations sur les structures 3D des macromolécules biologiques : principalement des protéines et des acides nucléiques (ARN et ADN).

Les structures tridimensionnelles (3D) sont issues principalement de l'analyse par diffraction des rayons X, par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou par modélisation moléculaire.

Les différentes conformations tridimensionnelles peuvent être téléchargées sous l'extension *PDB*, qui peut être lue par un logiciel de docking et contient diverses informations sur la protéine [6,7].

3. Programme

Un logiciel est un ensemble de programmes qui permet à un ordinateur ou à un système informatique d'assurer une tâche ou une fonction en particulier, procédés et règles, et éventuellement de la documentation, relatifs au fonctionnement d'un ensemble de traitement de données (Par opposition au matériel).

Un programme de docking moléculaire a pour but de prédire correctement le mode d'interaction entre deux entités chimiques, et de reconnaître parmi ceux –ci lequel est le meilleur.

Il existe actuellement plusieurs programmes de docking moléculaire : Auto Dock, AutoDockVina, GOLD, FlexX, DOCK et ICM...etc)[8,9].

V. Le RMSD (Root Mean Square Deviation)

Correspond à la moyenne de la déviation de chacun des atomes par rapport à ceux de la molécule d'origine. Le mieux possible signifie que la valeur du RMSD entre la pose du ligand calculée par le logiciel et la conformation dans le complexe expérimental est le plus petit possible. Le positionnement, c'est-à-dire l'identification correcte du site de liaison sur la protéine, l'orientation et la conformation du ligand influent sur la valeur du RMSD [10]. Le RMSD entre deux poses est une mesure géométrique de la distance entre les positions atomiques de deux structures. Plus la prédiction du positionnement est précise, plus les différences entre les deux structures sont faibles, plus la valeur du RMSD est basse.

VI. Les interactions récepteur-ligand

Les interactions protéine-ligand sont assez spécifiques ; même si de nombreux ligands potentiels entourent une protéine cellulaire à un moment donné, un seul ligand particulier peut se lier à cette protéine. De plus, un ligand ne se lie qu'à une zone dédiée à la surface de la protéine, connue sous le nom de site de liaison du ligand. La spécificité du site de liaison au ligand d'une protéine est déterminée par la disposition de sa chaîne d'acides aminés qui donne à la zone sa forme et sa réactivité chimique. Par conséquent, un site de liaison au ligand fournit une forme complémentaire à son ligand et maintient le ligand en place via des interactions chimiques. Ces interactions chimiques sont souvent non covalentes ; cependant, étant donné que ces interactions sont réversibles et faibles, bon nombre de ces interactions doivent se produire simultanément pour maintenir ensemble la protéine et le ligand. La recherche sur la liaison des ligands est importanté pour comprendre les fonctions des

protéines et la manière dont elles exécutent des processus cellulaires spécifiques à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques. En outre, cette recherche permet également aux scientifiques de concevoir des médicaments avec des interactions spécifiques et des effets secondaires minimes en ciblant le site de liaison au ligand d'une protéine impliquée. De nombreux type d'interaction non covalente, ont été mis en évidence dans les complexes protéine- ligand. Parmi les interactions qui peuvent exister entre le ligand et la protéine on cite celles de type polaire (liaisons hydrogène, liaisons ioniques) et celles de type hydrophobe qui résultent d'un contact entre des groupements hydrophobes [11].

1. Les interactions de Van Der Waals

Elles résultent de l'interaction des nuages électroniques de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive. Le potentiel de Vander Waals contient une composante attractive lorsque les atomes sont liés, et une composante répulsive si les atomes sont trop proches Il peut être utilisé pour empêcher l'interpénétration de deux protéines durant un docking interactif, en calculant les forces entre les atomes à l'interface.

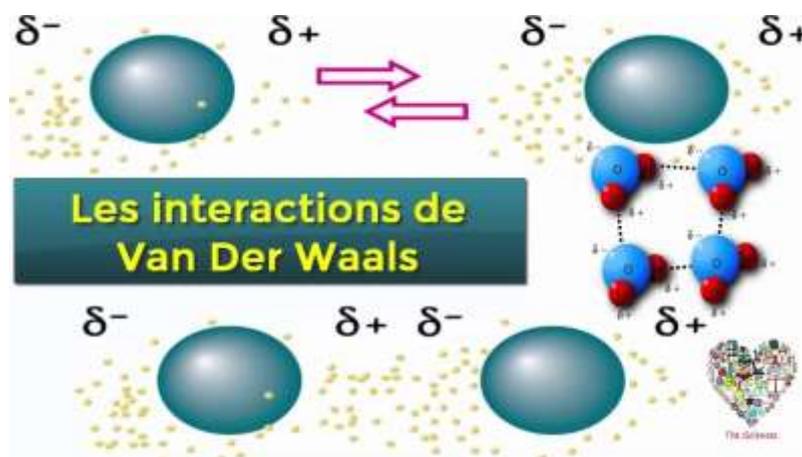


Figure3 : Interactions de Van der Waals.

2. Liaison d'hydrogène

La liaison hydrogène provient des interactions électrostatiques entre les atomes Hydrogène (donneur) et éléments extrêmement électronégatifs avec au moins une paire non liée (Accepteur) par exemple (oxygène, azote ou fluor). Les liaisons hydrogène sont responsables de la structure secondaire des protéines car Ce dernier est constitué de chaînes (ou séquences) d'acides aminés liés entre eux par liaison peptidique [12].

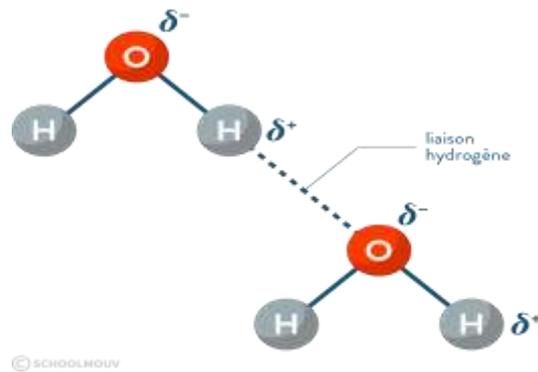


Figure4 : Liaison hydrogène.

3. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques, liaisons ioniques résiduelles faibles, proviennent de l'interaction entre deux atomes de charges opposées conduisant à la création d'une force attractive.

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.

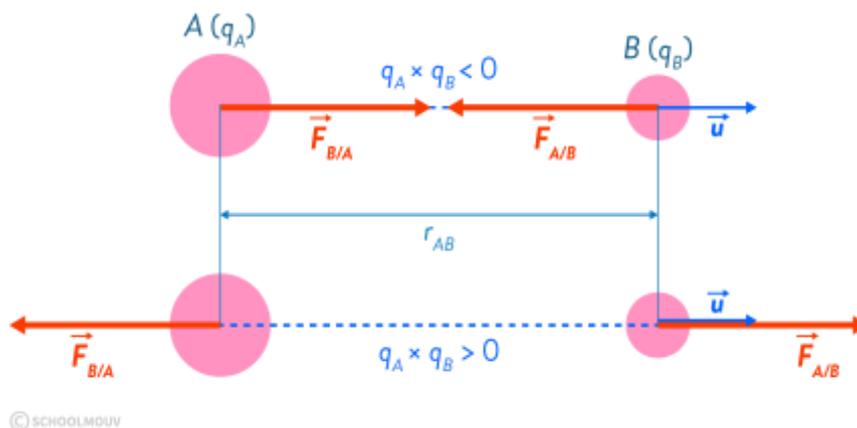


Figure 5: Les interactions électrostatiques.

4. Les interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes sont des chaînes organiques ou aromatiques saturées. Ils ont tendance à se positionner sur la surface de contact la plus basse avec l'environnement aquatique. Les molécules non polaires et faiblement polarisées ont tendance à s'agglutiner, créant une force de liaison hydrophobe. Ce sont des interactions entre molécules ou groupements qui ont peu d'affinité pour le solvant (l'eau) qui les dissout. Les emplacements de ces groupes auront le moins de contact avec l'eau. Ainsi, ces groupes vont s'attirer par la puissance des types décentralisés [13].

VII. Les propriétés ADME-T

Un médicament efficace doit aussi avoir d'autres caractéristiques. Il doit être facile à administrer et doit atteindre sa cible en concentration suffisante pour être efficace. Une molécule médicament une fois entrée dans l'organisme, rencontre une série d'obstacles divers sur sa route vers la cible, en rapport avec son absorption, sa distribution, son métabolisme, et son excrétion. Dans l'ensemble, les propriétés pharmacocinétique d'un médicament (concernant son Absorption, sa Distribution, son Métabolisme, et son Excrétion) sont souvent désignés sous le terme de propriétés ADME (prononcer « admé »).

1. Propriétés Physicochimiques

1.1. La règle de Lipinski (règle des 5)

Les règles de Lipinski [14] prédisent que l'absorption sera probablement faible quand

1. Le poids moléculaire (MW) est plus grand que 500.
2. Le nombre de liaisons hydrogène donneur (HPA) est plus grand que 5.
3. Le nombre de liaisons hydrogène accepteur (HPD) est plus grand que 10.
4. Le coefficient de partage [évalué par $\log(P)$] est plus grand que 5.

Le coefficient de partage, est une manière de mesurer la tendance d'une molécule à se dissoudre dans les membranes, qui est corrélée à sa tendance à se dissoudre dans un solvant organique. Il est déterminé en permettant à un composé de s'équilibrer entre l'eau et une phase organique le n-octanol.

La valeur du $\log(P)$ est définie comme le \log_{10} du rapport de la concentration du composé dans le n-octanol à sa concentration dans l'eau. Une valeur de $\log(P)$ trop élevée suggèrera que la molécule puisse être peu soluble dans un environnement aqueux.

Les molécules dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins 2 des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité.

1.2. La règle de Veber

De plus, Veber 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 chez GlaxoSmithKline, la surface polaire (PSA, polar surface area) du composé doit être inférieure à 140 \AA^2 et le nombre de liaisons de rotation (RB : rotatable bonds en anglais) doit être inférieur à 10 pour une bonne biodisponibilité par voie orale chez le rat [15].

La surface polaire est représentée par la somme des surfaces des atomes polaires de la molécule (calcul basé sur la topologie de la molécule ou TPSA) et permet de prédire l'absorption intestinale et le passage de la barrière hématoencéphalique.

Ces critères peuvent être adaptés à la cible visée par la molécule. En effet, alors que l'absorption intestinale devient difficile pour un composé de surface polaire supérieure à 140 \AA^2 , 60 \AA^2 est le seuil maximal pour le passage de la barrière hématoencéphalique (BBB) [16].

2. Propriétés pharmacocinétique et toxicité

2.1. Absorption

L'absorption est le processus par lequel le médicament inchangé passe de son site d'administration à la circulation générale. La voie d'administration du médicament influence cette première phase : la voie intraveineuse est la voie de référence puisque par définition, à la différence des autres voies (orale par exemple) toute la dose administrée atteint la circulation générale.

2.2. Distribution

La distribution est fonction de la capacité du médicament à franchir les barrières qui séparent les différents compartiments de l'organisme et à s'y accumuler ou à en être exclu. Ceci implique le passage de barrières membranaires qui peuvent être franchies par diffusion passive ou par l'action de transporteurs.

2.3. Métabolisme

Le terme de métabolisme fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique. De nombreux tissus peuvent réaliser cette transformation (peau, poumon,

rein, intestin...). Néanmoins le principal site de biotransformation est situé au niveau hépatique, dans les enzymes des microsomes.

2.4.Élimination

Élimination se définit comme le volume de plasma contenant la quantité de médicament éliminée par unité de temps. Si, stricto sensu, la clairance d'un médicament peut être le résultat de n'importe quelle voie d'élimination, les éliminations hépatique et rénale sont, habituellement, les deux principales à prendre en compte dans l'étude des médicaments.

2.5.Toxicité

On peut définir la toxicité comme la mesure du degré à partir duquel un composé est toxique pour un organisme vivant. Cette toxicité peut s'appliquer à un organisme entier ou uniquement à un groupe cellulaire (cytotoxicité) ou bien encore à un organe particulier (organotoxicité).

La toxicité peut être aiguë ou chronique. La toxicité aiguë est définie comme celle qui résulte de l'exposition unique et massive à un agent toxique entraînant des dommages corporels pouvant conduire à la mort. La toxicité chronique est le résultat de l'exposition prolongée à plus ou moins faible dose à un xénobiotique toxique dont les effets néfastes ne se font sentir que quelques mois à quelques années plus tard [17,18].

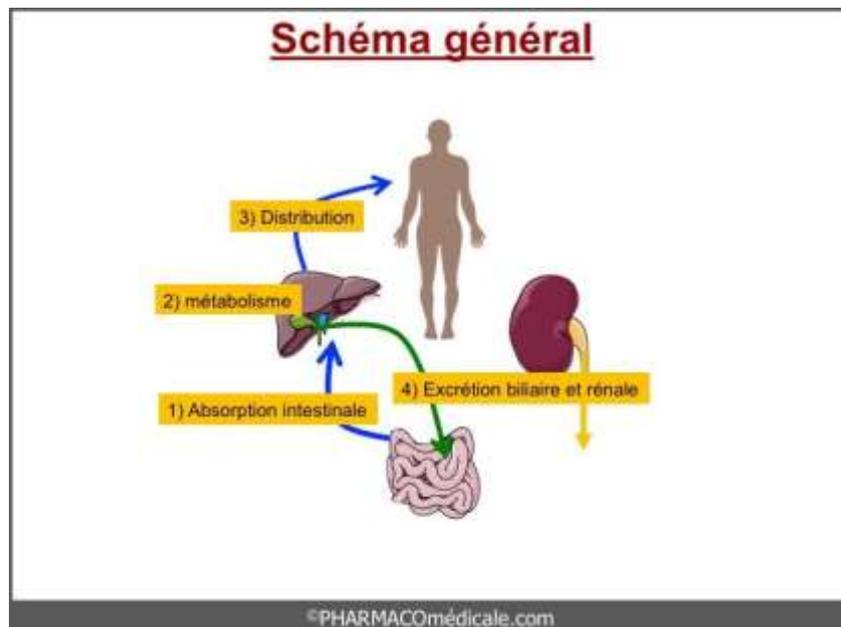


Figure 6 : Schéma général du devenir d'un médicament dans l'organisme.

Références

- [1] Grosdidier, A. (2007). *Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives* (Doctoral dissertation, PhDthesis, Université Joseph Fourier Grenoble 1, France).
- [2] AlexandreBeautrait. (2008). Development and validation of the VSM-G virtual platform. Use for the study of the FAT domain of the KAK kinase. Theses, Université Henri Poincaré - Nancy I, January.
- [3] Boucherit, H. (2012). Etude theorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la methionineaminopeptidase de mycobacteriumtuberculosis par diverses molecules.
- [4] Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D., & Bell, E. (1994). Lipoxygenases. *Plant molecularbiology reporter (USA)*.
- [5] Monge, A. (2006). *Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs* (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).
- [6] Fortuné, A. (2006). *Techniques de Modélisation Moléculaire appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance* (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- [7] Martin, L. (2006). *Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif : une application sur la protéine kinase FAK* (Doctoral dissertation, Montpellier 2).
- [8] DU TITRE, P. P. L. O. (2007). *Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives* (Doctoral dissertation, université joseph fourier).
- [9] Thiriot, E. (2009). *Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : Développements méthodologiques et détermination du mécanisme des MétionineSulfoxyde Réductases de classe A* (Doctoral dissertation, Université Henri Poincaré-Nancy 1).

