

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



L1940 125

Spécialité : Chimie Physique

Présenté par :

SAIDI Meriem

Etude des interactions ligand_récepteur par modélisation moléculaire

Sous la Direction de :
Dr. LACHI Nadia

Juin 2018

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 :
SAIDI Meriem

Etude des interactions ligand_ récepteur par modélisation moléculaire

Sous la Direction de :
Dr. LACHI Nadia

Juin 2018

Résumé

L'inflammation est un phénomène affectant des millions de personnes à travers le monde. Il existe une grande variété de médiateurs inflammatoires impliqués dans différentes fonctions biologiques, dont la cyclooxygénase-2.

De nos jours, les méthodes *in silico* sont de plus en plus employées dans les stratégies de découverte de nouvelles molécules à visée thérapeutique. Au cours de ce travail, nous nous sommes appuyés sur les méthodes de docking afin d'étudier l'inhibition du COX-2 par le cyclocoumarol et ses dérivées.

Mots clés : COX-2, docking moléculaire, cyclocoumarol, inhibiteurs.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au laboratoire de chimie computationnelle et nanostructure .

Je remercie sincèrement, mon encadreur, M^{me} LACHI Nadia , de m'avoir donné la possibilité de réaliser ce mémoire de Master, orienté, conseillé et encouragé tout au long de la réalisation de ce travail.

J'exprime mes sincères gratitude à M^{lle}. CHEREIT Mouna, pour son aide à se familiariser avec le logiciel Autodock Vina, ses explications concernant les résultats, sa patience et sa disponibilité.

Je tiens à remercier tous les enseignant du département des sciences de la matière, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Enfin, mes remerciements sont également adressés à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Tout d'abord louange à ALLAH qui m'a guidé sur le droit chemin durant la réalisation de ce mémoire. Je dédie ce travail à tous ceux qui ont, de près et de loin, m'ont accordé leur soutien moral ou physique.

A celle qui s'est toujours dévouée et sacrifiée pour moi ; celle qui m'a aidé du mieux qu'elle pouvait pour que je réussisse; celle qui a toujours été là à mes côtés à tout moment pour que j'atteigne ce niveau-là., ma mère *Nora*.

A celui qui m'a toujours encouragé et soutenu moralement, mon père *Fateh* qui a consenti beaucoup de sacrifices pour que j'atteigne mes objectifs.

A mon marie, *Mohcen* qui m'a inculqué le courage, l'espoir, et la tendresse.

A mon frère *Malk*, à mes sœurs *Aida*, *Malek*, *Chahd*, et ma petite fille *Ghouzlen Ilène* qui m'ont énormément aidé et à qui je témoigne mon affection et ma profonde reconnaissance.

Que Dieu le tout puissant vous accorde longue vie, bonne santé et bonheur à nos côtés et qu'il puisse me donner les moyens nécessaires pour affronter les épreuves de la vie ; AMEN !

A mes oncles et à toute ma grande famille. A toutes mes amies et mes camarades. A tous les personnes ayant participé à ce travail,

Meriem

Sommaire

Sommaire

| | |
|---|----------|
| Liste des Figures | |
| Liste des Tableaux | |
| Liste des Abréviations | |
| Résumé | |
| Introduction générale..... | 1 |
| Référence bibliographique | 3 |
| <i>Chapitre I : Les Cyclooxygénases</i> | |
| 1. Généralités | 4 |
| 2. Iso-enzymes de la cyclooxygénase | 5 |
| 2.1. La Cyclo-Oxygénase-1(COX-1) | 5 |
| 2.2. La Cyclo-Oxygénase-2(COX-2)..... | 6 |
| 2.3. La Cyclo-Oxygénase-3(COX-3)..... | 7 |
| 3. l'acide arachidonique | 8 |
| 4. Fonction de la cyclooxygénase | 8 |
| 5. Les inhibiteurs de la cyclooxygénase | 9 |
| 5.1. Inhibiteurs Irréversibles | 9 |
| 5.2. Inhibiteurs Réversibles | 10 |
| 5.3. Les inhibiteurs naturels | 10 |
| 5.4. Les inhibiteurs synthétiques | 10 |
| <i>Chapitre II : Docking Moléculaire</i> | |
| 1. Introduction | 13 |
| 2. Définition | 13 |
| 3. Les étapes du docking | 14 |
| 3.1. Recherche conformationnelle (searching) | 14 |
| A. L'approche classique..... | 14 |
| B. L'approche rationnelle | 14 |
| 3.2. Le scoring | 14 |
| 4. Les algorithmes de recherche | 15 |
| 4.1. Matching (Simulation par fragmentation incrémentale) | 15 |

| | |
|--|----|
| 4.2. Algorithme génétique (Simulation par trajectoire)..... | 15 |
| 5. Les Fonctions de score | 15 |
| 5.1. Les fonctions basées sur les champs de force | 16 |
| 5.2. Les fonctions basées sur les connaissances (knowledge-based) | 16 |
| 5.3. Les fonctions empiriques | 16 |
| 6. Les interactions protéine-ligand | 16 |
| 6.1. Les forces de Van Der Waals | 16 |
| 6.2. L'effet hydrogène | 18 |
| 6.3 L'effet hydrophobe | 18 |
| 6.4. Les interactions électrostatiques | 18 |
| 7. Les outils | 19 |
| 7.1. Récepteur | 19 |
| 7.2. Ligand | 20 |
| 7.3. Programmes | 20 |

Chapitre III : Résultats et discussion

| | |
|---|----|
| 1. Introduction | 23 |
| 2. Présentation des molécules étudiées | 23 |
| 2.1. Le cyclocoumarol | 23 |
| 2.2. Les dérivés du cyclocoumarol | 24 |
| 3. Méthodologie | 25 |
| 3.1. Logiciel | 25 |
| 3.2. Préparation des enzymes | 25 |
| 3.3. Préparation des ligands | 28 |
| 4. Résultats et discussion | 28 |
| 4.1. Calcul RMSD | 28 |
| 4.2. Docking du cyclocoumarol | 29 |
| 4.3. Interaction dérivées du cyclocoumarol- COX | 32 |
| 5. Interaction ligand- 5IKV | 34 |
| Annexe 01 | |
| Annexe 02 | |

Liste des Figures

| <i>N°</i> | <i>Intitulé des Figure</i> | <i>page</i> |
|--|---|-------------|
| <i>Chapitre I : Les Cyclooxygénases</i> | | |
| Figure I.1 | Site actif du COX-1 (a) et COX-2 (b) | 5 |
| Figure I.2 | Représentation schématique des sites actifs COX-1 et COX-2 (les résidus conservés entre les deux isoformes sont représenté en noir) | 7 |
| Figure I.3 | Métabolisme de l'acide arachidonique et synthèse des prostaglandines | 9 |
| <i>Chapitre II : Docking Moléculaire</i> | | |
| Figure II.4 | Principe générale d'un docking moléculaire | 13 |
| Figure II.5 | Les forces de Van Der Waals | 17 |
| Figure II.6 | Interactions hydrophobes | 17 |
| Figure II.7 | La liaison hydrogène | 18 |
| Figure II.8 | Interaction électrostatique | 19 |
| <i>Chapitre III : Résultats et discussion</i> | | |
| Figure III.9 | Cyclocoumarol (en 3D à gauche et 2D à droite) | 23 |
| Figure III.10 | L'enzyme 3NTB non simplifié | 26 |
| Figure III.11 | l'enzyme 3NTB simplifiée (une seule chaîne) | 27 |
| Figure III.12 | Mode d'interactions cyclocoumarol-3NTB | 31 |
| Figure III.13 | Mode d'interactions dérivé D-3NTB | 33 |
| Figure III.14 | Mode d'interactions cyclocoumarol-5IKV | 35 |
| Figure III.15 | Mode d'interactions dérivé F -5IKV | 36 |

Liste des Tableaux

| <i>N°</i> | <i>Intitulé des Tableaux</i> | <i>page</i> |
|--|---|-------------|
| <i>Chapitre I : Les Cyclooxygénase</i> | | |
| Tableau I.1 | Différences entre les deux isoformes des Cyclooxygénase | 7 |
| <i>Chapitre III : Résultats et discussion</i> | | |
| Tableau III.2 | Les dérivés du cyclocoumarol | 24 |
| Tableau III.3 | La boîte GRID BOX des protéines | 27 |
| Tableau III.4 | Calcul du RMSD | 29 |
| Tableau III.5 | Résultats de docking moléculaire Cyclocoumarol-COXs | 29 |
| Tableau III.6 | Différentes interactions cyclocoumarol- COXs | 30 |
| Tableau III.7 | Différentes interactions dérivés- 3NTB | 32 |
| Tableau III.8 | Différentes interactions ligands- 5IKV | 34 |

Liste des Abréviations

3D : tridimensionnelle

AA : acide arachidonique

AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens

COX : cyclooxygénase

LOX : lipoxygénases

MM : modélisation moléculaire

PDB : protéine Data Bank

PG : prostaglandine

PGD2 : prostaglandine D2

PGE2 : prostaglandine E2

PGF2 α : prostaglandine F2 α

PGHS : prostaglandine synthèse

PGI2 : prostaglandine I2

PLA2 : phospholipase A2

POX : peroxydase

RMN : résonance magnétique nucléaire

TXA2 : thromboxanes A2

List des acides aminés

Ala : Alanine

Arg : Arginine

Asn : Aspartate ou acide aspartique

Asp : Asparagine

Cys : Cystéine

Liste des Abréviations

Gln : Glutamine

Glu : Glutamate ou acide glutamique

Gly : Glycine

His : Histidine

Ile : Isoleucine

Leu : Leucine

Lys : Lysine

Met : Méthionine

Phe : Phénylalanine

Pro : Proline

Ser : Serine

Thr : Thréonine

Trp : Tryptophane

Tyr : Tyrosine

Val : Valine

Introduction générale

Introduction générale

Comprendre et prédire les mécanismes d'interactions macromoléculaires ainsi que leurs possibles modifications avec le temps, le milieu, ou encore les maladies, représente un enjeu inestimable dans le domaine de la santé et de la recherche pharmaceutique.

En se maintenant au niveau moléculaire, la biologie s'appuie dans un premier temps sur les méthodes expérimentales pour identifier des protéines, leur structure et leur affinité. Une telle approche ne peut cependant pas convenir à l'étude d'un grand nombre d'interactions, toutes les interactions moléculaires ne pouvant être identifiées par des études expérimentales, longues et coûteuses.