[10] Kramer, B., Rarey, M., & Lengauer, T. (1999). Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein–ligand docking. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 37(2), 228-241.

[11] <https://www.jove.com/science-education/11510/ligand-binding-sites?language=French>.

[12] Demachy, I., & Piquemal, J. P. (2014). La surface d'énergie potentielle vue par les champs de forces. *L'actualité chimique*, 388, 37-42.

[13] Veselovsky, A. V., Ivanov, Y. D., Ivanov, A. S., Archakov, A. I., Lewi, P., & Janssen, P. (2002). Protein–protein interactions: mechanisms and modification by drugs. *Journal of Molecular Recognition*, 15(6), 405-422.

[14] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.

[15] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615-2623.

[16] Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M. P., & Fenart, L. (2007). Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. *Nature reviews Drug discovery*, 6(8), 650-661.

[17] Valerio Jr, L. G. (2009). In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicology and applied pharmacology*, 241(3), 356-370.

[18] Jacob, Alexandre. *Contribution de la modélisation à l'étude de la toxicité et l'hydrosolubilité de molécules organiques*. Diss. Evry-Val d'Essonne, 2012.

Chapitre II : Cyclooxygénases

I. Introduction

La cyclooxygénase (COX), ou prostaglandine G/H synthase (PGHS) est une enzyme qui joue un rôle essentiel dans la cascade de l'acide arachidonique ($C_{20}H_{32}O_2$). C'est elle qui est responsable de la synthèse des différents médiateurs chimiques tels que les prostanoïdes. Ces métabolites sont à l'origine des processus inflammatoires [1].

La COX existe sous deux isoformes : COX-1, COX-2 :

1. La cyclooxygénase de type 1 (COX-1) 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.
2. La cyclooxygénase de type 2 (COX-2) est un isoforme exprimé par l'action d'agents inducteurs. Cette forme de cyclooxygénase est responsable de la production élevée en prostaglandine lors du processus inflammatoire induisant fièvre, douleur et inflammation. L'intérêt majeur dans le traitement des phénomènes inflammatoires est d'inhiber spécifiquement l'isoforme 2[2 ,3].

Des études ont également montré l'existence d'un troisième isoforme, la COX-3. Cependant, celle-ci ne semble pas être capable de produire de prostaglandines ayant une activité dans les tissus humains.

II. L'Acide arachidonique (AA)

L'acide arachidonique ($C_{20}H_{32}O_2$) est un acide gras polyinsaturé (AGPI) à longue chaîne, de la famille des oméga-6. Sa désignation biochimique est 20:4, 20 correspond au nombre d'atomes de carbone et 4 au nombre de liaisons. Il est cependant d'une grande importance en pathologies inflammatoires car il est à l'origine des hormones éicosanoïdes.

Il y a plusieurs aliments riches en acide arachidonique comme huile de foie de morue ; cœur de poulet, cuite ect.... [4].

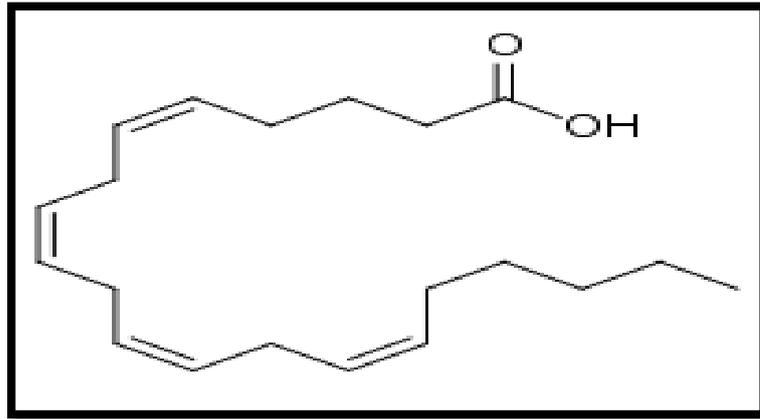


Figure1 : Formule développée d'acide arachidonique.

III. Fonction de la cyclooxygénase

La cyclooxygénase (COX) ou prostaglandine G/H synthase, est une enzyme capable de convertir l'acide arachidonique (AA), qui participe à la formation des membranes cellulaires, en prostaglandines H_2 , responsables de nombreuses fonctions physiologiques, notamment au niveau musculaire.

III.1. La Cyclo-Oxygénase-1 (COX-1)

La COX-1 humaine, composée de 576 acides aminés (72 Kilo daltons), est codée par un gène qui se situe sur le chromosome 9. Elle est constitutivement exprimée dans la majorité des cellules et des tissus, notamment dans l'appareil digestif, les reins et les plaquettes sanguines. On la retrouve dans l'estomac, les plaquettes, le foie, les poumons, l'intestin, le système nerveux central de l'humain, du rat, et de chien.

La COX-1 est localisée principalement dans le réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire des cellules endothéliales [5].

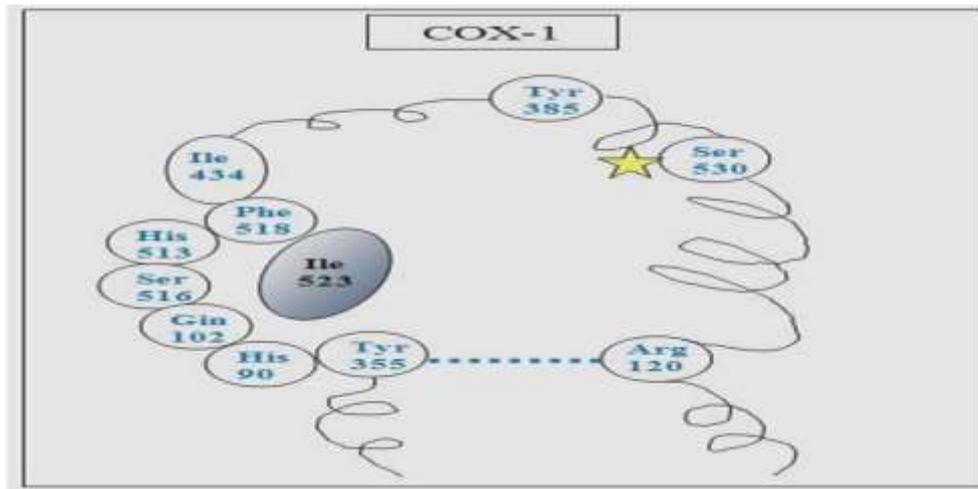


Figure2 : Structure de la Cyclooxygénase-1.

III.2. La Cyclo-Oxygénase-2 (COX-2)

Elle a été découverte en 1991. La COX-2 humaine est composée de 581 acides aminés (74Kilo daltons) dont la séquence est homologue à 60% environ à celle de la COX-1. Codée par un gène qui se situe sur le chromosome 1, la COX-2 est une enzyme principalement inductible. Cependant, elle est constitutivement exprimée dans certains tissus tels que le cerveau et le rein. Cette enzyme 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, COX-2 préfère se localiser dans l'enveloppe nucléaire où son activité est plus importante [6].

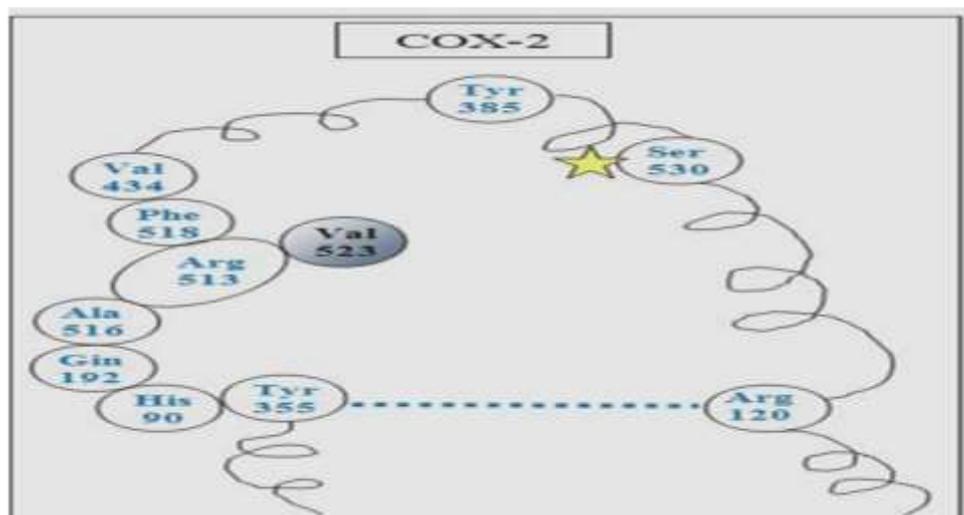


Figure3 : Structure de la Cyclooxygénase-2.

III.3. La Cyclo-Oxygénase-3 (COX-3)

La COX-3 est la troisième et dernière découverte de la cyclooxygénase (COX). L'isoenzyme COX-3 est codée par le même gène que COX-1, à la différence que la COX-3 retient un intron qui n'est pas retenu dans la COX1. Les deux autres isoenzymes de la cyclooxygénase sont connues pour convertir l'acide dihomog- γ -linoléique et l'acide arachidonique en prostaglandines et sont la cible des AINS [4].

Tableau 1 : Différences entre COX-1, OX-2 et COX-3.

	COX-1	COX-2	COX-3
Similitude structurelle	Seulement 60% d'homologie dans la séquence d'acides aminés (COX-1 et COX-2 sont codées par des gènes différents). Le site actif de COX-2 est plus grand que celui de COX-1.		
Régulation	Présence physiologique, multiplication possible de la concentration par un facteur deux à quatre.	Formation induite lors D'inflammation (synthèse multipliée par 10 à 80 en cas de stimulation appropriée : inflammation, hormones).	
Expression	Constitutive	Induite	constitutive
Nom du gène	PTGS1	PTGS2	PTGS1
Localisation du gène	Chr.9	Chr.1	Chr.9
Poids moléculaire	71kDa	72kDa	65kDa
Nombre d'acide aminé	576	581	576
Localisation tissulaire	Présente dans la plupart des tissus, surtout abondante dans les thrombocytes, les cellules endothéliales, l'estomac, les reins et les muscles lisses.	Présence : -Physiologique dans la prostate, l'utérus, les testicules et les poumons. -dans tous les tissus après induction.	Cerveau
Fonction physiologique	Maintien des fonctions Homéostatiques Neuro inflammation	Inflammation, fièvre et douleur Ovulation, accouchement, Maintien des fonctions homéostatiques (coagulation).	Fièvre, douleur

IV. Notion de site actif

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif. Schématiquement, il a la forme d'une cavité ou d'un sillon dans lequel vont se fixer les substrats grâce à plusieurs liaisons chimiques. Une fois fixés, les substrats vont réagir et se transformer en produit. Le site actif est subdivisé en deux parties :

- **le site de liaison** : qui reconnaît la complémentarité de forme avec un substrat spécifique à l'enzyme.
- **le site catalytique** : qui est responsable de la fixation de l'enzyme sur le substrat [7].

Le placement des fragments (atomes) dans le site actif est basé sur le principe de complémentarité stérique et électronique entre ligand et récepteur.

V. Sites actifs des COXS

Le site actif d'une enzyme est schématiquement formé par un petit nombre d'acides aminés organisés en un arrangement tridimensionnel précis formant une poche ou une crevasse dans la protéine. 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 [8].

V.1. Site actif des COX-1

Le domaine catalytique est constitué d'un long canal hydrophobe relativement étroit (dimensions : $25 \times 8 \text{ \AA}^2$). Divers acides aminés participent au fonctionnement de l'enzyme, soit par effet électronique, soit par effet stérique :

- **L'Arginine 120**, située à l'entrée du site actif, possède une chaîne latérale porteuse d'une fonction guanidine, facilement protonable. La charge cationique joue un rôle clé dans l'ancrage du substrat naturel de l'enzyme (interaction électrostatique avec le groupement carboxylate de l'acide arachidonique).
- **La Tyrosine 385**, située à l'autre extrémité du site, participe à l'activité cyclooxygénase en provoquant l'arrachement stéréospécifique de l'atome d'hydrogène en position 13 de l'AA.
- **La Sérine 530**, au niveau de la partie centrale du site actif, intervient par sa chaîne latérale à fonction alcool. Ce résidu polaire impose une certaine courbure à la molécule d'AA, nécessaire à l'action de l'enzyme sur son substrat.

- L'**Isoleucine 523** est responsable d'un effet stérique en raison de sa chaîne latérale isobutyle. Ce motif ramifié génère une zone d'étranglement dans la partie centrale du site catalytique de la COX-1[9].

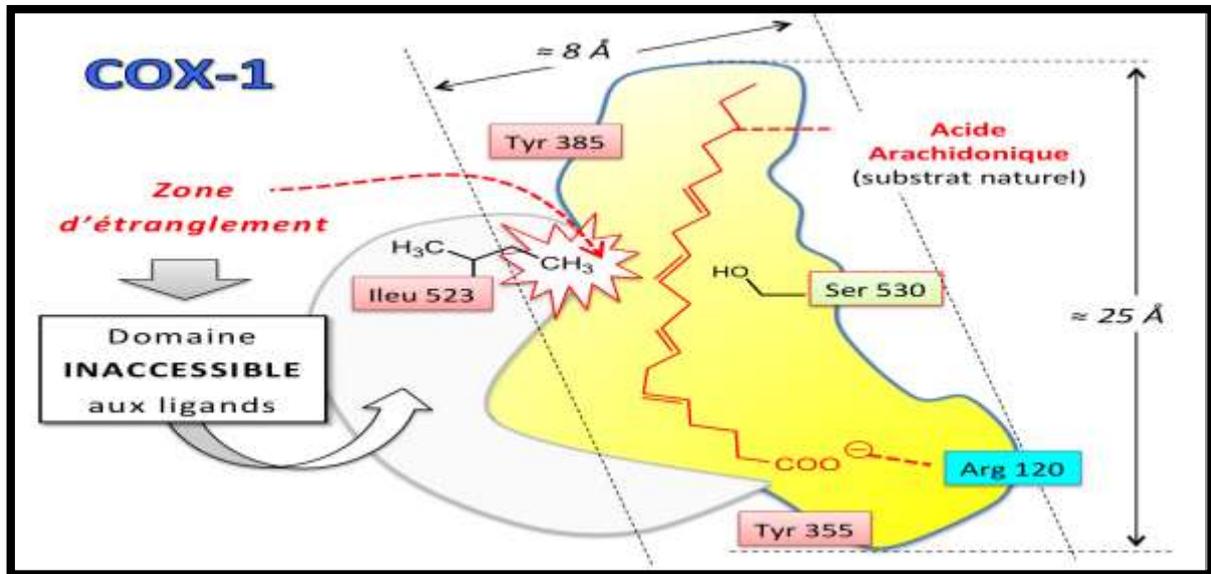


Figure4 : Représentation du site actif de la COX-1.