La voie informatique présente une bonne alternative aux limites expérimentales : la recherche *in silico* est actuellement extrêmement active, son essor laisse présager son importance et son caractère incontournable dans les années à venir.

Les méthodes informatiques utilisées à l'heure actuelle ont deux objectifs : d'une part étudier la structure tridimensionnelle et les changements conformationnels d'une molécule, et d'autre part simuler les mécanismes d'amarrage moléculaire, ou docking qui est une des méthodes de la modélisation moléculaire.

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

C'est dans ce contexte, qu'on s'est intéressé à étudier et caractériser de point de vue structural les interactions entre la Cyclooxygénase 2 (COX-2) et divers ligands choisis : le cyclocoumarol (utilisée en thérapeutique en tant qu'anti-coagulant et présente des propriétés anti inflammatoire) et certains de ses dérivés inhibant sélectivement la COX-2 [1-3].

La COX-2 est une enzyme dont la fonction principale est la synthèse des prostaglandines (médiateurs de l'inflammation) à partir de l'acide arachidonique (AA). Les inhibiteurs de la COX-2 sont des médicaments pris pour soulager les symptômes de l'inflammation et de la douleur en bloquant la fonction de cette enzyme.

Le présent travail est organisé comme suit :

Chapitre 01: consacré à la présentation de la cible COX-2. Il s'agit de comprendre l'intérêt de cette enzyme en tant que cible thérapeutique, d'étudier la structure de son site actif (forme, taille...etc) afin de pouvoir cibler les différents types de molécules capables de s'y insérer afin d'en modifier son activité.

Chapitre 02 : concernera le docking moléculaire (amarrage moléculaire).

Chapitre 03 : consacré à l'analyse et à l'interprétation des résultats obtenus aux cours de ce travail.

Et enfin, une conclusion générale pour clôturer le travail.

Références bibliographiques

[1] Marrero-Ponce, Y., Siverio-Mota, D., Galvez-Llompart, M., Recio, M.C., Giner, R.M., Garcia-Domenech, R., Torrens, F., Aran, V.J., Cordero-Maldonado, M.L., Esguera, C.V., de Witte, P.A.M., and Crawford, A.D., “Discovery of novel anti-inflammatory drug-like compound by aligning in silico and in vivo screening: The nitroindazolinone chemotype”. *Eur. J. Med. Chem.* 46 : p 5736-5753 (2011).

[2] Sylla-Iyarreta Veitía, M., Siverio-Mota, D., Lerari, V., Marín, M., Giner, R.M., Dumas, F., Ferroud, C., Vicet-Muro, L., Rivero-Guerra, Y., De Witte, P.A.M., Crawford, A.D., Arán, V.J., and Marrero-Ponce, Y., Fishing. “Anti-Inflammatories from Known Drugs: In Silico Repurposing, Design, Synthesis and Biological Evaluation of Bisacodyl Analogues as Potential Anti-Inflammatory Agents”. *Current topics in medicinal chemistry*, submitted (2016).

[3] RAYAR, A.M., “In silico drug design et chimie médicinale : développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2”. Thèse de doctorat : Bioinformatique : Paris, CNAM (2017).

Chapitre I:
Les Cyclooxygénases

1. Généralités

La cyclo-oxygénase, qu'on désigne par l'appellation COX; est l'enzyme prostaglandine synthase (PGHS) ,capable de convertir l'acide arachidonique AA, qui participe à la formation des membranes cellulaires, en prostaglandines, responsables de nombreuses fonctions physiologiques, notamment au niveau musculaire [1].

Deux isoformes de cette enzyme, issues de deux gènes différents ont été principalement identifiés et décrits. La cyclooxygénase de type 1 (PGHS-1 ou COX-1) et la cyclooxygénase de type 2 (PGHS-2ou COX-2), qui se ressemblent beaucoup, mais elles ont des fonctions biologiques différentes (**Figure I.1**).

Les deux enzymes ont une homologie de 60%. Les acides aminés essentiels sont conservés, les sites actifs comparables et les paramètres enzymatiques très proches. Il existe quelques différences en acides aminés dans le site actif des deux enzymes qui permettent à COX-2 de disposer d'un volume de 393 \AA^3 au lieu de 316 \AA^3 pour COX-1.

Des études ont également montré l'existence d'un troisième isoforme, la COX-3 [2]. Cependant, celle-ci ne semble pas être capable de produire des prostaglandines ayant une activité dans les tissus humains.

Le site actif de l'enzyme cyclooxygénase est de nature majoritairement hydrophobe.

Des acides aminés spécifiques à l'isoforme 2 délimitent une poche adjacente, certainement responsable de la sélectivité entre les deux iso-enzymes. La substitution de l'Ile523 (COX-1) par une Val523 (COX-2) ouvre un accès à une poche complémentaire contenant des résidus polaires. Ceux-ci sont capables de former un réseau de liaisons hydrogène avec un inhibiteur [3].

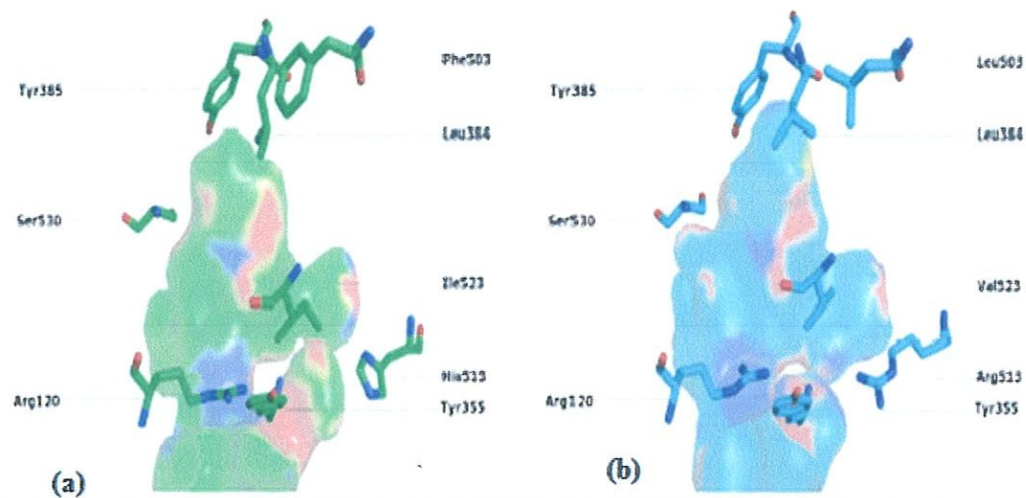


Figure 01: Site actif du COX-1 (a) et COX-2 (b)

2. Iso-enzymes de la cyclooxygénase

2.1. La Cyclo-Oxygénase-1(COX-1)

Représente la forme constitutive de l'enzyme. Elle est codée par un gène qui se localise sur le chromosome 9. Cette enzyme est hautement exprimée dans le tube digestif, les plaquettes sanguines, les reins et les cellules endothéliales vasculaires [1] (**tableau 01**).

Son inhibition conduit généralement à des événements tels que des dérégulations rénales et des dysfonctionnements de la fonction ulcéro-gastrique.

Le site actif de COX-1 est représenté notamment par les acides aminés Arg120, Ser530, Tyr385 (**Figure 02**). Grâce à son groupement carboxylique terminal, l'acide aminé Arg120 est capable de se lier avec l'acide arachidonique et quelques AINS en jouant un rôle remarquable dans la formation et la stabilité du complexe Enzyme-Substrat (ou inhibiteur). Le résidu Tyr385 intervient dans la réaction de cyclooxygénation est à l'origine de l'activité catalytique dioxygénase de l'éventuelle enzyme [4].

2.2. La Cyclo-Oxygénase-2(COX-2)

Représente la forme inductible de l'enzyme. COX-2 a été découverte en 1990 et elle a été rapidement associée aux phénomènes inflammatoires pouvant toucher l'organisme. Elle a été mise en évidence après que certaines études aient prouvé que la quantité de protéines COX augmentait dans les états inflammatoires, suggérant la présence d'une forme inductible de la Cyclo-Oxygénase [5]. De ce fait, l'organisme répond par la production de prostaglandines au niveau des sites inflammatoires. Par contre, si cette réaction prend de l'ampleur, elle peut devenir néfaste en perturbant les différents processus physiologiques. La présence élevée de l'isoforme COX-2 est synonyme d'inflammation dans le tissu concerné.

Le site actif du Cox-2 se caractérise par la présence de deux résidus Valine en positions 434 et 523 (à la place des deux résidus Ile 434 et 523 dans le cas de la COX-1). Isoleucine dans la position 523 permet l'accès à une nouvelle poche supplémentaire dans le site actif de la COX-2 (**Figure I.2**) jouant un rôle majeur dans la formation et la stabilité du complexe COX-2-acide arachidonique [6].

De même, cette éventuelle poche donne à la COX-2 la possibilité d'être inhibé spécifiquement par des molécules plus volumineuses qui ne pourront pas s'insérer dans le site actif de COX-1. Une autre étude réalisée en 2002 [2], montre que le site actif de la COX 2 est divisé en trois régions importantes :

- **La première** : étant une poche hydrophobe définie par Tyr385, Trp387, Phe518, Tyr248 et Leu384.
- **La deuxième région** : est l'entrée du site actif bordé avec les résidus hydrophiles Arg120, Ser530, Tyr355.
- **La troisième** : est une poche latérale bordée par His90 et Val523 Arg513.

L'inhibition de la cyclooxygénase de type 2 réduit de manière significative la production de prostaglandine dans les tissus et par voie de conséquence exerce une action anti-inflammatoire.

La COX-2 a une sélectivité de substrat plus large que celle de la COX-1 ce qui lui permet de synthétiser une plus grande variété de prostanoïdes. Elle est beaucoup plus sensible au tonus peroxydasique, de sorte qu'en présence d'un taux faible d'hydroperoxydes, l'AA sera métabolisé préférentiellement par la COX-2.

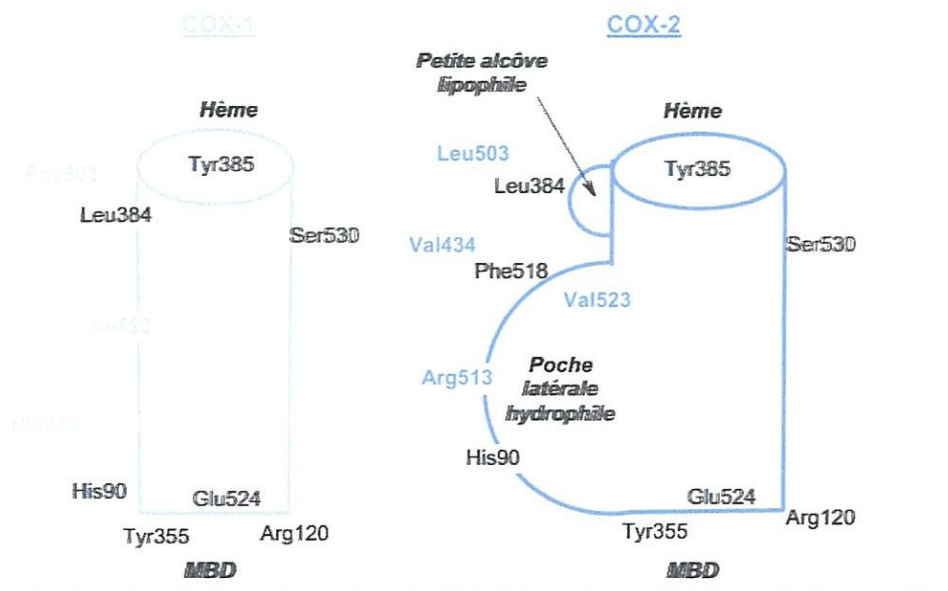


Figure 02: Représentation schématique des sites actifs COX-1 et COX-2 (les résidus conservés entre les deux isoformes sont représenté en noir)

2.3. La Cyclo-Oxygénase-3(COX-3)

Découverte en 2002, la COX-3 est identifiée comme étant une variante d'épissage alternatif du gène de la COX-1. Ces deux iso enzymes dérivent du même gène. Chez l'homme, la COX-3 est exprimée de manière constitutive et majoritairement dans le cortex cérébral et le cœur [7].

Tableau 01 : Différences entre les deux isoformes des Cyclo-oxygénase [8].

| COX-1 | COX-2 |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Poids moléculaire 71kDa | <input type="checkbox"/> Poids moléculaire 72kDa |
| <input type="checkbox"/> Constitutive | <input type="checkbox"/> Inductible (dans la plupart des tissus) |
| <input type="checkbox"/> Synthétise des prostanoïdes qui régulent l'homéostasie | <input type="checkbox"/> Synthétise des prostanoïdes qui régulent l'inflammation, la douleur et la fièvre |
| <input type="checkbox"/> Importante pour : <ul style="list-style-type: none"> ▪ la muqueuse gastrique ▪ le rein ▪ les plaquettes ▪ l'endothélium vasculaire | <input type="checkbox"/> Produite sur le site de l'inflammation <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> L'expression constitutive est surtout dans: <ul style="list-style-type: none"> ▪ le cerveau ▪ le rein |

3. l'acide arachidonique

L'acide arachidonique (AA) est un acide gras à chaîne longue qu'on trouve dans certaines huiles végétales. On le symbolise par les nombres 20:4 (n-6, n-9, n-12, n-15) pour indiquer qu'il a 20 carbones et quatre liaisons éthyléniques situées sur le carbone n° 5 (n-15), n° 8 (n-12), n° 11 (n-9) et n° 14 (n-6) : c'est un acide gras polyinsaturé [9].

L'acide arachidonique est fabriqué dans notre organisme à partir de l'acide linoléique : ce n'est donc pas un acide gras indispensable. Il est le précurseur direct des hormones eicosanoïdes : c'est donc un acide gras essentiel.

Il existe deux acides aminés essentiels à l'activité de cyclooxygénation sur l'acide arachidonique [10] :

- 385Tyr : situé au sommet du canal, il initie la réaction enzymatique et sert de passerelle vers le site de peroxydation, il est le principal intervenant de la réaction d'oxydation ;
- 120Arg : son groupement guanidine intervient dans une liaison électrostatique avec la fonction acide de l'AA (ou de certains inhibiteurs de type anti-inflammatoires non Stéroïdiens) en entrée de tunnel et assure la bonne position du ligand, cet acide aminé étant « le » plus important pour l'activité de COX et le docking des AINS.

Les cyclooxygénases forment la voie principale du métabolisme de l'acide arachidonique.

4. Fonction de la cyclooxygénase

La COX catalyse l'étape initiale du métabolisme d'un acide gras, l'acide arachidonique (**Figure I.3**). L'acide arachidonique est libéré sous l'action de la Phospholipase A2 (PLA2). Il permet, sous l'action de la COX, la formation de la prostaglandine (PG) G2 puis de la PGH2. Cette dernière est, par la suite, métabolisée par l'intervention de différentes enzymes en PGD2, PGE2, PGI2, PGF2 α et également en thromboxanes A2 (TXA2) [11].

Il est important de noter l'existence d'autres voies de métabolisation de l'acide arachidonique qui fonctionnent en parallèle de la voie des COX : la voie des lipoxygénases (LOX), qui transforme l'AA en leucotriènes, eicosanoïdes partageant certaines fonctions physiologiques avec les prostanoïdes et la voie cytochrome P450 (**Figure I.3**).

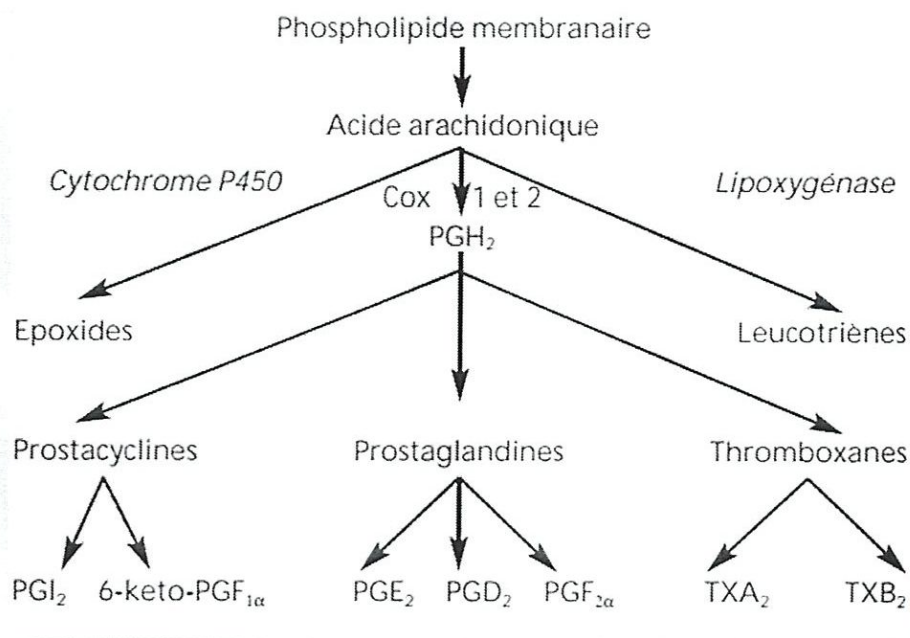


Figure I.3: Métabolisme de l'acide arachidonique et synthèse des prostaglandines [12].

5. Les inhibiteurs de la cyclooxygénase

Les métabolites de l'AA résultant de l'action enzymatique de la cyclooxygénase-2 sont des médiateurs indispensables au mécanisme de l'inflammation. Lors de la réaction inflammatoire, le taux de prostaglandines augmente, ce qui a pour effet de sensibiliser les récepteurs de la douleur [13].

L'inhibition de la cyclooxygénase de type 2 réduit de manière significative la production de prostaglandine dans les tissus et par voie de conséquence exerce une action anti-inflammatoire.

Les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase sont de petites molécules de synthèse, hémi-synthèse ou naturels appartenant à plusieurs familles chimiques. Ils peuvent être mixtes inhibant aussi bien la Cox-1 que la Cox-2, ou alors sélectives pour la COX-2. [14]

5.1. Inhibiteurs Irréversibles

Les inhibiteurs de cette classe bloquent complètement l'enzyme en faisant intervenir une liaison covalente lors de leur interaction avec le site actif avec ouverture de la structure cyclique de l'inhibiteur ce qui empêche l'enzyme d'attaquer l'antibiotique.

5.2. Inhibiteurs Réversibles

Il s'agit d'inhibiteurs compétitifs se liant au site actif de l'enzyme via de faibles interactions. Il contracte de multiples liaisons hydrogènes avec des résidus d'acides aminés conservés du site actif. Ces liaisons sont dues au groupement sulfate à caractère polaire.

5.3. Les inhibiteurs naturels

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Elles sont capables de produire une grande diversité de produits qui ne participent pas à leur métabolisme de base [15] tel que (curcuma, gingembre, giroflie, et la cannelle).

5.4. Les inhibiteurs synthétiques

Les inhibiteurs de COX-2 peuvent être séparés en trois catégories. Il y a tout d'abord les anti inflammatoires non stéroïdiens classiques (aspirine, ibuprofène, naproxène . . .) qui sont capables d'inhiber l'activité de COX-1 et de COX-2 mais à des puissances différentes. Puis, il y a les inhibiteurs spécifiques de COX-2, qui n'inhibent que l'activité de COX-2 (célécoxib, SC-236, NS398. . .). Enfin, il y a le nimésulide et le méloxicam qui sont souvent désignés comme inhibiteurs préférentiels de COX-2 (ont une sélectivité plus marquée pour la COX-2 que pour la COX-1) [16].

Références bibliographiques

- [1] Xie W.L., Chipman J.G., Robertson D.L., Erikson R.L., Simmons D.L. “Expression of a mitogenresponsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88 : p 2692-2696 (1991).
- [2] Lorens O., Perez J., Palomer A., Mauleon D. “Differential binding mode of Diverse cyclooxygenase inhibitors”. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*. 20 : p 359–371 (2002).
- [3] Lichtenstein DR, Syngal S, Wolfe MM. “ Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. The double-edged sword”. *Arthritis Rheum* . 38 : p 5-18 (1995).
- [4] Picot D., Loll P.J., Garavito R.M. “X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1”. *Nature Journal*. 367: p 243-249 (1994).
- [5] Raz, A., Carmi P. & Pazerini G. “Cancer”. *Res*. 48 : p 645-649 (1988).
- [6] Girgis H K “Anti-inflammatoires nonStéroïdiens : une vieille classe innovante pour le traitement du traumatismecrânien”. Thèse de doctorat d’université : Pharmacologie, Paris : Université Paris Descartes. France. (2012).
- [7] Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L. et al “COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. United States of America. 99 : p 13926-13931 (2002).
- [8] Hla T., Nelson K. “Human cyclooxygenase-2 cDNA”. *PNAS*. 89 : p 7384-7388 (1992).
- [9] Loll, P. J.; Picot, D.; Garavito, R. M. “The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase”. *Nat. Struct. Biol.* 2 : p 637-643 (1995).
- [10] Garavito RM. ; Dewitt DL. . “The cyclooxygenase isoforms: structural insights into the conversion of arachidonic acid to prostaglandins. *Biochim Biophys Acta*”. 144 : p 278-87 (1999).
- [11] Rizzo M.T. “ Cyclooxygénase-2 in oncogenesis”. *Clinica Acta*.412 : p 671-687 (2011).
- [12] A. Chiolero, G. Würzner et M. Burnier. “Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2”. 21 : p 425-430 (2000).
- [13] Dray A , Urban L. “ New pharmacological strategies for pain relief ”. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 36 : p 253-80 (1996).