V.2. Site actif des COX-2

Les deux isoformes (COX-1 et COX-2) ont une homologie de l'ordre de 61%. Les acides-aminés essentiels à la fixation du substrat (**Arg120**) ou à la réaction d'oxygénation (**Tyr385**) sont également retrouvés dans la COX-2. Toutefois, des remplacements ponctuels de certains résidus vont entraîner des modifications d'ordre stérique au niveau du site enzymatique :

- Le site actif COX-2 est dépourvu de **l'isoleucine 523** et possède à la place une **valine** dont le groupement isopropyle est plus petit par rapport à l'isobutyle. La perte d'un groupe CH₃ permet de diminuer l'encombrement stérique : il se crée un passage vers une poche latérale qui devient alors accessible à des molécules relativement volumineuses.
- Cette poche latérale se distingue par certains résidus à caractère polaire : Arginine (**Arg.**), Glutamine (**Gln**), Histidine (**His**) [9].

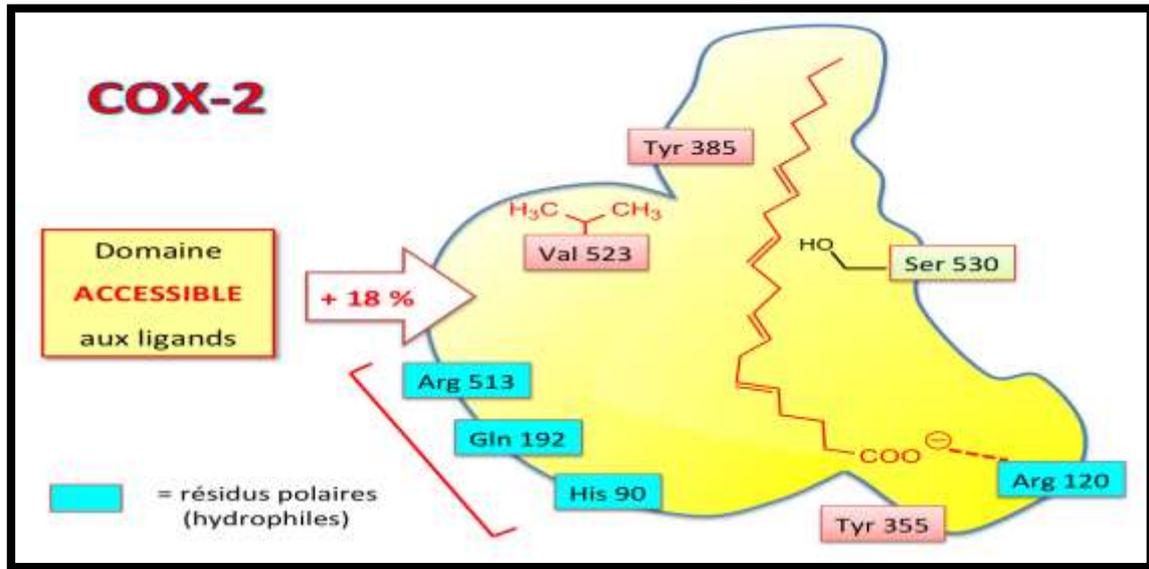


Figure5 : Représentation schématique du site actif de la COX-2.

VI. Les inhibiteurs des COXS

Un inhibiteur enzymatique est une substance se liant à une enzyme et qui en diminue l'activité. Un inhibiteur peut empêcher la fixation du substrat sur le site actif en se fixant à sa place, ou provoquer une déformation de l'enzyme qui rend celle-ci inactive (inhibiteur allostérique).

L'inhibition des enzymes joue un rôle important dans le contrôle des mécanismes biologiques, et notamment dans la régulation des voies métaboliques. Puisque l'inhibition d'une enzyme peut tuer un pathogène ou corriger un déséquilibre métabolique, des applications existent dans de nombreux autres domaines : beaucoup de médicaments, pesticides ou insecticides sont des inhibiteurs enzymatiques classés selon les groupes suivants [10] :

VI.1. Les inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs réversibles s'associent aux enzymes par des liaisons non covalentes comme des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et des liaisons ioniques. De nombreuses liaisons de faible énergie entre inhibiteur et site actif se combinent pour produire une liaison forte et spécifique [11]. Les inhibiteurs réversibles sont classés en :

- **Inhibiteur compétitif**

Ils se lient de manière réversible au site actif de l'enzyme en bloquant l'accès au substrat. Ils diminuent donc la concentration d'enzyme libre. En général ils ressemblent chimiquement au substrat. D'ailleurs, si une enzyme a plusieurs substrats possibles, ceux-ci peuvent aussi agir comme inhibiteurs compétitifs réciproques. Les meilleurs inhibiteurs sont souvent des analogues de l'état de transition de la réaction [10].

- **Inhibiteur non-compétitif**

Peut se fixer sur l'enzyme et sur le complexe Enzyme@Substrat (mais n'est pas en compétition avec le substrat pour sa fixation à l'enzyme) et il ne peut être déplacé par augmentation de la concentration du substrat.

- **Inhibiteurs incompétitifs**

Un inhibiteur incompétitif ne se fixe que sur le complexe Enzyme@Substrat (le site de fixation de I est induit par celle de S).

VI.2. Inhibiteurs irréversibles

Ces substances se fixent sur l'enzyme de manière irréversible, en général par liaison covalente. Leur effet est de diminuer la quantité totale d'enzyme disponible, leur effet sur la cinétique ressemble donc à l'inhibition non-compétitive pure [10].

VI.3. Inhibiteurs naturels

De nombreux produits naturels possèdent une capacité à inhiber l'expression de COX-2 au niveau transcriptionnel, et Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de ces composants par exemples :

- La bromélaïne, un composé présent dans l'ananas.
- La curcumine, un polyphénol de Curcuma longa.
- La coumarine (1,2-benzopyrone) est un autre produit naturel que l'on retrouve dans plusieurs plantes et épices.

VI.4. Les inhibiteurs synthétiques

Plusieurs molécules synthétisées sont maintenant considérées comme principaux agents thérapeutiques pour le traitement et la prévention des maladies inflammatoires. Les Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens regroupent l'ensemble des médicaments symptomatiques inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines.

Ils agissent principalement au niveau de la cascade de l'acide arachidonique et plus précisément par blocage d'enzymes de cyclooxygénases [10].

VII. Inhibition de la cyclooxygénase-2 par les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent la principale catégorie de composés d'origine végétale présentant une activité inhibitrice sur la COX et certains d'entre eux sont des inhibiteurs spécifiques de la COX-2. Des travaux réalisés *in vitro* révèlent que ces composés peuvent inhiber l'induction et/ou l'activité de la COX-2.

L'apigénine et la quercétine, par exemple, sont capables de moduler l'expression de la COX-2. Raso et coll. [12,13] ont démontré que ces deux flavonoïdes réduisent à 0,5, 5 et 50 μM , et de manière dépendante de la concentration, l'expression de la COX-2 ainsi que la production de PGE₂, sur une lignée cellulaire de macrophages de souris J774A.1 stimulés par du lipopolysaccharide (LPS).

Références

- [1] Eschwege, P., De Ledinghen, V., Camilli, T., Kulkarni, S., Dalbagni, G., Droupy, S., & Weksler, B. B. (2001). Arachidonic acid and prostaglandins, inflammation and oncology. *Presse Medicale* (Paris, France: 1983), 30(10), 508-510.
- [2] VanRyn, J., & Pairet, M. (1999). Clinical experience with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Inflammation Research*, 48(5), 247-254.
- [3] Dubois, R.N.; Abramson, S.B.; Crofford, L.; Gupta, R.A.; Simon, L.S.; Van de Putte, L.B.; Lipsky, P.E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998, 12, 1063-1073.
- [4] Laetitia Matrat., Diététicienne-nutritionniste du. Sources : www.personal-sporttrainer.com
- [5] Picot, D., Loll, P. J., & Garavito, R. M. (1994). The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367(6460), 243-249.
- [6] Knights, K. M., Mangoni, A. A., & Miners, J. O. (2010). Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert review of clinical pharmacology*, 3(6), 769-776.
- [7] Laouar, I. (2015). Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.
- [8] Goldberg M., 2003., Regards sur la biochimie., une fonction majeure des protéines: la catalyse enzymatique
- [9] [Untori2.crihan.fr/unspf/2015_bordeaux_nuhrich.../ains_a_nuhrich_2015.pdf](http://untori2.crihan.fr/unspf/2015_bordeaux_nuhrich.../ains_a_nuhrich_2015.pdf)
- [10] Simm, A. M., Loveridge, E. J., Crosby, J., Avison, M. B., Walsh, T. R., & Bennett, P. M. (2005). Bulgecin A: a novel inhibitor of binuclear metallo- β -lactamases. *Biochemical Journal*, 387(3), 585-590.
- [11] ABIR, H., & ROUFAIDA, N. (2019). Etude in silico de l'inhibition de la cyclooxygénase-2.
- [12] Jacob, V., Hagai, T., & Soliman, K. (2011). Structure-activity relationships of flavonoids. *Current Organic Chemistry*, 15(15), 2641-2657.
- [13] O'Leary, K. A., de Pascual-Teresa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'Brien, N. M., & Williamson, G. (2004). Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 551(1-2), 245-254.

Chapitre III: Les Flavonoïdes

I. Introduction

Les flavonoïdes désignent une très large classe de produits naturels dérivés d'une extraordinaire diversité de plantes et de légumes. Ces molécules aromatiques polysubstituées appartiennent à la famille des polyphénols à métabolisme secondaire dans le règne végétal et constituent l'un des groupes de substances les plus courants et les plus répandus chez les plantes. Ce sont les pigments responsables de la coloration jaune, orange et rouge des différents organes végétaux.

Les flavonoïdes se trouvent dans les fruits, les légumes et les boissons. Ils sont également présents dans plusieurs plantes médicinales. Les herbes contenant des flavonoïdes ont été (et sont) utilisées en médecine traditionnelle dans le monde [1].

Leur capacité à moduler l'activité de certaines enzymes et à modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires suggère qu'elles peuvent exercer diverses activités biologiques, notamment des propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices, antihépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même antitumorales significatives [1,2].

II. Structure Chimique et Classification

Les flavonoïdes sont des dérivés benzo- γ -pyrène [3]. Leur structure de base est celle d'un diphenyl propane à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆), constitué de deux noyaux aromatiques qui désignent les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, qui désigne la lettre C (**Figure1**).

Les flavonoïdes diffèrent les uns des autres par leur degré d'insaturation, leur mode d'hydroxylation ou d'oxydation du cycle C ainsi que par les substitutions du noyau B [4].

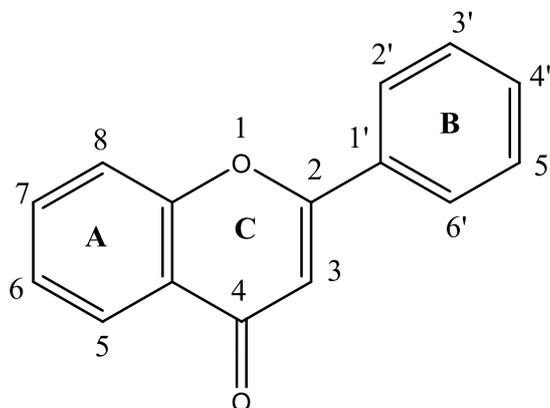


Figure 1: Squelette de base des flavonoïdes.

III. Les différentes classes des flavonoïdes

Les flavonoïdes au sens strict sont des composés dont la substitution par un noyau benzénique se fait en position 2. Les composés présentant une substitution en position 3 sont désignés par le terme isoflavonoïdes [5,6]. Selon la nature de l'hétérocycle (γ -pyrone ou son dihydro-dérivé), on distingue :

- **flavones**: dérivés du phényl-2-chromone (80% des flavonoïdes). ils sont de couleur jaune.
- **flavonols** : ce sont les hydroxy-3-flavones. Ils varient en couleur du blanc au jaune.

Les flavones et les flavonols se caractérisent par la présence d'une double liaison C2-C3. Les flavonols possèdent en plus un groupement hydroxyle en C3 [7].

Ce sont les composés flavonoïdiques les plus répandus dont notamment :

l'apigénine, la quercétine, le kaempférol, et la myricétine.

- **Flavanones** : absence de double liaison C2-C3 dans le cycle pyronique. Ils sont incolores ou jaunes.
- **Flavanonols** : ce sont des dihydro-flavonols différents des flavanones par l'existence de deux groupements hydroxyles en C3 et C'3 [8].

Les flavanones (naringénine) et les flavanols (catéchine) ainsi que les dihydroflavonols (dihydrokaempférol, dihydroquercétine) et les dihydroflavan-3,4-diols (leucopélarгонидол, leucocyanidol) sont considérés comme des flavonoïdes minoritaires en raison de leur distribution naturelle restreinte [9,10].

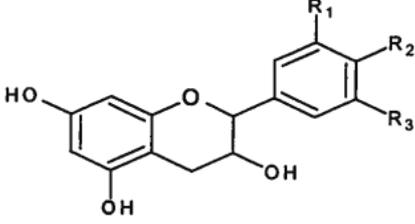
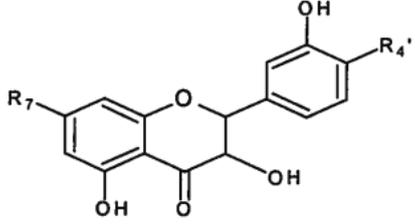
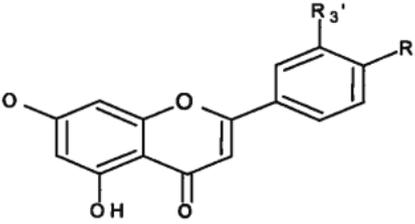
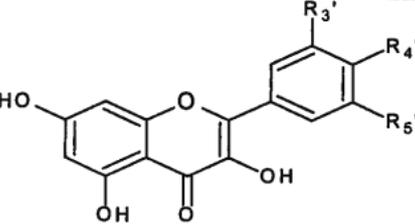
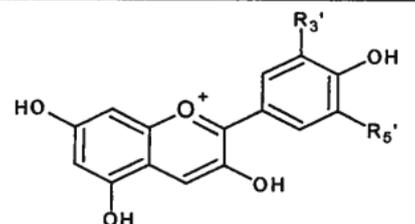
- **Isoflavonoïdes** : Dérivent aussi des flavonones, mais outre une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C-2 au C-4 de l'hétérocycle [11].
- **Biflavonoïdes** : Ils résultent de la condensation de deux flavonoïdes par des liaisons de type carbone – carbone ou de type éther. Les deux unités constitutives de cette classe peuvent être de même type ou de type différent (biflavone, Biflavanone) [12].
- **Chalcones et aurones** : Les aurones sont caractérisées par la présence de deux atomes de carbone dans l'hétérocycle. Les chalcones présentent un chaînon tricarboné α , β insaturé à la place de l'hétérocycle [12].
- **Les Anthocyanidines** : Les anthocyanidines possèdent un hétérocycle de type benzopyronxinium à oxygène tétravalent [13].
- **Les flavonoïdes sulfatés** : Ils sont caractérisés par la présence d'un ou de plusieurs résidus sulfatés. Ces résidus sont liés aux groupements hydroxyles du phénol ou du sucre [14].