[14] Lipsky P.E., Brooks P., Crofford L.J. "Unresolved Issues in the Role of Cyclooxygenase-2 in Normal Physiologic Processes and Disease". *Archives of Internal Medicine*. 160 : p 913 – 920 (2000).

[15] Defranceschi M. "Chimie et médicaments Ellipses Edition, *Paris*". p 79-85 (2011).

[16] Sobolewski C., Cerella C., Dicator M., - "The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int.J. Cel. Biol* " . 215 : p 53-58(2010).

Chapitre II:
Docking Moléculaire

1. Introduction

La modélisation moléculaire est un terme générique qui regroupe différentes méthodes et techniques qui permettent de simuler et de comprendre le comportement d'un système chimique ou bien physique. Ces techniques dépendent essentiellement de la taille du système étudié. Ce dernier peut aller d'un simple atome vers des macromolécules biologiques de plusieurs dizaines de milliers d'atomes.

La MM sert à expliquer différents aspect des systèmes atomiques ou moléculaire entre autre leurs réactivités, comprendre les processus de repliement des protéines ou encore expliquer l'importance de certains acides amines d'un site catalytique enzymatique. Le docking moléculaire est une étape cruciale dans la connaissance des modes d'interactions entre ligands et macromolécules.

2. Définition

Le docking moléculaire in silico vise à prédire et à reproduire la structure d'un complexe formé par deux molécules, la formation de ces complexes est fondée sur la reconnaissance de la structure 3D (tridimensionnelle) d'un ligand par un site récepteur. Le processus consiste à faire interagir une petite molécule organique (ligand) avec le récepteur, généralement de nature protéique [1].

Les outils de docking obéissent au principe dit « lock-and key » (principe « clef-serrure ») selon lequel le ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure (Figure 04) [2].

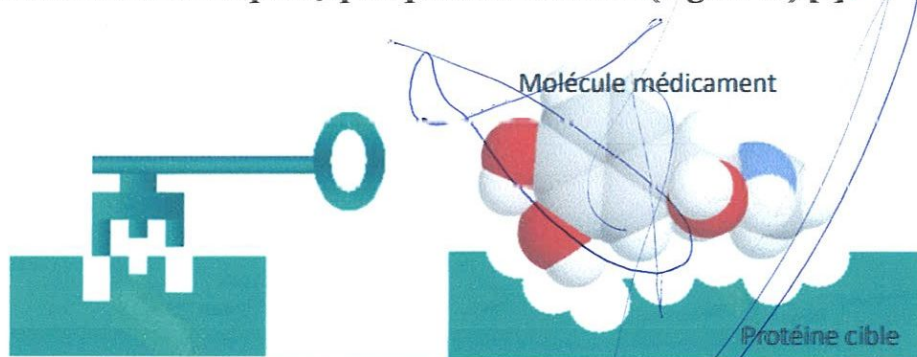


Figure 04: Principe générale d'un docking moléculaire

3. Les étapes du docking

Toutes les approches employant le docking moléculaire utilisent deux étapes indispensables et complémentaires.

3.1. Recherche conformationnelle (searching)

Consiste à rechercher les conformations du ligand aptes à établir des interactions idéales avec le récepteur par un algorithme de recherche. Elle doit parcourir au mieux l'espace conformationnel pour trouver l'énergie minimale globale.

Les algorithmes de recherche de la flexibilité du ligand peuvent se classer en différentes approches :

A. L'approche classique

Regroupe les méthodes selon lesquelles un jeu de conformères est généré sans prendre en compte explicitement les acides aminés du site actif. Par contre, afin de miner l'intérieur de la protéine, la molécule à analyser est explorée dans certaines conditions physico chimiques d'hydrophilie ou lipophile.

- Un autre élément à prendre en compte est le degré de flexibilité de la molécule étudiée. Plus celui-ci augmente, moins la recherche conformationnelle est exhaustive.

B. L'approche rationnelle

- Utilise généralement une fonction de scoring qui guide chaque étape de la construction du ligand.
- Une autre limitation est l'adaptation des fonctions de scoring qui sont généralement prévues pour une molécule entière et non pas pour des fragments moléculaires [3].

3.2 Le scoring

Le scoring est l'évaluation des conformations déjà trouvées lors de la recherche conformationnelle par des fonctions mathématiques appelées fonctions de score. Ces fonctions sont basées sur un calcul rapide de l'énergie libre du système formé par la protéine et le ligand (énergie de complexation).

Le docking peut être interprété de manière qualitative par observation du ligand dans la cavité de la protéine mais également de manière quantitative par traitement des données provenant des fonctions de score.

4. Les algorithmes de recherche

Un algorithme est une méthode utilisée pour résoudre un problème particulier dont on est sûr qu'elle trouve toujours une réponse en un temps d'exécution fini. Ils ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association récepteur ligand les plus favorables.

Actuellement, il existe deux grandes classes d'algorithmes de docking qu'on peut répartir selon la méthode utilisée :

4.1. *Matching* (Simulation par fragmentation incrémentale)

Le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. Dans un premier lieu, un ou plusieurs fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site actif et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion [4]. Des programmes comme FlexX et Surflex utilisent cette approche qui permet notamment un criblage rapide de vastes chimiothèques de molécules [5].

4.2. Algorithme génétique (Simulation par trajectoire)

Cette approche, est plus précise : à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand considéré dans son entier explore le site actif étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Ces techniques sont plus lentes que celles par *matching* mais prennent mieux en considération la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes. Dans cette catégorie, nous pouvons citer GOLD, AutoDock et AutoDock Vina [6].

5. Les Fonctions de score

Dans les programmes de docking, on trouve différents types de fonction de score : celles utilisant un champ de force de mécanique moléculaire, celles reposant sur les connaissances statistiques et les méthodes empiriques.

5.1. Les fonctions basées sur les champs de force

Caractérisent l'énergie d'une pose par la somme de deux termes énergétiques: l'une représentant l'énergie d'interaction ligand-récepteur et l'autre l'énergie interne du ligand [7].

5.2. Les fonctions basées sur les connaissances (knowledge-based)

Ont pour but de reproduire les données expérimentales en utilisant des structures tridimensionnelles de complexes ligand-récepteur [8].

5.3. Les fonctions empiriques

Ces fonctions de score se basent sur un décompte du nombre d'interactions dans le système protéine-ligand comme par exemple le nombre de liaisons hydrogène, les contacts hydrophobes, les contacts hydrophiles, les contraintes de torsion dues à la formation du complexe protéine-ligand, *etc.* La plupart des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité en termes de rapport précision/rapidité.

6. Les interactions protéine-ligand

Pour attacher un ligand à une protéine (docking) le problème est de prédire la conformation et l'orientation du ligand relative au site actif de la protéine cible. Au niveau du site actif, le processus d'interaction est assuré grâce à plusieurs types de liaisons non covalentes. Les interactions qui stabilisent les structures tridimensionnelles des macromolécules sont:

6.1. Les forces de Van Der Waals

Les interactions de Van Der Waals sont des interactions de nature électrostatique qui ont lieu entre les nuages électroniques. Cette force généralement attractive n'intervient qu'à très courte distance, elle est donc plus intense lorsque les molécules qui interagissent sont proches et volumineuses. Cette force est amplifiée par le fait que les liaisons internes des molécules soient polaires. Ces forces généralement attractives de nature électrostatique sont donc responsables de liaisons intermoléculaires de faibles intensités [9].

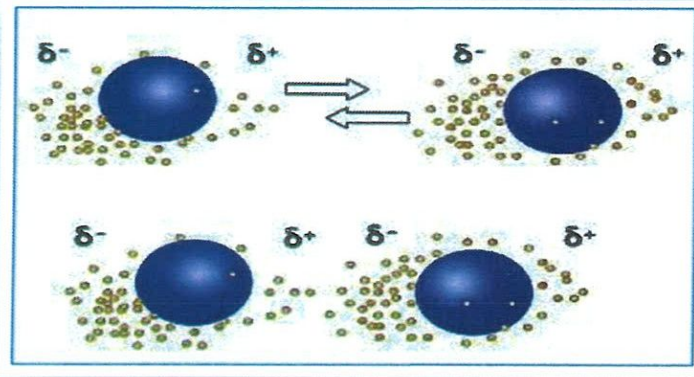


Figure 05 : Les forces de Van Der Waals

6.2. L'effet hydrophobe

Les molécules ou groupes non polaires ne sont pas capables de former de liaisons hydrogène et ne peuvent donc pas s'hydrater : on les nomme pour cette raison substances hydrophobes. L'effet hydrophobe est la tendance qu'ont ces groupes à se rassembler par coalescence de façon à minimiser les contacts avec l'eau [10].

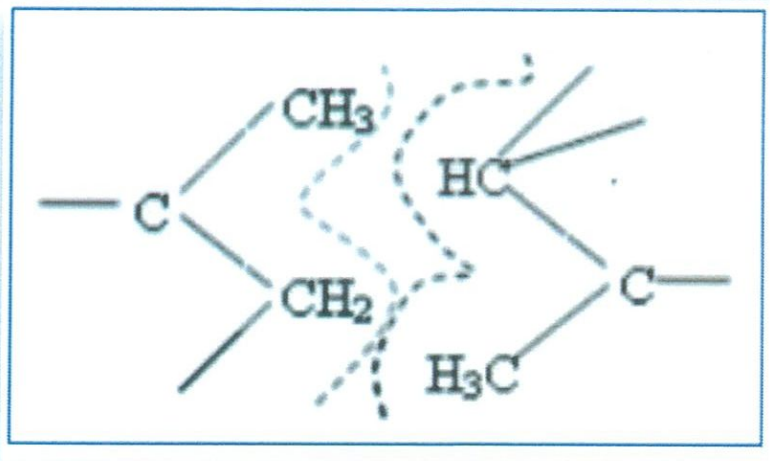


Figure 06 : Interactions hydrophobes

6.3. La liaison hydrogène

La liaison hydrogène appelée aussi pont hydrogène : force intermoléculaire qui implique un atome d'hydrogène et un atome électronégatif (oxygène, azote ou fluor).

On a longtemps cru que cette liaison était covalente. On a constaté qu'en fait elle est électrostatique à 90%. Elle se situe entre la liaison covalente et la liaison van der Waals (interaction électrique de faible intensité entre atomes) [11].

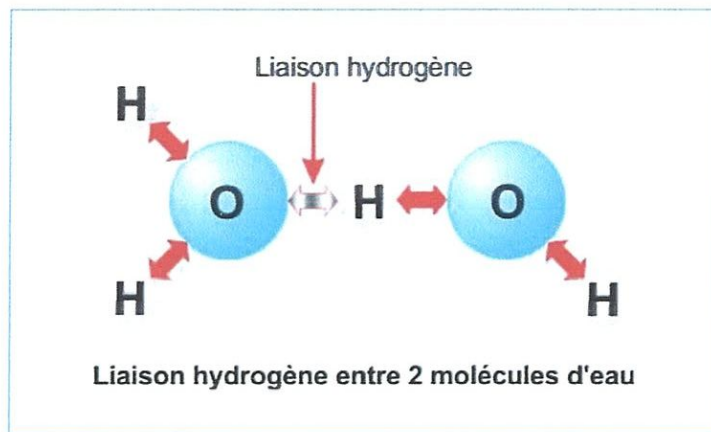


Figure 07: La liaison hydrogène

6.4. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques agissent à plus grande distance entre dipôles chargés. La distance pour une liaison saline, par exemple, est de 3,7 à 4,5 Å, et sa force est de l'ordre de 8 Kcal/mol. En présence de solvant, ces interactions sont favorisées du fait de la polarité et de la petite taille de la molécule d'eau.

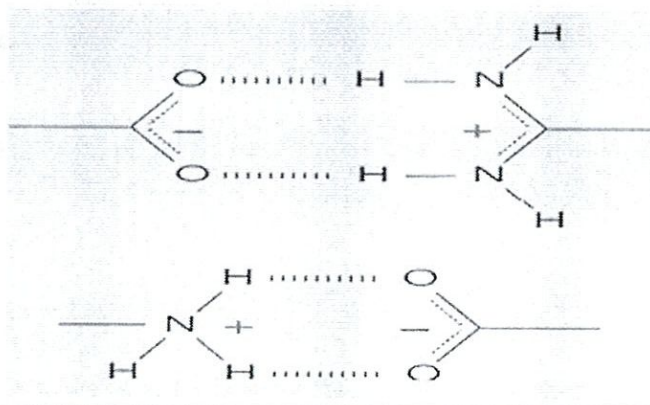


Figure II.8: Interaction électrostatique

7. Les outils

Les éléments indispensables pour pratiquer un docking moléculaire se limitent en un récepteur macromoléculaire de nature protéique appelée : cible, une petite molécule appelée ligand et un programme de docking qui prédit la conformation la plus favorable du ligand au sein du récepteur choisi.

7.1.Récepteur

Pour l'obtention des récepteurs, on utilise les structures 3D des protéines qui sont accessibles gratuitement dans la banque de donnée PDB (Protéine Data Bank). Il s'agit d'une grande archive de données structurales de macromolécules biologiques protéines et acides nucléiques [12]. Les données structurales sont obtenues par cristallographie aux rayons X, spectroscopie RMN et sont accessibles gratuitement sur internet. Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargeables sous extension *pdb* lisibles par les logiciels de docking et contenant diverses informations sur la protéine en question.

Dans certains cas, lorsque la structure 3D de la cible souhaitée n'est pas encore disponible dans la PDB, on doit faire appel dans ce cas à la modélisation par homologie pour construire cette structure à partir d'une protéine avec des séquences similaires.

7.2.Ligand

Pour un docking moléculaire, le ligand doit être également sous forme 3D. Pour y obtenir, il existe deux moyens :

Le premier moyen consiste à utiliser des programmes de construction moléculaire 3D tels que ChemDraw, Arguslab, Titan, Marvin, hyperchem, Sybyl...etc. Chacun de ces programmes contient une banque d'atomes permettant de dessiner le ligand tout en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome et du type de liaisons simple, double ou triples. Ensuite, la géométrie doit être optimisée.

Le second moyen d'obtenir un ligand 3D est souvent d'aspect commercial, consistant à consulter des banques de données de ligands appelées chimiothèques. Les chimiothèques virtuelles comportent un ensemble d'informations plus ou moins organisées et hiérarchisées regroupant des données (structure, activité, propriétés physico-chimiques....) de différents ligands. Dans ce type de chimiothèques, la structure 3D de chaque composé est enregistrée dans des fichiers avec les formats SMILES, PDB . . . etc.

7.3.Programmes

En principe, un programme de docking doit être capable de générer les modes de liaisons attendus pour des ligands dont la position adoptée au sein du site actif est connue (en général, via la structure cristallographique de la protéine co-cristallisée avec le ligand) dans un temps raisonnable.

De nombreux programmes de docking (commerciaux ou non) sont disponibles, Les plus fréquemment cités sont: AutoDock, FlexX, Glide, Gold, ICM, LigandFit, Surflex,...

Bien que ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques, leur protocole est composé de 2 étapes essentielles *Docking et Scoring*.

Références bibliographiques

- [1] Drawz S.M., Papp-Wallace K.M., Bonomo R.A. “New Beta-Lactamase Inhibitors: a Therapeutic Renaissance in an MDR World”. AAC Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2 : p 54. (2013).
- [2] Mark Agostino., Elizabeth Yuriev., and Paul A. Ramsland. A Computational Approach for Exploring Carbohydrate Recognition by Lectins in Innate Immunity. 2 : 1-23 . (2011).
- [3] Warren G.L., Andrews C.W., Capelli A., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S.F., Senger S. et al. “A critical assessment of docking programs and scoring functions”. J. Med. Chem. 49 : p 5912-5931. (2006).
- [4] Bouchrit H. “Etude théorique des interactions intervenant dans l’inhibition de la méthionine aminopeptidase de mycobacteriumtuberculosis par diverses molécules”. Thèse de magister : Technologies des explorations biochimiques. Constantine : université Mentouri. Algérie. (2012).
- [5] Bessadok M.A. La multiplicité de transport de la P-glycoprotéine : “Etudes de modélisation comparative et de docking au sein de la famille des protéines ABC”. Thèse de doctorat d’université : Bioinformatique Structurale. Paris : université pierre et marie curie. France. (2011).
- [6] Mokrani E. H. “Contribution à l’amélioration de l’activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique”. Thèse de magister d’université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. (2012).
- [7]. Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., and Bajorath, J., “Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications”. Nat. Rev. Drug Discovery”. 3: p 935-949 (2004).
- [8] Sousa, S.F., Fernandes, P.A., and Ramos, M.J. “Protein-ligand docking: current status and future challenges. Proteins: Struct., Funct., Bioinf”. 65 : p 15-26 (2006).
- [9] <http://adherence-gecko.e-monsite.com/pages/ii-comment-expliquer-le-fait-queces-geckos-puissent-adherer-a-des-surfaces-lisses-verticales/d-forces-de-van-derwaals.html> .
- [10]<http://wiki.ubuntu.com/kmezhoud/Bioinformatics?action=AttachFile&do=get&target=dockin g.pdf>.

[11] Kerrouch L., “Etude in silico de l’inhibition de la dihydroorotatedeshydrogenase de plasmodium falciporum dans le cas du paludisme”. Mémoire de Master. Univ. constantine1. Algérie. (2011).

[12] Grosdidier A. “ Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de Nouvelles molécules actives”. Thèse de doctorat en pharmacie, Grenoble : Université Joseph Fourier. France. (2007).

Chapitre III :
Résultats et discussion

1. Introduction

L'objectif principal de notre travail est de modéliser et comprendre les interactions entre le cyclocoumarol et ces dérivés avec une série de cyclooxygénase type 2 (code PDB: 3LN0, 3MQE, 3NT1, 3NTB, 3NTG, 3Q7D, et 4PH9) qui sont des enzymes cibles dont le traitement de l'inflammation.

2. Présentation des molécules étudiées

2.1. Le cyclocoumarol

Le cyclocoumarol (**Figure III.9**) est connu en thérapeutique pour ses propriétés anticoagulantes. Il est prescrit dès 1954 pour le traitement de l'infarctus du myocarde, et d'un point de vue structural, c'est un composé hétérocyclique comportant un noyau coumarin.

Cette caractéristique chimique est d'autant plus intéressante car les molécules contenant un noyau coumarin sont décrits dans la littérature comme des molécules possédant un large spectre d'activités biologiques : anti-fongique, anti-bactérienne, antioxydante, anticoagulante, anti malarique, antituberculeuse, anti-neurodégénérative, anti-virale, anti-cancéreuse, anti-inflammatoire [1-11].