- **Les Hétérosides flavonoïdiques** : Ces flavonoïdes existent sous forme de glycosides dont la partie osidique peut être mono, di ou tri-saccharidique. Ils sont divisés en flavonoïdes O- glycosides et flavonoïdes C - glycosides.
- **Les flavonoïdes O – glycosides** : sont des composés dans lesquels un ou plusieurs hydroxyles sont liés à un ou plusieurs sucres. Les O-glycosides sont les plus courants. Ils sont souvent liés aux flavonoïdes sur la position 3, moins fréquemment sur la position 7 et rarement sur les positions 4', 3' et 5. Le sucre constituant la partie glycosylée est habituellement un glucose, un galactose ou un rhamnose.
- **Les flavonoïdes C- glycosides** : sont principalement des flavones dans lesquels la liaison s'établit entre le C1 du sucre et le C6 ou le C8 de la génine[15].

Dans la famille des flavonoïdes, les classes (**Tableau1, Figure 2**) se distinguent suivant les degrés d'oxydation et de saturation du cycle C, alors qu'au sein de chaque classe, les composés se différencient suivant les substituants présents sur les cycles A et B.

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en position 3, 5, 7, 3', 4' et 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont généralement glycosylés. Les O-glycosides sont les plus courants.

Tableau 1 : Les différentes classes de flavonoïdes [16,17].

<p>Flavanols</p>		<p>$R_1 = R_2 = OH; R_3 = H \Rightarrow$ Catéchine $R = \text{Épicatéchine}$</p>
<p>Flavanones</p>		<p>$R_4' = OCH_3; R_7 = OH \Rightarrow$ Hesperitine $R_4' = OCH_3; R_7 = \text{Rhamnose-glucose} \Rightarrow$ Hesperidine</p>
<p>Flavones</p>		<p>$R_4' = OH \Rightarrow$ Apigénine $R_3' = R_4' = OH \Rightarrow$ Luteoline</p>
<p>Flavonols</p>		<p>$R_3' = R_4' = OH \Rightarrow$ Quercétine $R_4' = OH \Rightarrow$ Kaempférol $R_3' = R_4' = R_5' = OH \Rightarrow$ Myricétine</p>
<p>Anthocyanidines</p>		<p>$R_3' = OH; R_5' = H \Rightarrow$ Cianydine $R_3' = R_5' = OH \Rightarrow$ Delphinidine $R_3' = R_5' = OCH_3 \Rightarrow$ Malvidine $R_3' = OCH_3; R_5' = OH \Rightarrow$ Pétunidine</p>

IV. Les sources de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans de nombreux organismes (végétaux, fruits et légumes), que ce soit au niveau de leurs feuilles, de leurs tiges, de leurs fleurs, de leurs fruits ou du pollen. Il s'agit de pigments colorés qui confèrent à ces organismes la large palette de couleurs qu'ils empruntent. Ils les protègent principalement de l'oxydation et des rayons solaires agressifs. Ils participent également à donner du goût aux fruits et aux légumes. Il semble préférable de manger (autant que possible) les fruits et légumes crus, afin de conserver tout le bénéfice des flavonoïdes.

Les flavonoïdes tels que la quercétine et le kaempférol peuvent être consommés quotidiennement puisqu'ils sont présents dans les aliments courants comme les oignons, la laitue, les endives ou même l'huile d'olive. Le **Tableau 2** présente quelques sources de flavonoïdes les plus courantes.

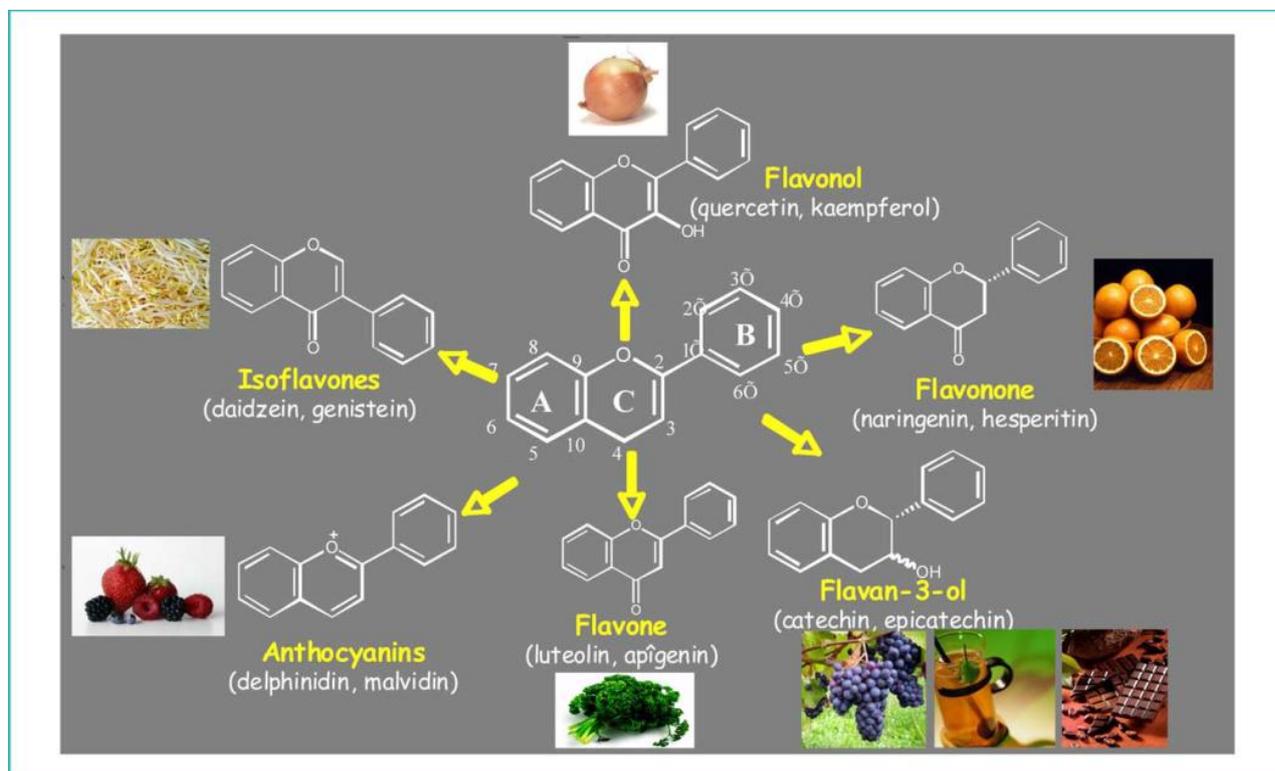


Figure 2 : Structure des flavonoïdes et position des principaux substituants[19].

Tableau 2 : Quelques sources naturelles de flavonoïdes [2,18].

Famille	Flavonoïdes	Source : plantes et produits médicinaux
Flavones	Chrysin	Peau de fruits, conifères
	Apigénine	Persil, Céleri
Flavones glycosides	Baicaline	Scutellaire du Baïkal (fleur)
Flavonols	Quercétine	Oignon, laitue, brocoli, tomate, canneberge, peau de pomme, huile d'olive, thé, baies.
	Kaempférol	Endives, poireaux, brocoli, radis, thé noir, fruit à grappe
	Myricétine	Airelle à gros fruits, thé vert
Flavonols glycosides	Rutine	Sophora du Japon (arbre), Sarrasin (plante), Eucalyptus, Stellaire intermédiaire (mauvaise herbe)
Flavan3-ols	Catéchine	Thé vert
Flavanones	Naringine	Peau d'agrumes, fruits à grappes.
	Taxifoline	Citron
	Naringénine	Eucalyptus
Flavanonols	Taxifoline	Agrumes
Isoflavones	Génistéine	Soja, Stellaire intermédiaire (mauvaise herbe), puéraire (plante vivace), Sophora du Japon (arbre)

V. Les propriétés

A. Les propriétés physico-chimiques

Les flavonoïdes se caractérisent par une faible acidité (dû aux phénols), Ils se cristallisent en donnant des cristaux de couleur variant du blanc au jaune brillant. Ils sont légèrement photosensibles, mais hautement thermostables. Ils résistent à des températures de l'ordre de 102°C.

Ils possèdent un spectre d'absorption dans l'UV avec deux maximums caractéristiques variant avec chaque type flavonique [20,21].

B. Caractérisation

Plusieurs réactions de caractérisations des flavonoïdes sont utilisées :

- Réaction en milieu alcalin : les flavonoïdes en milieu alcalin donnent une coloration jaune fonçant à l'air et qui disparaît après addition d'un acide.
- Réaction à la cyanidine : en présence d'hydrogène naissant (produit par l'action de HCl sur le Mg) les flavonoïdes en solutions alcooliques donnent des colorations diverses : Orange (flavone) / rouge cerise (flavonol) / rouge violacé (flavanone) / négatif (chalcone et isoflavone)
- Chromatographie : la caractérisation des flavonoïdes est dominée par la CCM et les révélateurs les plus courants sont : vapeur d'ammoniac, potasse alcoolique donnant des colorations jaunes, chlorure d'aluminium donnant une fluorescence en UV et chlorure ferrique donnant des colorations vert ou brun.

C. Les propriétés pharmacologiques et biologiques

La principale propriété, initialement attribuée aux flavonoïdes, est d'être vasculo protectrices et vagotoniques, car ils sont capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance. Actuellement, les flavonoïdes sont connus par de remarquables activités pharmaco biologiques comme entre autres des effets, antivirales, antimicrobiens et anticancéreux, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques, anti-tumoraux et hépato protecteurs. Ces activités sont attribuées en partie aux propriétés anti-oxydantes de ces composés naturels. Ces composés inhibent, in vitro, un grand nombre d'enzymes : histidine décarboxylase, protéine kinase C, 5lipoxygénase, cyclooxygénase....

Les flavonoïdes sont des molécules pratiquement atoxiques et bien tolérées chez l'homme mais leur action est lente [22-27].

Références

- [1] Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- [2] Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 3(4), 162-169.
- [3] Dacosta, Y. (2003). *Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques*. Ed. Yves Dacosta.
- [4] Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 651-674.
- [5] Bruneton J. (1999). *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. 3e édition, Tec&Doc.Lavoisier, Paris.
- [6] Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition research*, 24(10), 851-874.
- [7] Formica, J. V., & Regelson, W. (1995). Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and chemical toxicology*, 33(12), 1061-1080.
- [8] Cody, V., Middleton, E., & Harborne, J. B. (1986). *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships: proceedings of a symposium held in Buffalo, New York, July 22-26, 1985*. Liss.
- [9] Birt, D. F., Hendrich, S., & Wang, W. (2001). Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 90(2-3), 157-177.
- [10] Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- [11] Heller, R., Esnault, R., et Delance, C. (1998). *Physiologie végétale 1-nutrition* 6ème édition. Dunod.Paris, Pp 289-288.
- [12] Markham, K. R. (1982). *Techniques of flavonoid identification*. Academic press.
- [13] Joergensen, L. V. (1998). *Flavonoids and other naturally occurring antioxidants: Physico-chemical aspects of their antioxidant mode of action [including 4 papers]*. KVL.
- [14] Varin, L., Barron, D., & Ibrahim, R. K. (1987). Enzymatic assay for flavonoid sulfotransferase. *Analytical biochemistry*, 161(1), 176-180.
- [15] Hahlbrock, K. (1981). Flavonoids. In: "The biochemistry of plants". Academic Press, Inc (London).7 (Chap 14): 425– 455.

- [16] Escarpa, A., & Gonzalez, M. C. (1998). High-performance liquid chromatography with diode-array detection for the determination of phenolic compounds in peel and pulp from different apple varieties. *Journal of chromatography A*, 823(1-2), 331-337.
- [17] M, Thériault. (2004). Etude des propriétés antioxydantes et antimutagènes des composés phénoliques issus de l'érable. INRS-Institut Armand-Frappier, p12.
- [18] Seguin, J. (2012). *Caractérisation de modèles de tumeurs murines et leurs applications en thérapie anti-angiogénique vectorisée* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- [19] Stoclet, J. C., & Schini-Kerth, V. (2011, March). Flavonoïdes alimentaires et santé humaine. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 69, No. 2, pp. 78-90). Elsevier Masson.
- [20] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed Tec&Doc. Paris:309–353.
- [21] Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, M. R., & Krishna, D. R. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*, 33(1), 2-16.
- [22] Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 651–674.
- [23] Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. K. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67(18), 2058-2070.
- [24] Castellano, G., González-Santander, J. L., Lara, A., & Torrens, F. (2013). Classification of flavonoid compounds by using entropy of information theory. *Phytochemistry*, 93, 182-191.
- [25] A.E. Manukyan, A.A. (2020). Hovhannisyan. The Quercetin and Quercetin Derivatives Interaction with Cyclooxygenase-1 and Cyclooxygenase-2. bioRxiv preprint.
- [26] de SouzaFarias, S. A., da Costa, K. S., & Martins, J. B. (2021). Analysis of conformational, structural, magnetic, and electronic properties related to antioxidant activity: revisiting flavan, anthocyanidin, flavanone, flavonol, isoflavone, flavone, and flavan-3-ol. *ACS omega*, 6(13), 8908-8918.
- [27] Zhang, Y. M., Zhang, Z. Y., & Wang, R. X. (2020). Protective mechanisms of quercetin against myocardial ischemia reperfusion injury. *Frontiers in Physiology*, 11, 956.

Chapitre IV: Résultats et Discussions

I. Introduction

L'objectif abordé dans cette étude est de :

- Modéliser et comprendre les interactions d'une variété de flavonoïdes naturels avec les cyclooxygénase type 2 qui sont des enzymes cibles dont le traitement de l'inflammation.
- Aussi modéliser et comprendre les interactions de certains composés Coxibs (Célécoxib, Rofecoxib, Valdicoxib) inhibiteurs sélectifs des COXs-2.
- Calculer les propriétés ADME pour les meilleurs ligands.

Pour cela on a suivi le protocole suivant :

II. Matériels

Le docking moléculaire nécessite l'utilisation des outils suivants :

II.1. Microordinateur

Tous les logiciels utilisés ont été installés sous un système d'exploitation Windows 10 (64 bits).

II.2. Logiciels

- Autodock tools-1.5.7: <http://mgltools.scripps.edu/>.
- Autodock vina_1_1_2: <http://vina.scripps.edu/download.html/>.
- BIOVIA Discovery Studio Visualizer: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer/download/>.
- Gaussian09 : utilisé pour optimiser toutes les différentes structures des ligands étudiés.
- ChemDraw Ultra 15.0: pour créer les structures 2D de toutes les molécules existantes dans ce manuscrit.

II.3. Bases des données

II.3.1. Protein Data Bank: <https://www.pdb.org/>

La PDB est gratuitement accessible par Internet et permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont principalement déterminées par la cristallographie à rayons X et la RMN. Les structuralistes du monde entier sont tenus d'y déposer leurs données expérimentales.

II.3.2. PubChem: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

On a consulté cette chimiothèque afin de chercher et de télécharger les ligands pour réaliser le docking. Ces derniers ont été téléchargés sous format *sdf*. Les molécules traitées dans ce travail sont :

- Les flavonoïdes naturels, les plus abondants dans l'alimentation ;
- Les Coxibs (celecoxib, rofecoxib et valdecoxib).