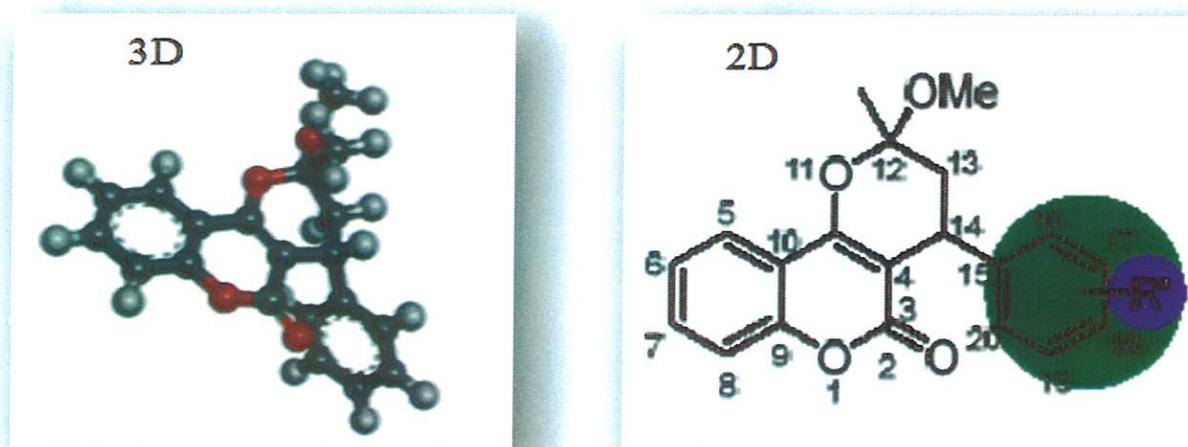
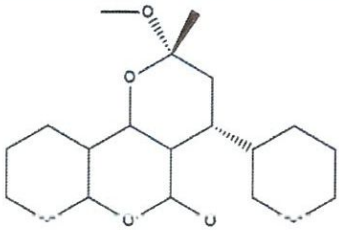

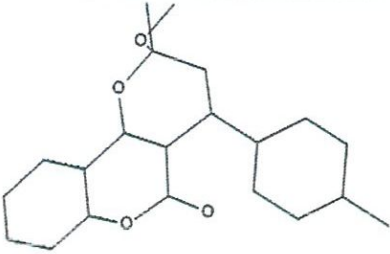

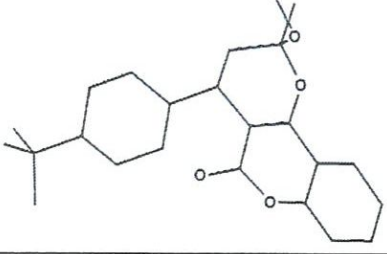

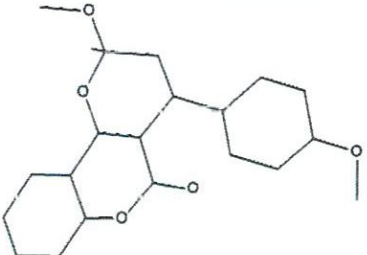
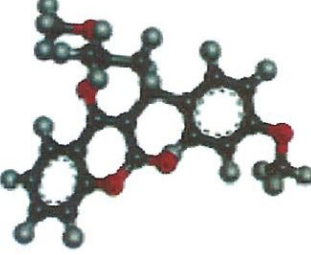


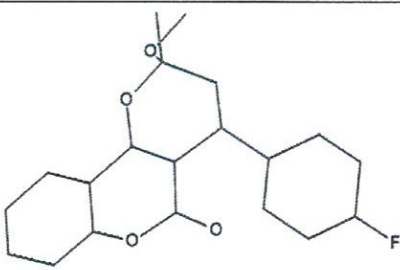

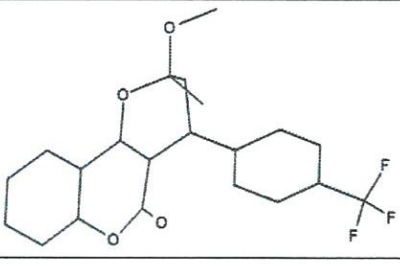
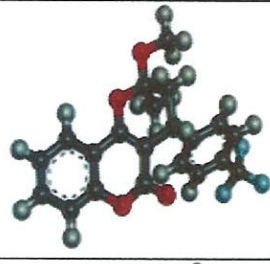
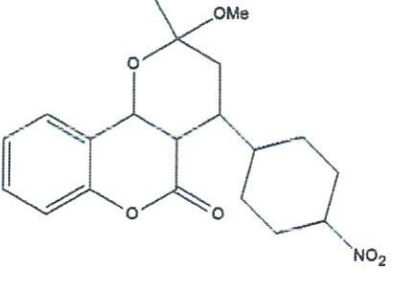
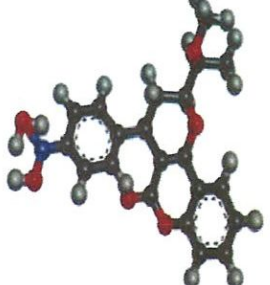
Figure III.9 : représentation de la structure du Cyclocoumarol

2.1. Les dérivés du cyclocoumarol

Dans ce travail, nous avons étudié sept dérivées du cyclocoumarol dont les tests biologiques ont confirmé leur activité inhibitrice envers COX -2 [12]. A partir de la molécule du cyclocoumarol on a obtenus ces composés selon le radical R. Les structures sont représentées dans le (Tableau III.2).

Tableau III.2 : Les dérivés du cyclocoumarol

| Ligands | Dérivés | R | Structure 2D | Structure 3D |
|----------|---------|--------|--|---|
| Ligand 1 | A | H |  |  |
| Ligand 2 | B | Me |  |  |
| Ligand 3 | C | Tri-Me |  |  |
| Ligand 4 | D | OMe |  |  |

| | | | | |
|-----------------|---|-----|--|---|
| Ligand 5 | E | F |  |  |
| Ligand 6 | F | CF3 |  |  |
| Ligand 7 | G | NO2 |  |  |

3. Méthodologie

3.1. Logiciel

Nous avons utilisé Autodock vina [13], un logiciel d'amarrage moléculaire très répandu et connu par sa fiabilité et son pouvoir de reproduire les ligands déjà complexés et utilisés dans le docking moléculaire.

Autodock Vina utilise un algorithme de recherche d'optimisation globale stochastique de type Iterated Local [14]. La fonction de scoring utilisée par Autodock Vina permet de faire la somme des contributions intramoléculaires et intermoléculaires du système d'une manière inspirée par le programme Xscore [15] qui utilise une fonction de score empirique. Elle combine ainsi les avantages des fonctions de score empiriques et knowledge-based [13].

3.2. Préparation des enzymes

Les COX-2, faisant l'objet de notre étude, ont été téléchargées à partir de la base de données Biochemie Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb). La PDB contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN.

Les COX ont plusieurs cordes (Figure III.10). On les traite, en choisissant la chaîne (corde) convenable. L'élimination des molécules d'eau et les inhibiteurs de Co-cristallisation, permet d'obtenir un modèle simplifié de l'enzyme. Notre étude est basée sur la simplification d'enzyme comme une étape clé et essentielle pour accélérer et simplifier les calculs. Alors on élimine certaines chaînes, les ligands de Co-cristallisation et les molécules d'eau par Discovery Studio (Figure III.11).

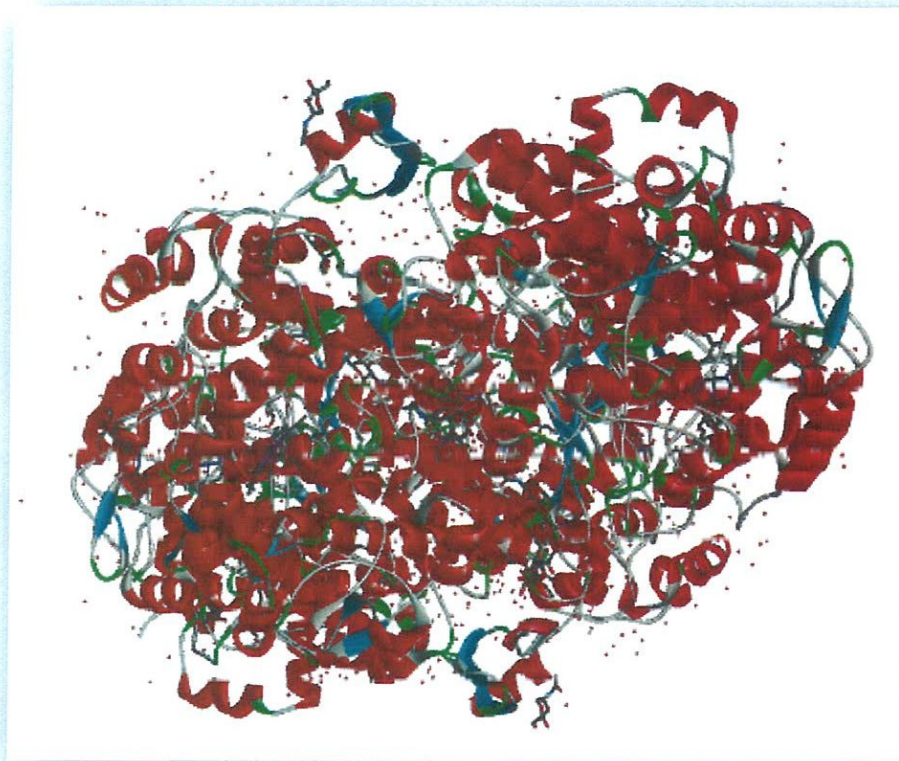


Figure III.10 : L'enzyme 3NTB non simplifié

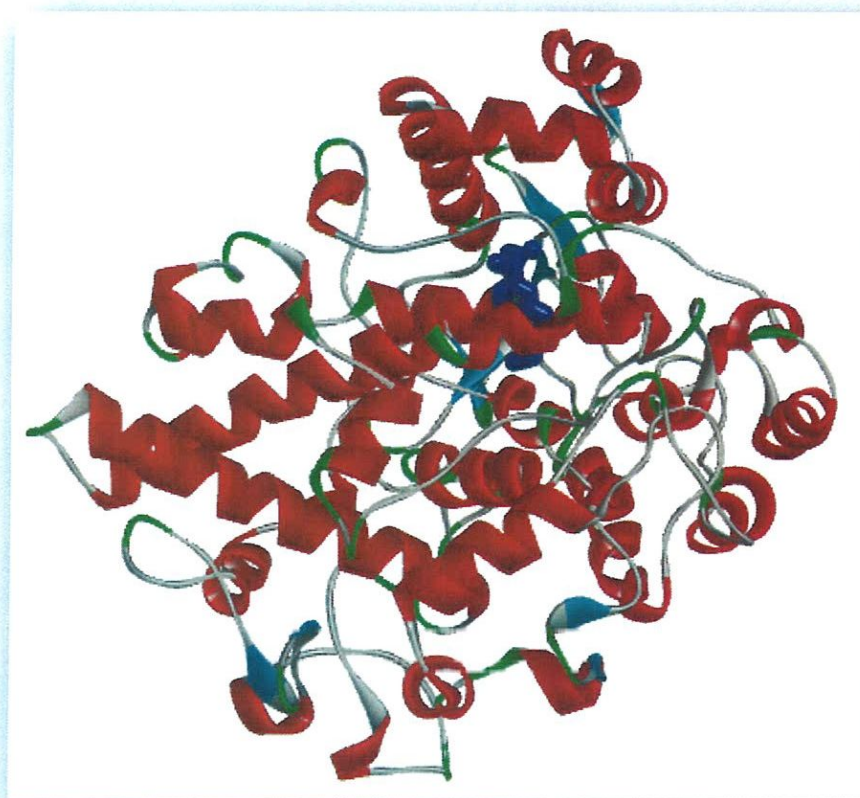


Figure III.11 : L'enzyme 3NTB simplifiée (une seule chaîne)

Avant le docking, chaque enzyme est séparée de son ligand co-cristallisé pour obtenir une cible avec un site actif libre. Les atomes d'hydrogène sont rajoutés et, les structures sont enregistrées en format PDBQT.

Puis, une boîte GRID (GRID BOX) est créée pour définir l'espace de recherche conformationnel du site actif (Tableau III.3).

Tableau III.3 : La boîte GRID BOX des enzymes

| Récepteur | Centre X (Å) | Centres Y (Å) | Centre Z (Å) | Délimitations (Å ³) |
|-----------|--------------|---------------|--------------|---------------------------------|
| 4PH9 | 14.123 | 23.9 | 26.549 | 18x18x18 |
| 3Q7D | -40.564 | -51.572 | -21.913 | 26x26x26 |
| 3NTG | -40.564 | -51.572 | -21.913 | 24x24x24 |
| 3NTB | -28.672 | 21.960 | -77.239 | 22x22x22 |
| 3NT1 | 56.151 | 47.116 | 75.188 | 26x26x26 |
| 3MQE | 29.741 | -47.262 | 17.469 | 26x26x26 |
| 3LN0 | 57.921 | 45.952 | 76.203 | 26x26x26 |

3.3. Préparation des ligands

Les ligands étudiés ont été téléchargés via la chimiothèque Pubchem. A l'aide du logiciel hyperchem 7.5, on a construit les dérivées à étudier. En utilisant la méthode semi empirique (PM6) implanté dans le logiciel Gaussian [16], les géométries sont optimisées afin de trouver les conformations les plus stables. Les structures sont enregistrées sous format PDBQT.

4. Résultats et discussion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à mieux comprendre le mécanisme d'interaction COXs-ligand. Pour cela nous avons procédé comme suit :

4.1. Calcul RMSD

En premier lieu, une étude de docking préliminaire a été réalisée avec les COXs et leurs ligands Co-cristallisés afin d'évaluer la capacité du logiciel à retrouver la pose cristallisée. Ceci permet de s'assurer de la capacité du logiciel à prédire correctement les modes de liaison et ainsi d'accorder une plus grande confiance aux prédictions obtenues lors de cette étude.

Classiquement, on juge de la qualité du docking en mesurant le RMSD (Root Mean Square Deviation) sur les atomes lourds entre la pose obtenue en docking, et la pose observée expérimentalement si elle existe [17].

Après avoir analysé dix poses pour chaque structure il en résulte que Vina a été capable de retrouver la pose cristallisée avec un bon RMSD (tout programme de docking n'est performant que lorsque le RMSD est inférieur ou égale à 2 Å) pour toutes les structures (Tableau III.4).

Tableau III.4 : Calcul du RMSD

| Code PDB | Code Ligands | RMSD (Å) |
|----------|--------------|----------|
| 4PH9 | IBP | 1.18 |
| 3Q7D | ACD | 0.46 |
| 3NTG | D72 | 0.85 |
| 3NTB | T1N | 0.37 |
| 3NT1 | NPS | 0.37 |
| 3MQE | 416 | 0.95 |
| 3LN0 | 52B | 1.00 |
| 5IKV | NPX | 0.44 |

4.2. Docking du cyclocoumarol

En second lieu, pour sélectionner la COX cible pour l'inhibition, un deuxième docking est réalisé entre le cyclocoumarol et les COXs citées. Le docking a donné les résultats présentés dans le (Tableau III.5) :

Tableau III.5: Résultats de docking moléculaire Cyclocoumarol-COXs

| Composés | Score (Kcal/mol) |
|----------|---------------------|
| 4PH9 | -7.7 |
| 3Q7D | -9.0 |
| 3NTG | -9.6 |
| 3NTB | -8.8 |
| 3NT1 | -9.2 |
| 3MQE | -9.0 |
| 3LN0 | -9,3 |

D'après l'évaluation de l'énergie de complexation, on constate que l'écart énergétique est très proche. Donc le cyclocoumarol peut inhiber les différentes enzymes.

Interaction cyclocoumarol –COXs

L'étude de mode d'interaction du cyclocoumarol avec le site actif de différentes enzymes permet de montrer les interactions qui agissent sur la stabilité du complexe ligand-enzyme et par conséquent choisir la COX à inhiber. Les résultats sont mentionnés dans le (Tableau III.6)

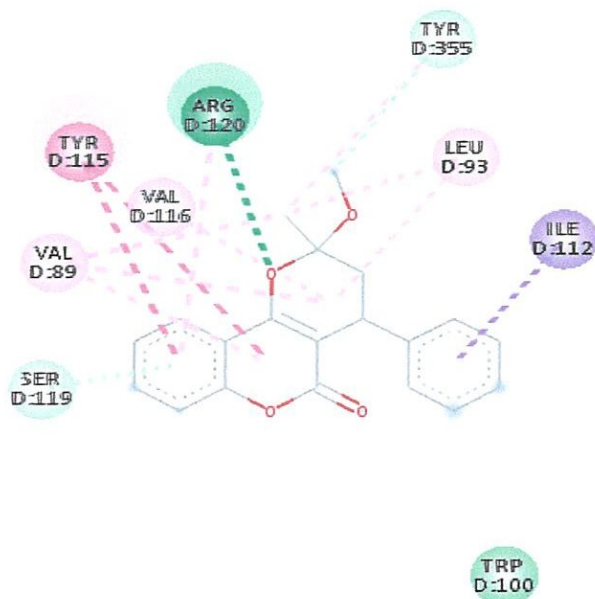
Tableau III.6 : Les différentes interactions cyclocoumarol- COXs

| | 3LN0 | 3MQE | 3NT1 | 3NTB | 3NTG | 3Q7D | 4PH9 |
|-------------------|---------------------------------|--------|---------------------------------------|-------------------|--------|--------|--------|
| Enzymes | Résidus des sites actifs | | | | | | |
| Liaisons H | SER516 →2.52 Å | – | ARG120 TYR115 →2.63 Å 2.89 Å | ARG120 →2.73 Å | – | – | – |
| Liaisons | | | | VAL116 | ILE98 | TYR115 | LEU353 |
| Hydro_ | VAL509 | LEU338 | VAL116 | VAL89 | VAL102 | LEU93 | VAL524 |
| phobique | LEU338 | VAL509 | LEU93 | LEU93 | PRO89 | VAL116 | ALA528 |
| | LEU517 | VAL335 | VAL89 | TYR355 | ILE77 | ILE112 | |
| | VAL335 | ALA513 | PRO86 | ARG120 | VAL74 | ILE92 | |
| | ALA513 | LEU517 | TYR115 | ILE112 | TYR101 | VAL89 | |

D'après l'analyse du tableau III.6, on a choisi l'enzyme **3NTB** parce qu'on trouve des points de fixation du cyclocoumarol identiques à ceux identifiés expérimentalement pour les inhibiteurs sélectifs du COX-2. A savoir : ARG120, VAL523, TYR385, TRP387, TYR355, LEU384, SER530, PHE518.

Analyse visuelle

Dans ce qui suit, nous avons élucidés les modes d'interactions de du cyclocoumarol (Figure III.11) au sein du site actif du 3NTB. Les liaisons hydrogènes en ligne discontinues de couleur verte, les interactions hydrophobiques en violet, les interactions électrostatiques en marron, et les interactions de Van Der waals en vert claire.



Interactions

- | | |
|----------------------------------|---------------------|
| Van Der Waals | pi-sigma |
| liaison hydrogen conventionnelle | pi-pi en forme de T |
| liaison hydrogen-carbone | Alkyle |
| liaison hydrogen pi-donneur | pi-alkyle |

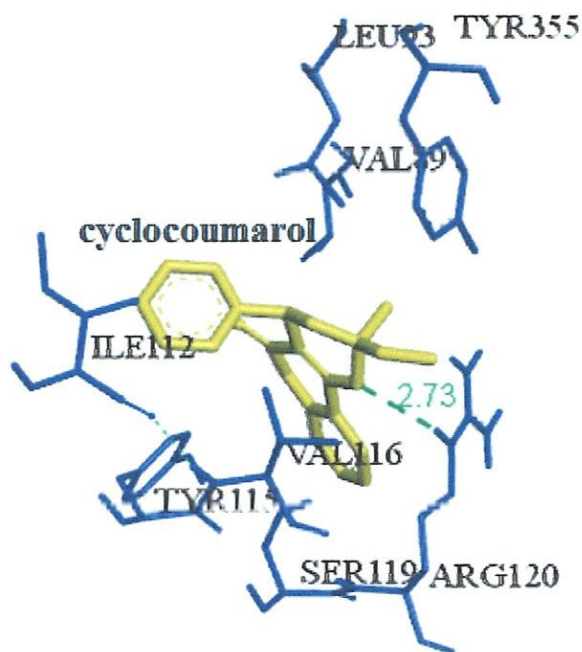


Figure III.12: Mode d'interaction cyclocoumarol-3NTB

Il est remarquable que le complexe formé par le cyclocoumarol et la 3NTB a établi une liaison hydrogène de distance égal à 2.73Å avec l'acide aminé ARG120. Concernant, les interactions hydrophobiques elles sont formées avec VAL 89, ARG120, ILE112, TYR355, VAL116 et LEU93. Une seule interaction de Van Der Waals est formée avec le résidu TRP100.

On peut conclure que le cyclocoumarol peut bloquer le site actif du COX-2 (3NTB) en formant une liaison hydrogène avec l'ARG120 (résidu clé pour l'inhibition du COX-2).

4.3. Interaction dérivées du cyclocoumarol- COX

Enfin, Pour prédire l'affinité de nouveaux composés et découvrir d'autres inhibiteurs sélectifs de la COX-2, un autre docking est réalisé entre la 3NTB et les sept dérivés du cyclocoumarol. Les résultats sont mentionnés dans le (Tableau III.7).