II.4. Les serveurs

L'étude des propriétés ADME des ligands a été réalisée à l'aide du serveur en ligne :

II.4.1 SwissADME

Un serveur en ligne aide à calculer des descripteurs physico-chimiques à partir de la structure 2D ou du format SMILE du ligand ainsi que de prédire les propriétés pharmacocinétiques ADME.

III. Méthodologie des calculs

III.1. Préparation de la protéine (récepteur)

Une étape préalable à toute simulation de docking consiste en la préparation des structures protéiques avant d'entamer le docking moléculaire par AutoDock vina. Toutes les structures utilisées dans ce travail proviennent de la *PDB*. Elles ont été préparées selon les étapes suivantes :

- Séparer la protéine de son ligand Co-cristallisé afin d'obtenir une cible avec un site actif libre,
- Supprimer toutes les molécules d'eau, les hétéroatomes ainsi que les ligands étrangers,
- Simplifier la protéine en gardant une seule chaîne ;
- Ajouté les hydrogènes et des charges partielles de type "Kollman" calculées avec un champ de forces empirique Amber.
- Enregistrer la cible sous format *pdbqt*.

III. 2. Préparation des ligands

- Les ligands téléchargés auparavant sous format *sdf* (*flavonoïdes et coxibs*) ont été converti en format *pdb* à l'aide du logiciel Discovery Studio 2021 ;

- Une optimisation géométrique de tous les ligands a été effectuée avec la méthode DFT : B3LYP /6-31G (d,p) implanté dans Gaussian 09, pour déterminer la conformation la plus stable.
- A l'aide de l'interface AutoDock Tools des hydrogènes polaires ont été ajoutés aux ligands ;
- Par la suite ces derniers ont été enregistrés sous format *pdbqt* préparés pour l'étape du docking moléculaire.

Les structures sont représentées dans l'**annexe1**.

III.3.Génération des grilles tridimensionnelle (Grid Box) des récepteurs

L'AutoDock Vina utilise une boîte tridimensionnelle (3D) englobant le site actif de la cible. Le centre de cette boîte est déterminé par des coordonnées : X, Y, Z et des dimensions qui sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés. Une fois les coordonnées sont remplies, la boîte devient centrée sur le ligand au niveau du site actif. Toutes ces informations peuvent être sauvegardées dans un fichier texte (**Figure1, Tableau1**).

L'étape suivante c'est l'exécution des instructions pour calculer l'affinité entre les différents types d'atomes de la protéine et le ligand considéré. Les résultats sont générés dans un fichier texte avec l'extension *pdbqt*.

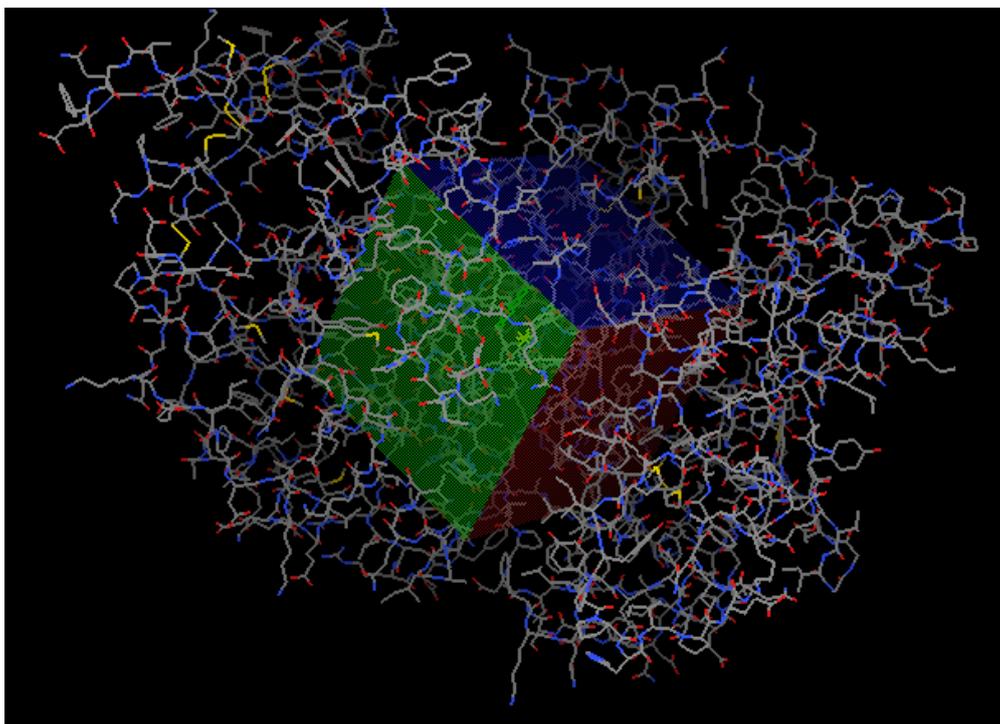


Figure 1 : Positionnement de la Grid Box dans le site actif.

Tableau 1 : Les boîtes GRID BOX des protéines.

Récepteur	Centre X (Å°)	Centre Y (Å°)	Centre Z (Å°)	Démentions (Å ³)	Affinité (kcal/mol)
1CX2	28.612	28.603	9.142	40x40x40	-8.4
3LN0	26.339	23.831	15.386	40x40x40	-8.6
3LN1	30.597	-22.559	-15.758	40x40x40	-12.2
3NT1	-40.957	-51.293	-22.318	40x40x40	-7.2
4OTJ	71.166	14.810	138.987	48x48x60	-9.3
5F1V	38.399	28.789	237.447	40x40x40	-5.7
5IKV	166.688	186.173	191.675	40x40x40	-8.7
5IKR	38.042	2.131	61.280	40x40x40	-7.2
5KIR	23.287	0.439	34.435	40x40x40	-7.6

IV. Résultats et interprétations

IV.1. Choix des cibles

Neufs récepteurs, à savoir : *1CX2*, *3LN0*, *3LN1*, *3NT1*, *4OTJ*, *5F1V*, *5IKV*, *5IKR* et *5KIR* ont été préparés pour l'amarrage moléculaire. Dont :

- *1CX2*, *3LN0*, *3LN1*, *3NT1*, *4OTJ* sont issus des souris, leurs ligands Co-cristallisés sont : S58, 52B, CEL, NPS et IXP respectivement ;
- *4OTJ*, *5F1V*, *5IKV*, *5IKR* et *5KIR* sont des protéines humaines co-cristallisées respectivement avec les ligands suivant : SAL, FLF, ID8 et RCX. Le Celecoxib (RCX) est un inhibiteur sélectif des COX-2.

Les recherches dans la PDB des structures cibles (COX-2) ont été basées sur les critères suivants :

- Présence d'un ligand co-cristallisé ;
- Résolution rayon X ($\leq 2\text{Å}$) ; à noter que la résolution en angström de la protéine est une des données reflétant la qualité des structures ayant permis de construire le modèle cristallographique.
- Absence de mutation.

Outre que ces critères conventionnels du choix des structures cibles, on ajoute :

A. Calcul RMSD

La prédiction de mode d'interaction qui consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme de réussir ce travail est

habituellement jugée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (Root Mean Square Deviation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du ligand de référence (co-cristallisé). le limite admis est $\leq 2\text{Å}$, au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate [1].

En calculant le RMSD de la meilleure pose du ligand de référence (après docking) avec son mode de liaison cristallographique (avant docking), les informations relatives aux complexes considérés sont résumées dans le **Tableau 2**. D'après ce tableau deux complexes ont été sélectionnés, 3NT1@NPX (animal) et 5IKR@ID8 (humaine), en raison de la haute résolution (1.73 Å et 2.34 Å respectivement) et le bon RMSD (0.5757 Å et 0.9385 Å respectivement), **Figure 2**.

Tableau 2 : Propriétés des COXs-2 et RMSD.

Enzyme Code PDB	Ligand Co-cristallisé	Chaîne	Résolution (Å)	Espèces	RMSD (Å)
1CX2	S58	A	3.00	Souris	18.8431
3LN0	52B	A	2.20	Souris	3.0531
3LN1	CEL	A	2.40	Souris	0.8838
3NT1	NPS	A	1.73	Souris	0.5757
4OTJ	IXP	A	2.11	Souris	24.0902
5F1A	SAL	A	2.38	Humaine	16.6014
5IKV	FLF	A	2.51	Humaine	16.2785
5IKR	ID8	A	2.34	Humaine	0.9385
5KIR	<u>RCX</u>	A	2.70	Humaine	14.6685

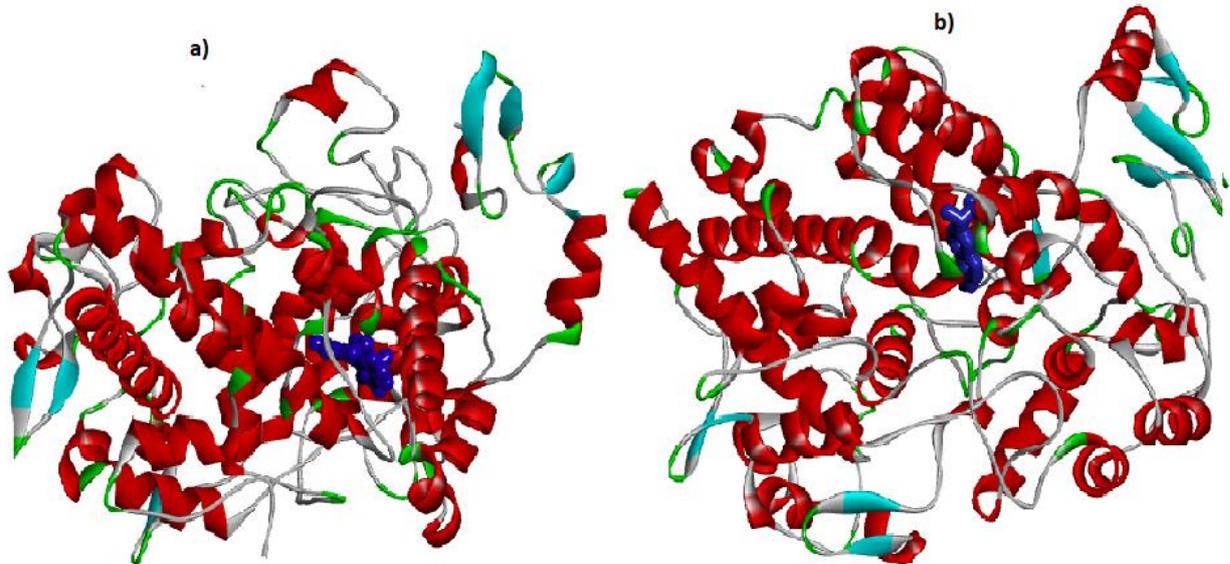


Figure 2 : Structure cristallographique de la chaîne A des complexes :
a)5IKR@ID8), b) 3NT1@NPX.Générée par la PDB.

B. Analyse visuelle

L'analyse visuelle à la suite du test RMSD, est une étape essentielle qui permet de juger les résultats décrits par la valeur numérique RMSD.

La visualisation des complexes sélectionnés, 5IKR et 3NT1 faite par Discovery (**Figure3** et **Figure 4** respectivement) montre que les ligands prédits par l'AutoDock vina (en vert) et les ligands de références (en bleu) sont parfaitement superposés et bien positionnés ce qui prouve leurs faibles valeurs de RMSD.

Le ligand prédit du complexe 3LN0 est mal positionné par rapport au ligand de référence (**Figure 5**).Ce qui confirme la valeur élevée du RMSD.

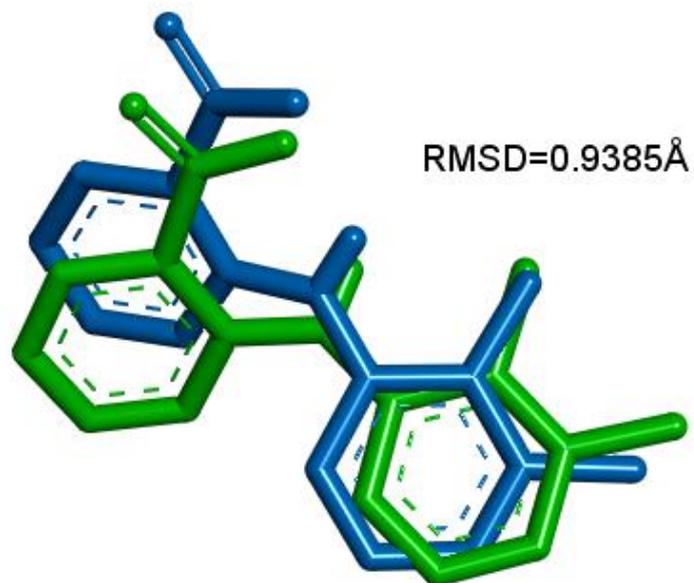


Figure 3 : Superposition du ligand ID8 du complexe 5IKR :
Couleur bleu X-ray, couleur vert résultat du docking.



Figure 4 : Superposition de la conformation de référence du ligand NPS (coloré en bleu) et celle du docking moléculaire (coloré en vert) du complexe 3NT1.

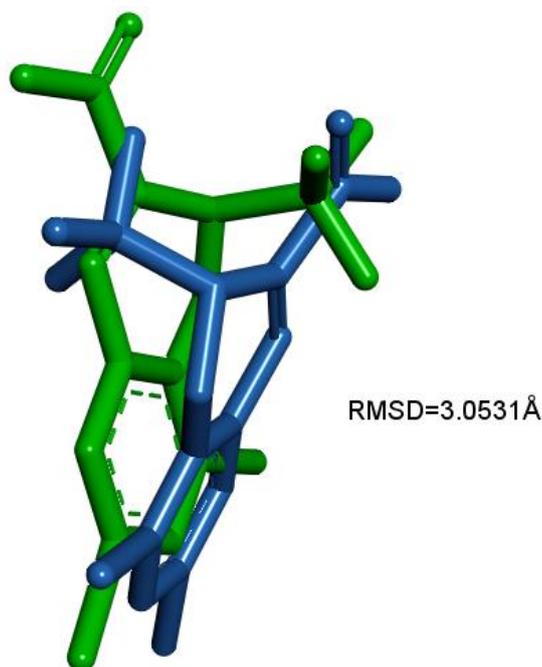


Figure 5 : Superposition de la conformation de référence du ligand 52B (coloré en bleu) et celle du docking moléculaire (coloré en vert) du complexe 3LN0.

IV.2 Amarrage moléculaire

Le logiciel AutoDock vina est basé sur le type de docking semi-flexible, le ligand étant considéré comme flexible et la chaîne principale de l'enzyme a été maintenue rigide, tandis que les chaînes latérales restent flexibles. Une fois que le complexe ligand- récepteur est formé, celui-ci va adapter la conformation la plus stable, c'est-à-dire avec le niveau énergétique le plus faible.

Les résultats du docking sont stockés dans un fichier OUT qui comporte dix poses pour chaque ligand. Le critère de sélection de la meilleure pose des poses est l'affinité, plus l'affinité est basse, plus le complexe ligand-récepteur est stable.

Les résultats d'amarage entre les cibles (5IKR et 3NT1) et les différents composés sont regroupés dans le tableau.3. D'après les énergies calculées par vina on résume :

- Le ligand L16a présenté une affinité maximale (-9.1kcal/mol) supérieur à celle des ligands de références (-7.2 kcal/mol pour chacun) et des médicaments (L36, L37 et L38).

- Les flavonoïdes ont présenté les meilleures affinités, alors ils sont favorisés pour l'inhibition.

Tableau3 : Résultats de calcul d'affinité.

Récepteurs	5IKR	3TN1	Récepteurs	5IKR	3TN1
Ligands	Affinité (kcal/mol)		Ligands	Affinité (kcal/mol)	
L1	-8.3	-8.5	L21	-8.4	-8.4
L2	-8.3	-8.4	L22	-7.3	-7.7
L3	-7.6	-7.4	L23	-8.3	-8.2
L4	-7.4	-7.5	L24	-8.1	-8.3
L5	-8.4	-8.8	L25	-8.1	-8.5
L6	-7.2	-7.5	L26	-8.5	-8.1
L7	-8.9	-8.5	L27	-7.8	-8.0
L8	-7.3	-7.2	L28	-8.1	-8.2
L9	-7.2	-7.2	L29	-8.2	-8.1
L10	-7.4	-7.7	L30	-8.3	-8.3
L11	-8.1	-8.6	L31	-8.3	-8.7
L12	-8.0	-8.2	L32	-7.6	-8.4
L13	-7.9	-8.4	L33	-7.0	-7.0
L14	-7.6	-8.0	L34	-7.7	-8.2
L15	-8.5	-8.1	L35	-8.5	-8.5
L16	-9.1	-8.4	L36	-7.5	-7.9
L17	-8.6	-8.8	L37	-7.4	-8.6
L18	-8.7	-8.5	L38	-8.0	-8.8
L19	-7.9	-8.1	L39	-7.2	
L20	-7.3	-7.6	L40		-7.2

Les résultats du docking entre les deux Coxs sélectionnées et les différents composés ayant présenté des résultats intéressants sont mentionnés sur les **Figure 6** et **Figure 7**.

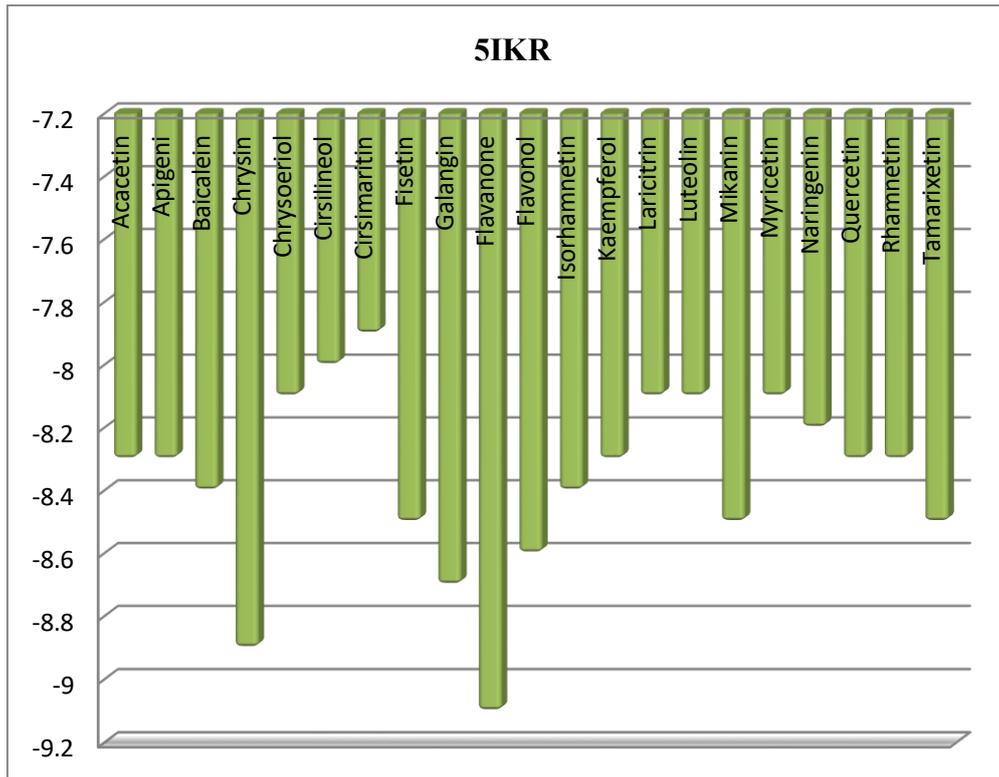


Figure 6 : Les composés ayant meilleurs affinités avec 5IKR.

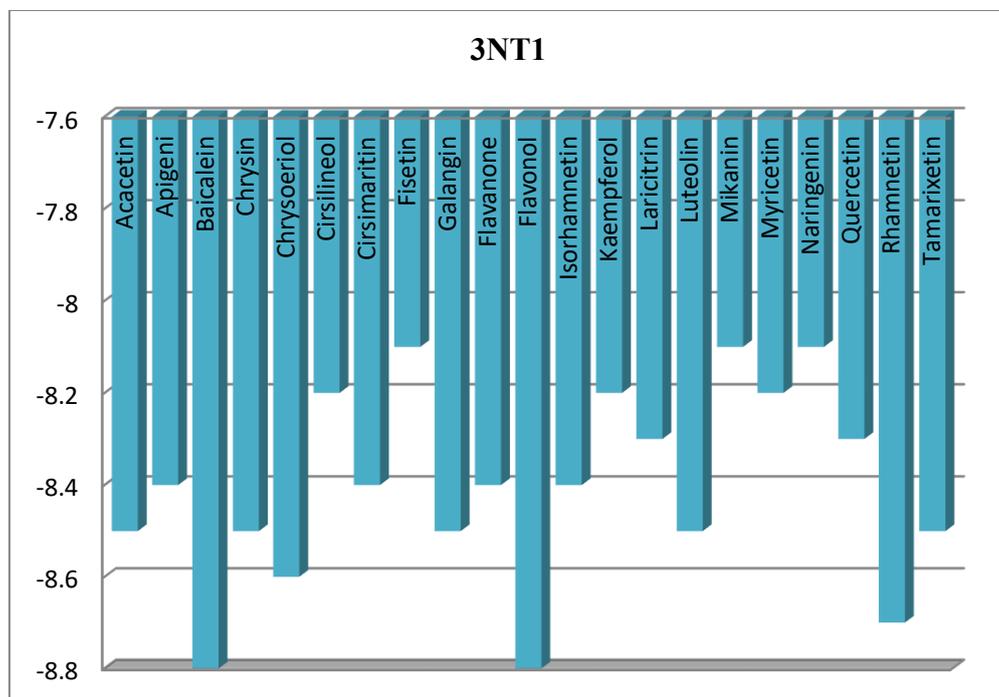


Figure 7 : Les composés ayant meilleurs affinités avec 3NT1.

D'après ces résultats, on classe la stabilité des complexes selon l'ordre croissant d'affinité : **récepteur@flavonoïdes < récepteur@coxibs < récepteur@ligand cocristallisé.**

Les meilleures affinités d'interaction du complexe 5IKR sont celles des ligands des classes différentes :

- L16, L7 et L18 avec des énergies d'interactions égales à : -9.1, -8.9 et -8.7 kcal/mol respectivement,
- L16 : flavanone,
- L7 : flavone (Chrysin) dihydroxylé en position 6 et 8.
- L18 : Galangin, de la famille des flavonols présent dans la racine de galanga, hydroxylé en position 3,6 et 8.

En revanche pour le complexe 3NT1 les meilleures énergies d'interaction sont celles des ligands : L5 (-8.8 kcal/mol), L17 (-8.8 kcal/mol) et L31 (-8.7 kcal/mol) d'où :

- L5 : de la famille des flavones (Baicalein, 5, 6,7-trihydroxyflavone)
- L17 : Flavonol
- L31 : Rhamnétin (un composé de la famille des flavonols, naturellement présent dans le giroflier.
- L5 et L17 ont les mêmes énergies d'interaction avec la protéine que celle du L38 (Rofecoxib).

On constate que :

- L'affinité (énergie d'interaction) se diffère d'une classe à autre
- Les complexes des flavonoïdes hydroxylés sont les plus stables que les autres classes des flavonoïdes et que les ligands de références.
- La substitution des flavonoïdes diminue la stabilité des complexes.
- Les ligands de références (L39 et L40) ont montré la plus faible affinité (-7.2 kcal/mol), à noter que le Naproxen (L40) est un puissant anti-inflammatoire non stéroïdien non sélectif largement utilisé comme médicament de prescription et en vente libre en tant qu'inhibiteur de la Cox-2.

Les flavonoïdes étudiés forment avec les cyclooxygénase-2 des complexes plus stables que leurs inhibiteurs sélectifs et leurs ligands de cristallisation. On peut conclure que cette famille des composés naturels peut inhiber fortement la COX-2.

IV.3 Les interactions protéine – ligand

Les résultats sont visualisés et étudiés à travers l'interface discovery.

1. Complexe 5IKR

a. Ligand de référence

L'étude de l'interaction (enzyme- ligand de référence) est importante pour faire la comparaison avec d'autres ligands. Le tableau suivant représenté les différentes interactions entre les résidus du site actif et le ligand de référence **ID8**.

D'après Anne Imbert et col, Les interactions ayant des distances comprises entre 2.5 Å et 3.1Å sont considérés comme fortes et celles comprise entre 3.1Å et 3.55Å sont supposées moyennes et quand leurs distances sont supérieures à 3.55Å elles sont considérées faibles [2].

L'analyse visuelle montre que le ligand de référence a formé deux liaisons hydrogène conventionnelles avec le site actif (**Figure 8, annexe 2**) :

- La première interaction de type H-donneur forte (entre le résidu **ARG120** et l'oxygène de ligand de référence) avec une distance 2.18 Å.
- La deuxième de type H-accepteur forte (entre le résidu **TYR355** et la fonction OH de ligand de référence) avec une distance 2.02 Å.
- Des liaisons hydrophobes sont formées avec les résidus **LEU93, VAL116, VAL89, LYS83, PRO86**.

Le complexe **5IKR – ID8** est stabilisé par : des interactions hydrogène et hydrophobes.

b. Inhibiteurs

L'analyse de l'amarrage a démontré que les inhibiteurs utilisés sont co-localisés dans la cavité de 5IKR par des liaisons hydrogènes conventionnelles et des interactions hydrophobes. La **Figure 8** illustre les interactions 3D et 2D de ces composés. On remarque que le meilleur inhibiteur, flavanone avec une énergie d'interaction -9.2 kcal /mol, est stabilisé par 2 liaisons hydrogènes avec les résidus : TRY385 (2.93Å) et SER530 (2.45 Å).

Et des interactions hydrophobes avec les acides aminés : ALA527, ARG120, LEU352 et VAL349.

Ces flavonoïdes se lient avec les acides aminés du site actif de la COX-2, via des interactions hydrogènes (SER530) et hydrophobes principalement avec : ALA527, GLY526, LEU352 et VAL349 (**Annexe 2**).

2. Complexe 3NT1

a. Ligand de référence

L'analyse visuelle de ce complexe montre que le ligand de référence a formé seulement des interactions hydrophobiques avec quatre résidus suivant : ALA202, HIS207, HIS386 et PHE210 (**Figure 9, annexe 2**).

b. Inhibiteurs

- Le ligand L5 :

Liaisons hydrogène de 2.35Å avec GLN203 et des interactions hydrophobes.

- Ligand 16 : interactions hydrophobiques
- Ligands 31 : deux liaisons hydrogènes ainsi que les liaisons hydrophobes.
- Les inhibiteurs sont localisés au site actif du 3NT1 en formant une liaison hydrogènes ou plus avec l'acide aminé GLN203 et des liaisons hydrophobes avec les résidus : presque avec tous les composés (annexe 2), ils sont positionnés dans la même région.

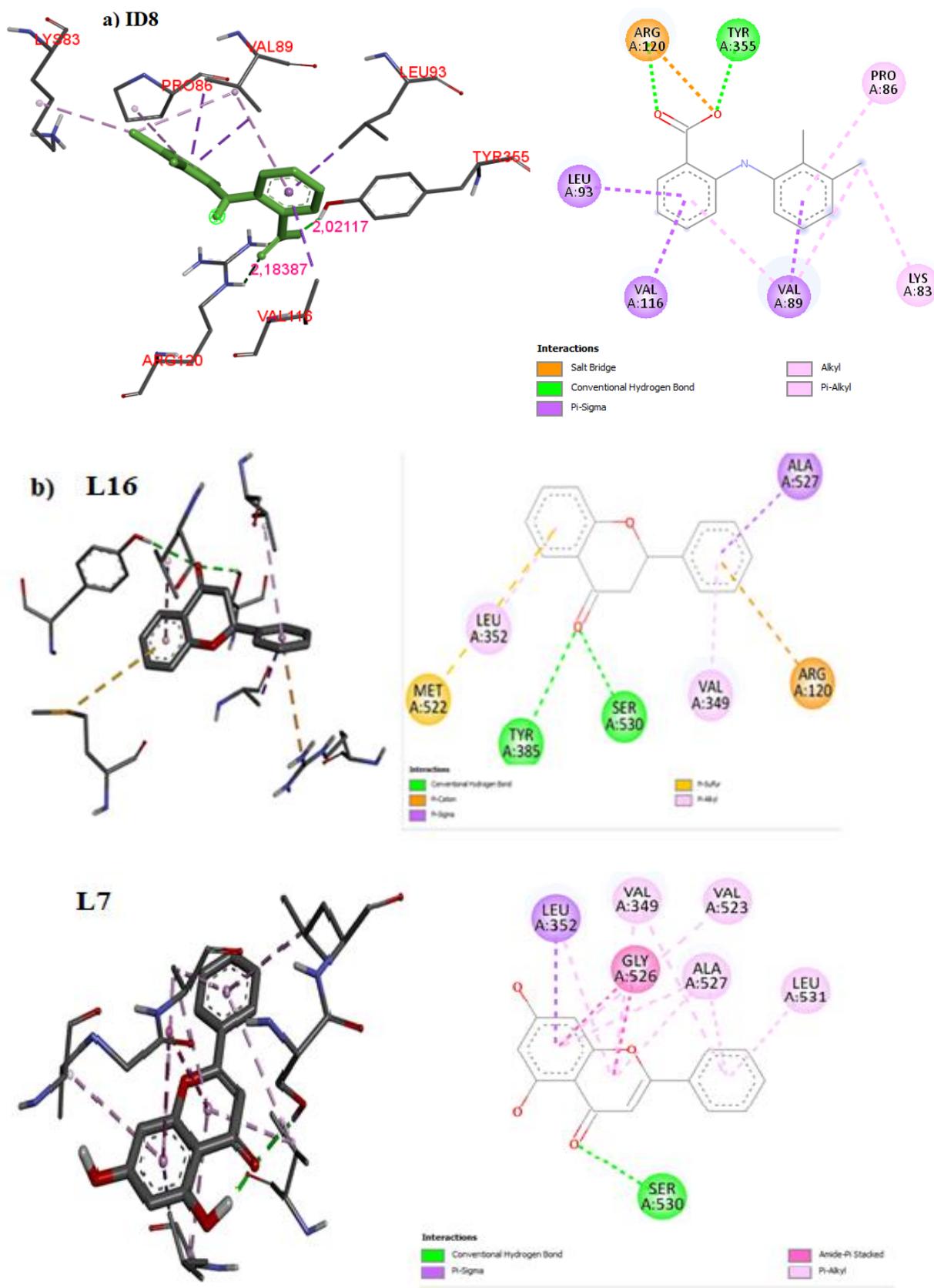


Figure 8 : Visualisation 3D et 2D des interactions de :
 a) ligand de référence, b) flavonoïdes ayant meilleures affinités avec les résidus du site actif de 5IKR.

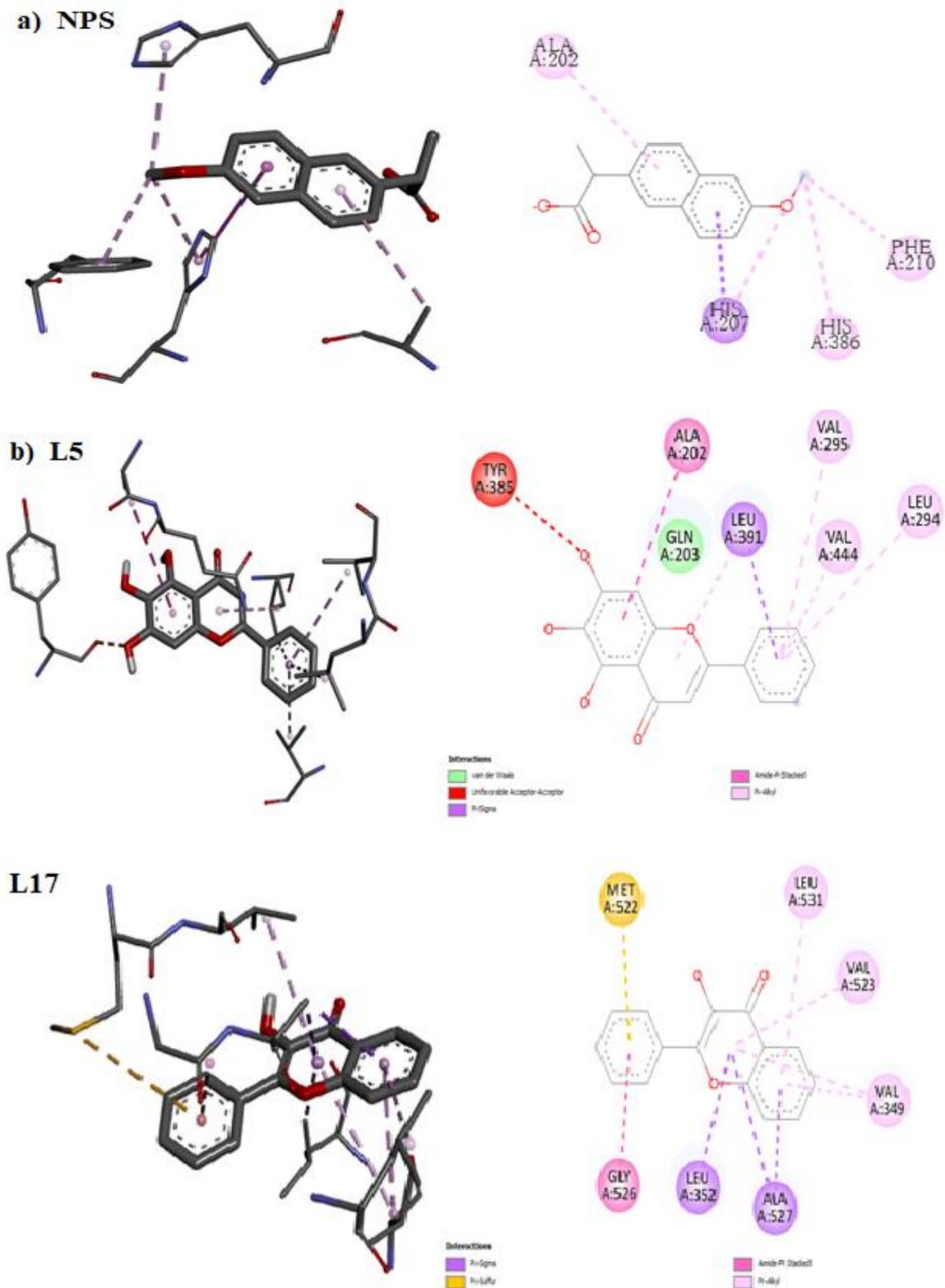


Figure 9 : Visualisation 3D et 2D des interactions de :
a) ligand de référence, b) flavonoïdes ayant meilleures affinités avec les résidus du site actif de 3NT1.

V. Les propriétés ADME

Les propriétés physico-chimiques telles que la solubilité et la lipophile jouent un rôle majeur dans la progression d'un médicament vers un candidat médicament réussi, ces calculs ont été effectués en utilisant le site SwissADME.

Les paramètres considérés pour mesurer le score sont :

- La lipophile ($0,7 < X \text{ Log } p < 5$),
- Le poids moléculaire (MW) ($150 < \text{MW} < 500 \text{ g/mol}$),
- Polarité ($20 < \text{TPSA} < 130$),
- Solubilité ($0 < \log S < -6$)
- Saturation ($0,25 < \text{Fraction Csp3} < 1$)
- Et flexibilité ($0 < \text{des liaisons rotatives} < 9$) [11].

Les propriétés physico-chimiques des flavonoïdes favorisés sont indiquées dans le **Tableau 4**.

A travers ce tableau :

- Tous les composés ont des valeurs de logP inférieurs à 5 donc ils ont une bonne solubilité dans l'eau, une élimination efficace par les reins et une bonne perméabilité à travers la membrane cellulaire
- Tous les composés ont le poids moléculaire inférieures à 500 g/mol, donc ils traversent facilement les membranes cellulaires, mais le composé L8 possède un poids moléculaire supérieur à 500g/mol.
- Tous les composés ont des valeurs de TPSA inférieur à 140 \AA^2 , ce qui montre la bonne prédiction de la biodisponibilité orale et le transport à travers les membranes. Les valeurs de nombre de liaisons rotatives sont inférieures à 10, donc ces composés sont capables de présenter une activité biologique sans avoir des problèmes d'absorption par voie orale.

Au final, nous pouvons conclure à partir des résultats et de l'analyse physico-chimique que les composés ont un meilleur profil ADME car ils répondent tous à la règle de Lipinski et Veber et ont une bonne biodisponibilité orale et sont résorbables car ils sont solubles. Cela facilite leur passage dans le système gastro-intestinal sans provoquer d'effets néfastes.

Tableau 4 : Propriétés physicochimiques des composés ayant meilleur affinité
(Calcul ADME).

N°	Flavonoïde	MW (g/mol)	LOGP	TPSA Å ²	HBD	HBA	RB	MR	Règle Lipinski	Règle Veber
L5	Baicalein	270.24	1.89	90.90	3	5	1	73.99	Oui	Oui
L7	Chrysin	254.24	2.27	70.67	2	4	1	71.97	Oui	Oui
L16	Flavanone	224.25	2.41	26.30	0	2	1	65.50	Oui	Oui
L17	Flavonol	238.24	2.44	50.44	1	3	1	69.94	Oui	Oui
L18	Galangin	270.24	2.08	90.90	3	5	1	73.99	Oui	Oui
L31	Rhamnetin	316.26	2.23	120.36	4	7	2	82.50	Oui	Oui

Références

- [1] Chikhi, A., & Bensegueni, A. (2008). Comparative study of the efficiency of three protein-ligand docking programs. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*, 1, 161-165.
- [2] Imberty, A., Hardman, K. D., Carver, J. P., & Perez, S. (1991). Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. *Glycobiology*, 1(6), 631-642.

Conclusion générale

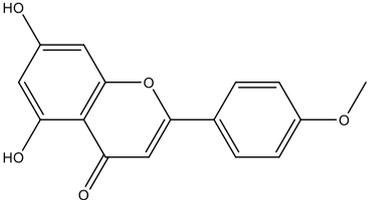
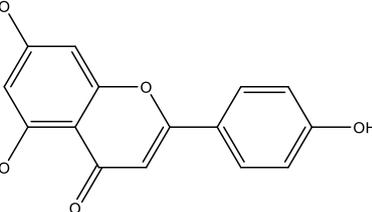
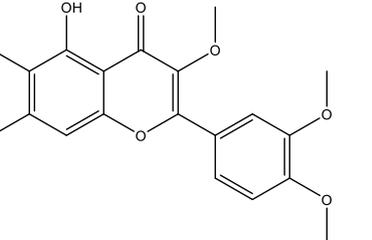
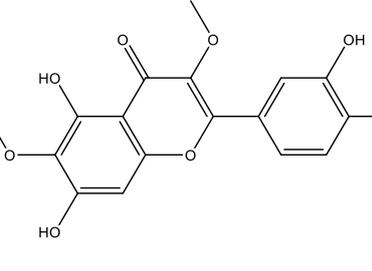
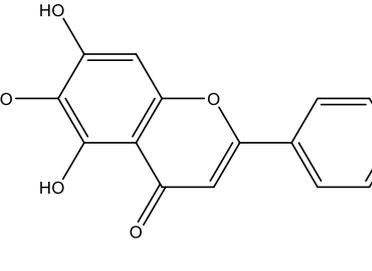
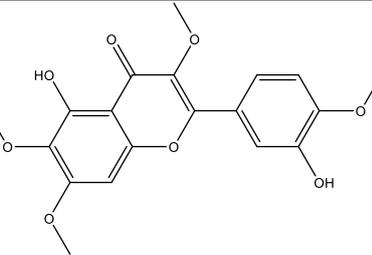
L'objectif principal de ce travail est l'étude *in silico* de l'activité biologique des composés présents dans notre alimentation quotidienne. Dans ce contexte les flavonoïdes sont donc choisis à cause de leur grande variété de structures et d'activités biologiques, dont une activité anti-inflammatoire via une inhibition de la COX-2.

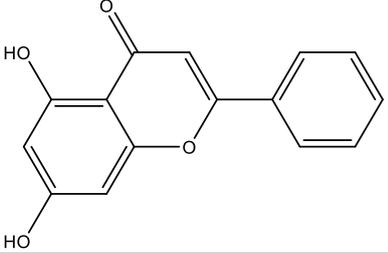
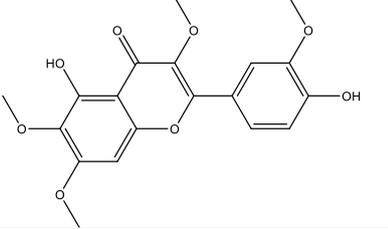
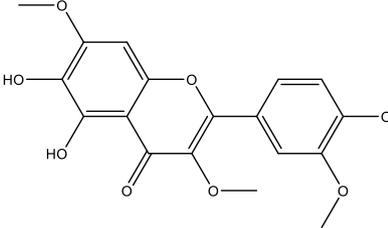
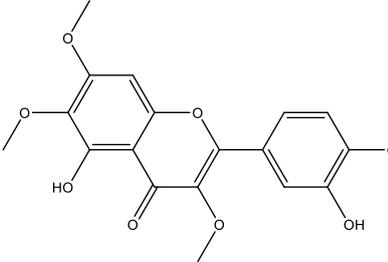
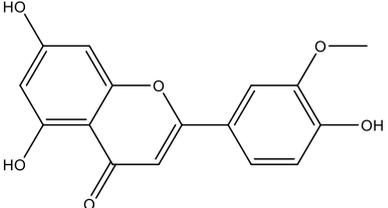
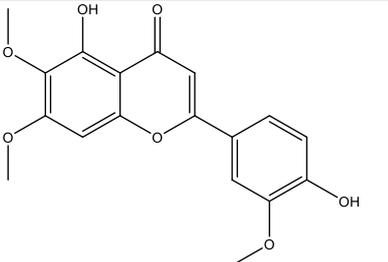
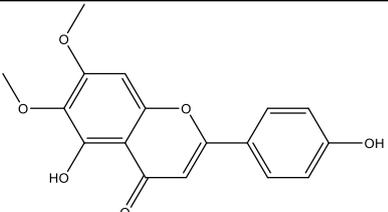
L'étude a été réalisée en faisant appel aux approches de modélisation des interactions enzyme- inhibiteur par Docking moléculaire. Ces méthodes permettent de rechercher *in silico* le mode d'interaction le plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur (cible thérapeutique) ce qui aide à la prédiction de molécules en un temps limité et surtout parfois sans avoir à synthétiser celles-ci.

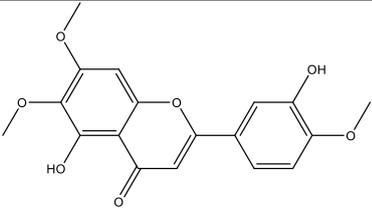
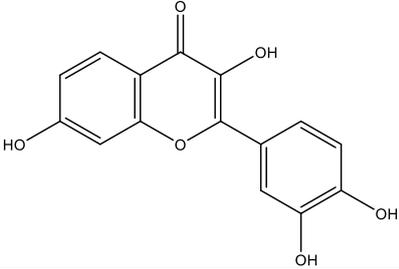
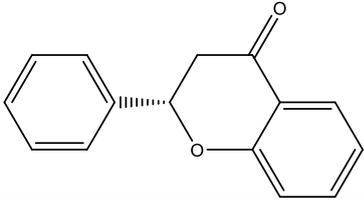
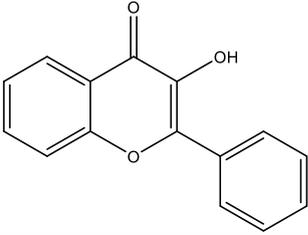
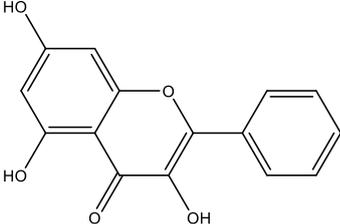
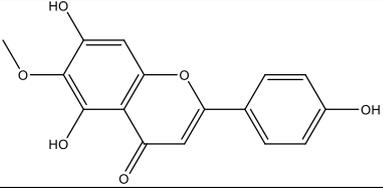
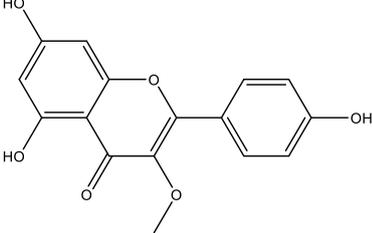
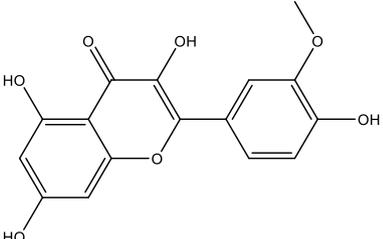
- Autodock vina, nous a permis de reproduire la conformation géométrique du ligand de référence et donc ce logiciel présente une fiabilité dans ce domaine de modélisation.
- Les résultats d'amarrage moléculaire ont montré que les composés flavonoïdes présentent une bonne affinité avec les deux différentes COX-2, à savoir 5IKR (humaine) et 3NT1 (animal).
- Presque tous les composés étudiés ont meilleure activité inhibitrice que les composés de références.
- De point de vue énergétique la stabilité des complexes est attribuée aux liaisons hydrogènes et aux interactions hydrophobiques.
- Les composés possèdent de bons profils ADME et présentent de bonnes propriétés physicochimiques en répondant à la règle de Veber et Lipinski.

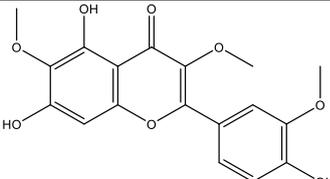
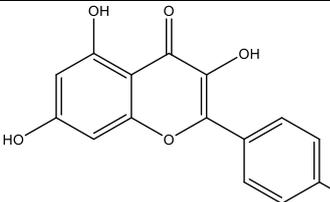
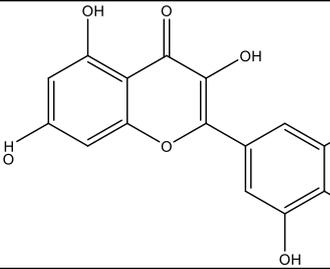
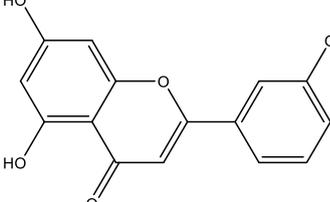
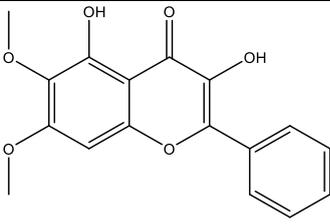
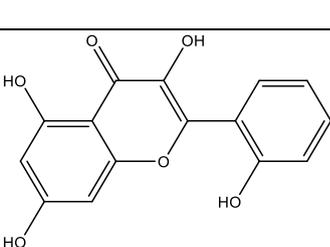
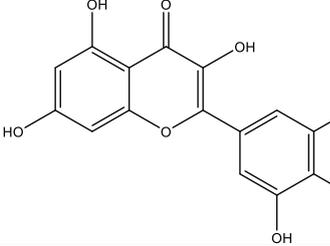
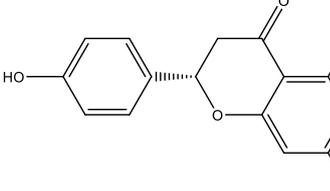
Ce travail est une étude préliminaire à la recherche de nouvelles molécules bioactives ayant un intérêt thérapeutique. Les résultats obtenus valident l'utilisation de ces composés en médecine et en pharmacologie et doivent être complétés par des essais "in vitro" et "in vivo" pour confirmer et prouver ses efficacités.

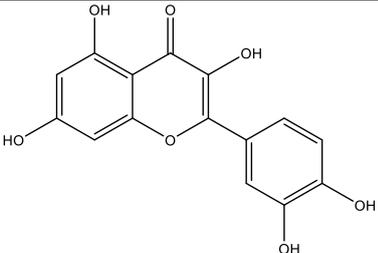
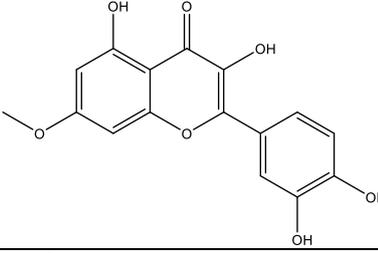
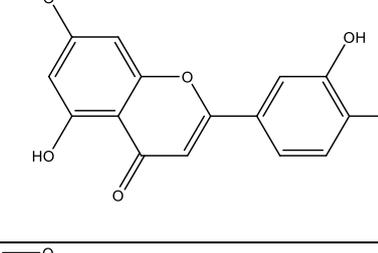
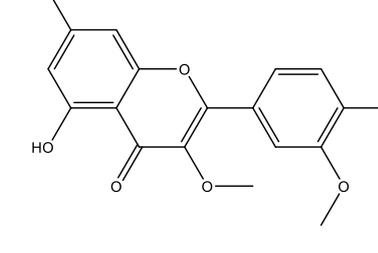
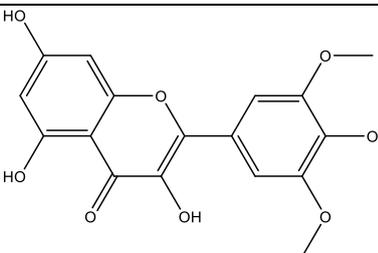
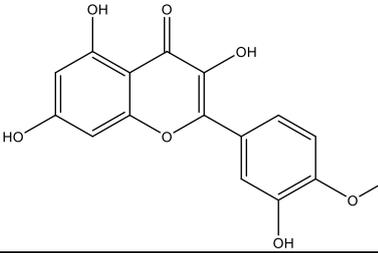
Annexe 1 : Structures 2D et propriétés des ligands étudiés.

N°	Ligands	Masse Molaire (g/mol)	Formule	structure 2D
L1	Acacetin	284.26	$C_{16}H_{12}O_5$	
L2	Apigenin	270.24	$C_{15}H_{10}O_5$	
L3	Artemetin	388.4	$C_{20}H_{20}O_8$	
L4	Axillarin	346.3	$C_{17}H_{14}O_8$	
L5	Baicalein	270.24	$C_{15}H_{10}O_5$	
L6	Casticin	374.3	$C_{19}H_{18}O_8$	

L7	Chrysin	254.24	$C_{15}H_{10}O_4$	
L8	Chrysoflenetin	374.3	$C_{19}H_{18}O_8$	
L9	Chrysoflenol-C	360.3	$C_{18}H_{16}O_8$	
L10	Chrysoflenol-D	360.3	$C_{18}H_{16}O_8$	
L11	Chrysoeriol	300.26	$C_{16}H_{12}O_6$	
L12	Cirsilineol	344.3	$C_{18}H_{16}O_7$	
L13	Cirsimaritin	314.29	$C_{17}H_{14}O_6$	

L14	Eupatorin	344.3	$C_{18}H_{16}O_7$	
L15	Fisetin	286.24	$C_{15}H_{10}O_6$	
L16	Flavanone	224.25	$C_{15}H_{12}O_2$	
L17	Flavonol	238.24	$C_{15}H_{10}O_3$	
L18	Galangin	270.24	$C_{15}H_{10}O_5$	
L19	Hispidulin	300.26	$C_{16}H_{12}O_6$	
L20	Isokaempferide	300.26	$C_{16}H_{12}O_6$	
L21	Isorhamnetin	316.26	$C_{16}H_{12}O_7$	

L22	Jaceidin	360.3	$C_{18}H_{16}O_8$	
L23	Kaempferol	286.24	$C_{15}H_{10}O_6$	
L24	Laricitrin	332.26	$C_{16}H_{12}O_8$	
L25	Luteolin	286.24	$C_{15}H_{10}O_6$	
L26	Mikanin	344.3	$C_{18}H_{16}O_7$	
L27	Morin	302.23	$C_{15}H_{10}O_7$	
L28	Myricetin	318.23	$C_{15}H_{10}O_8$	
L29	Naringenin	272.25	$C_{15}H_{12}O_5$	

L30	Quercetin	302.23	$C_{15}H_{10}O_7$	
L31	Rhamnetin	316.26	$C_{16}H_{12}O_7$	
L32	Rhamnocitrin	300.26	$C_{16}H_{12}O_6$	
L33	Retusin	358.3	$C_{19}H_{18}O_7$	
L34	Syringetin	346.3	$C_{17}H_{14}O_8$	
L35	Tamarixetin	316.26	$C_{16}H_{12}O_7$	

L36	Celecoxib	381.4	$C_{17}H_{14}F_3N_3O_2S$	
L37	Rofecoxib	314.4	$C_{17}H_{14}O_4S$	
L38	Valdecoxib	314.4	$C_{16}H_{14}N_2O_3S$	
L39	ID8	241.28	$C_{15}H_{15}NO_2$	
L40	Naproxen	230.26	$C_{14}H_{14}O_3$	

Annexe2: Interactions ligands-proteines.

N°	Récepteur	5IKR			3NT1		
		H-bands		Hydrophobe	H-bands		Hydrophobe
		Résidue	Distance	Résidue	Résidue	Distance	Residue
L1	Acacetin	SER530	2.06	LEU352 GLY526 VAL349 ALA527 TYR355 VAL116	GLN203	1.80	LEU294 LEU408 LEU391 VAL444 ALA202
L2	Apigenin	SER530	2.07	LEU352 GLY526 VAL349 ALA527 ELU531	GLN203 THR206	2.29 3.90	VAL444 LEU391 ALA202
L5	Baicalein	TYR385 ALA199	2.15 2.93	VAL295 HIS388 LEU391	TYR385 VDW GLN203	2.35	VAL444 LEU294 VAL295 LEU391 ALA202
L7	Chrysin	SER530	2.08	LEU352 GLY526 VAL349 VAL523 ALA527 ELU531	SER530 TYR385 VAL523	2.31 2.77 3.02 5.31	TYR355 LEU531 VAL116 VAL349 VAL527 GLY526 Leu352
L11	Chysoeriol	SER530	2.09	LEU352 GLY526 VAL349 VAL523 PHE518 ALA527 ELU531 ELU359 ILE345	GLN203 THR206 ALA199	3.88 3.02 2.16	VAL295 LEU408 PHE404 VAL444 LEU391 ALA202
L12	Cirsilineol	VDW GLN203		HIS386 HIS388 HIS207 ALA202 LEU391 VAL447	HIS386 VAN DE WAAL GLN203	2.48	HIS214 VAL447 HIS388 HIS207 ALA202 LEU391
L13	Cirsimaritin	ALA199 ASN382	2.27 2.74	HIS388 HIS386			HIS386 HIS207

		VDW GLN203		HIS207 VAL447 ALA202			LEU391 VAL444
L15	Fisetin	SER353	3.31	LEU352 GLY526 VAL349 VAL523 ALA527 ELU531 ELU359	GLN203 TRP387	3.07 2.17 3.59	HIS388 LEU391 VAL295 VAL444 LEU408 LEU294
L16	Flavanone	SER535 TRY385	2.45 2.93	ALA527 ARG120 VAL349 LEU352	GLN203	3.31	VAL295 LEU391 ALA202 LEU531 VAL523 VAL349 ALA727 LEU352 GLY526
L17	Flavonol	SER530	3.63	ALA527 ARG120 VAL349 LEU352 LEU359 LEU531	GLN203 TYR385	3.53 2.33	VAL295 LEU391 HIS388 ALA202
L18	Galangin	SER530	2.080	LEU531 LEU352 VAL349 VAL523 ALA527 GLY526	GLN203 TYR385	3.53 2.33	VAL295 LEU391 HIS388 ALA202
L19	Hispidulin	ALA199 ASN382 VDW GLN203	2.09 2.73	HIS388 HIS386 HIS207 HIS214 ALA202	HIS368 VDW GLN203	3.54	ALA202 HIS207
L20	Isokaempferide	LYS83 SER119 GLU524	2.68 2.12 3.32	GLU524 VAL116 TYR115 VAL89 LEU123 ARG120	HIS207 GLN203 ALA199	3.59 3.26 3.65 2.02	ALA202 HIS388 VAL295 LEU391 VAL444
L21	Isorhamnetin	TYR385 THR212 VDW GLN203	2.93 2.22	HIS388 HIS386 HIS207 ALA202 LEU391	THR206 VDW GLN203	2.74	ALA202 HIS207 HIS386 LEU391 HIS388

L23	Kaempferol	SER530 PHE518	2.45 2.06 1.67	PHE518 LEU352 LEU531 VAL349 VAL523 GLY526 ALA527	VDW GLN203	2.69 2.43	ALA202 HIS207 HIS386
L24	Laricitrin	SER581 PHE580 ASP347 GLU346 GLN192	2.75 2.29 3.02 1.83 2.21	GLY350	VDW GLN203		ALA202 HIS386 HIS207 HIS388 LEU391
L25	Luteolin	SER530	2.10	LEU531 VAL359 VAL532 LEU352 GLY526 ALA527	GLN203 TYR385 HIS207	3.84 2.75 3.65	ALA202 VAL295 LEU391 LEU294
L26	Mikanin	ASN382 TYR385	1.94 3.72	TYR385 HIS388 HIS386 HIS207 TRP387 ALA202 LEU391	GLN203 HIS207	2.32 3.39	HIS207 VAL295 LEU295 HIS388 LEU391 LEU390 ALA199 HIS386
L27	Morin	ASN382 TYR385	1.94 4.57 3.72	TRP385 ALA202 LEU391 HIS388 HIS386 HIS207	GLN203 HIS207	3.56 2.35	LEU391 ALA202 HIS388 VAL444
L28	Myricetin	THR212 VDW GLN203	2.86	HIS207 HIS386 HIS388 ALA202	TYR385 HIS386 ASN382 VDW GLN203	2.49 2.18 2.47	HIS386 HIS207 ALA202
L29	Naringenin	VDW GLN203		VAL295 LEU391 LEU294 ALA202 HIS388	HIS386 ASN382 VDW GLN203	3.54 2.65 1.93 2.48	HIS207
L30	Quercetin	TRP387 HIS388	2.58 3.43 3.63	HIS386 HIS207 ALA202 HIS388	HIS386 ASN382	2.50 2.40	HIS386 HIS207 ALA202

L31	Rahmnetin	THR212 TRP387 KIS388	2.94 2.75 3.65	HIS388 ALA202 HIS207 HIS386 VAL447	ASP125 APG44 GLN42 GLU465	1.99 3.42 3.60 1.91	APG44 LEU152 LYS468
L32	Rhamnocitrin	VAL523 TYR385	2.88 1.92	LEU531 VAL444 VAL349 LEU352 GLY526 ALA527 TYRY348 VAL523	VDW GLN203		VAL295 VAL444 LEU391 ALA202 HIS207 HIS388 HIS386
L35	Tamarixetin	ALA151 ARG469 ARG44 GLU465 GLN42 LIS468 ASP125	2.22 2.32 2.64 1.83 3.10 2.94 3.11	LIS468	GLU465 ARG44 ASP125 TYR130 GLU46	2.05 3.38 2.50 3.57 3.07	ARG44 TYR130 LYS468 LEU152
L36	Celecoxib	HIS207 ASN222 THR212 GLIN286 LYS211 ASN382 Halogène HIS386 ASN382	3.28 2.43 2.17 3.36 2.32 3.66 2.43 3.21 2.85	LEU294 VAL291 LYS211 HIS386 HIS207	HIS207 GLN203	3.29 3.43 3.29	VAL444 LEU408 LEU294 VAL447 HIS388
L37	Rofecoxib	ARG120	3.06	ILE112 TYR115 VAL89	GLN203	3.49	VAL295 LEU391 HIS388
L38	Valdicoxib	TYR115 LYS83 ARG120 PRO86 GLU524	2.08 3.60 1.97 1.92 2.10	LYS83 GLU524 PRO86 ARG120 PRO VAL89	GLN203 HIS207	3.35 3.38 3.52	LEU391 VAL447 VAL295 LEU294 HIS388
L39	ID8	AGR120 TRY533	2.18 2.02	AGR120 LYS83 VAL89 VAL116 LEU93			
L40	Naproxen						ALA202 HIS207 HIS386 PHE210