Tableau III.7 : Différentes interactions dérivés- 3NTB

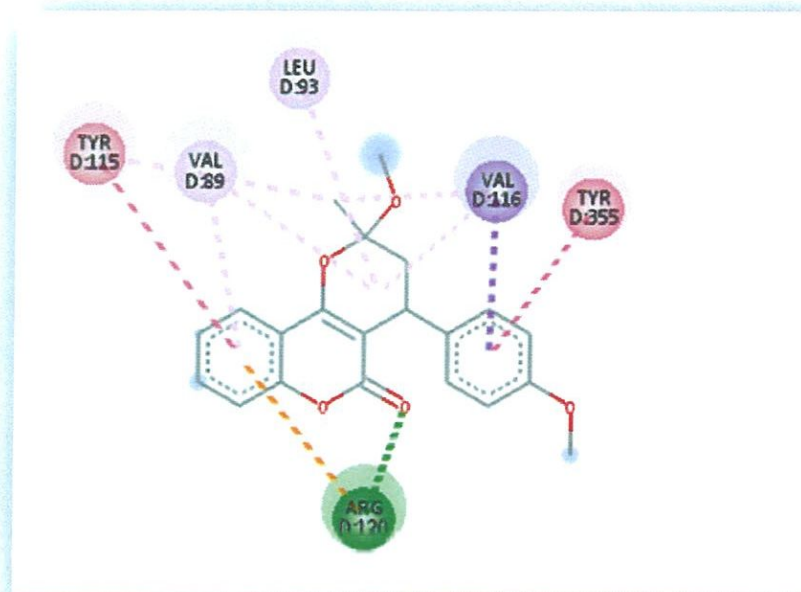
| Dérivés | A | B | C | D | E | F | G |
|-------------------|--------------------------------------|--------|-------------------|-------------------|--------|--------|----------------------|
| | Résidus du site actif du 3NTB | | | | | | |
| Liaisons H | - | - | ARG120 →2.65 Å | ARG120 →1.98 Å | - | - | GLU524 →2.45 Å |
| Liaisons | VAL523 | LEU93 | TYR115 | VAL116 | LEU93 | VAL523 | VAL116 |
| Hydro_ | ALA527 | VAL89 | VAL89 | LEU93 | VAL89 | PHE518 | LEU93 |
| phobique | LEU531 | TYR355 | | VAL89 | TYR355 | VAL349 | VAL89 |
| | | VAL116 | | | VAL116 | LEU352 | |
| | | ILE112 | | | | ALA527 | |
| | | | | | | VAL116 | |
| | | | | | | LEU359 | |

La formation d'un complexe stable dépend de la fixation de l'inhibiteur dans le site actif. Lorsque l'inhibiteur prend la forme de la cavité enzymatique formé par les résidus du site actif, ce qui signifie qu'il y a des interactions qui stabilisent le complexe et par la suite, une meilleure fixation de ce l'inhibiteur au niveau du site actif.

Analyse visuelle

La visualisation des interactions entre les acides aminés du site actif et les inhibiteurs pour former un complexe stable est réalisée à l'aide du logiciel Discovery Studio.

Les figures suivantes schématisent et résument les différentes interactions trouvées :



Interactions

| | |
|---|---|
|  Liaison hydrogène conventionnelle |  Pi-Pi en formz de T |
|  Pi-cation |  Alkyle |
|  Pi-sigma |  Pi-Alkyle |

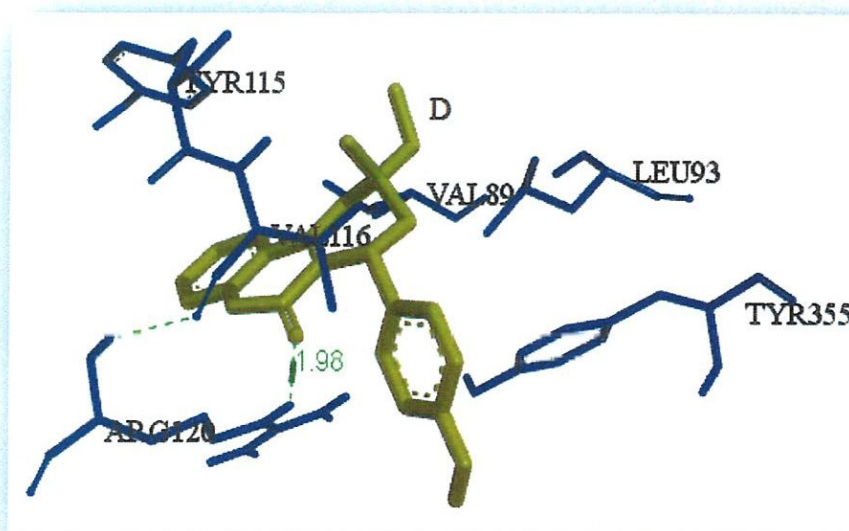


Figure III.13: Mode d'interactions dérivé D-3NTB

Il est remarquable que le complexe formé par le dérivé D et la 3NTB a établi une liaison hydrogène de distance égal à 1.98 Å avec l'acide aminé ARG120. Concernant, les interactions hydrophobiques elles sont formées avec VAL116, LEU93 et VAL89.

Les résultats de cette étude montrent que le dérivé D possédant un groupement R=OMe forme un complexe enzyme-ligand plus stables que les autres dérivés et par conséquent il est le meilleur inhibiteur. Ce résultat a été prouvé expérimentalement [12].

5. Interaction ligand- 5IKV

Plus les protéines précédentes (de souris), on a rajouté l'étude de docking du cyclocoumarol et ses dérivées avec une protéine humaine, 5IKV. En suivant les mêmes étapes décrites précédemment, on a trouvé un bon RMSD (0.44 Å), une bonne affinité (-9.0 kcal/mol) et plusieurs interactions de type hydrophobique, liaison hydrogène

Parmi les sept dérivés étudiés on a choisi le dérivé F (R= CF₃) comme meilleur inhibiteur de cette enzyme (établissement d'une liaison hydrogène avec le résidu ARG120), voir **Tableau III.8** et **Figure III.15**.

Tableau III.8 : Différentes interactions ligands- 5IKV

| 5IKV | Cyclocoumarol | Dérivé F |
|------------------------------|--|--|
| | | Résidus du site actif du 5IKV |
| Liaison H | SER530 d=2.62 Å° | ARG120 d=2.73Å° |
| Liaison Hydrophobique | VAL523, ALA527, LEU352, VAL349, LEU351, LEU359 | VAL 523, ALA527, LEU352, LEU359, LEU359, VAL 349 |

Les figures suivantes schématisent et résument les modes interactions trouvées :

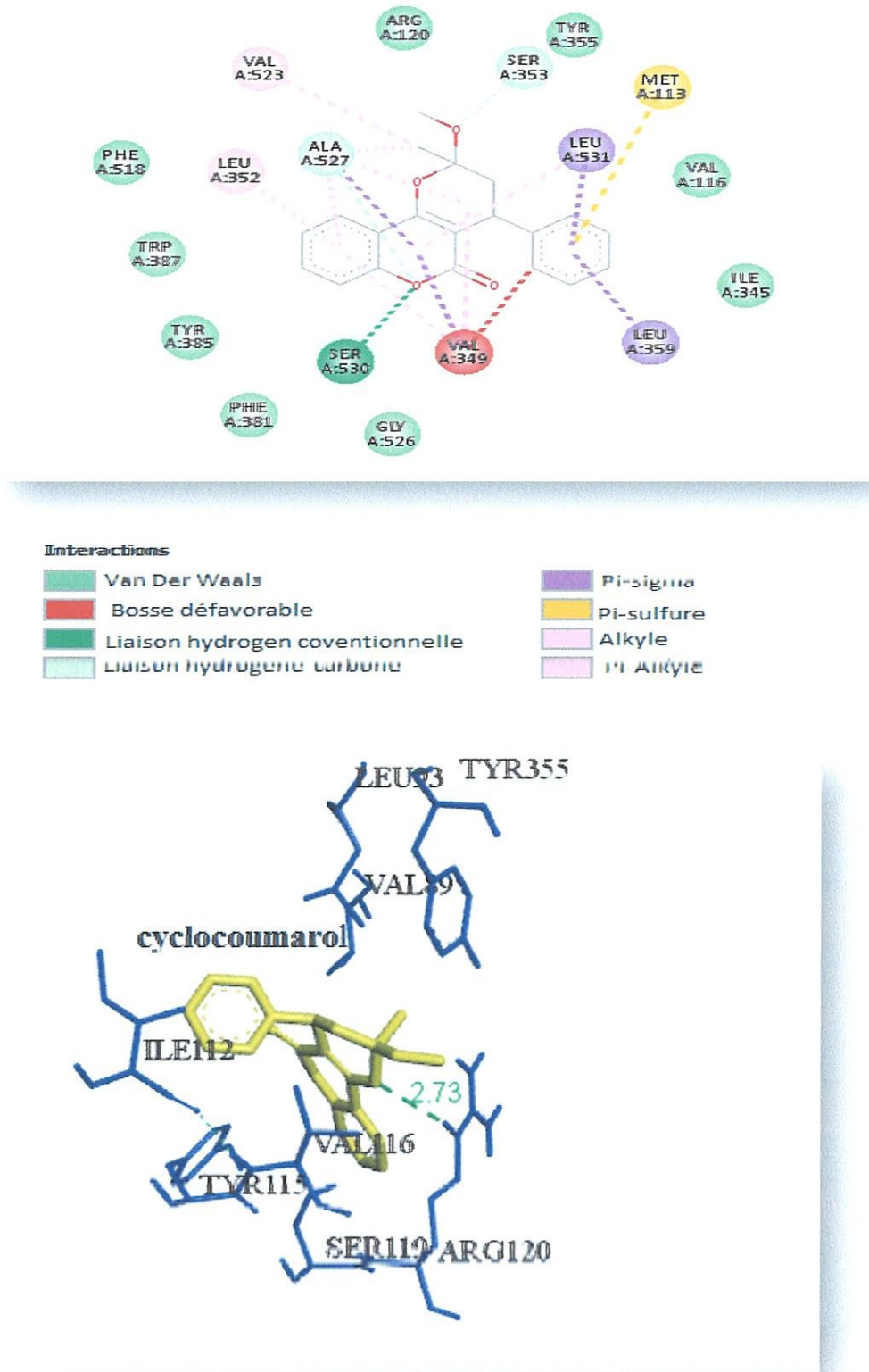


Figure III.14: Mode d'interaction cyclocoumarol-5IKV

Le complexe le cyclocoumarol - 5IKV a établi une liaisonhydrogène de distance égale à 2.62A° avec l'acide aminé (SER 530) et des interactions hydrophobiques avecles acide aminés : ALA527, VAL349,LEU531, LEU359, LEU352et VAL523.

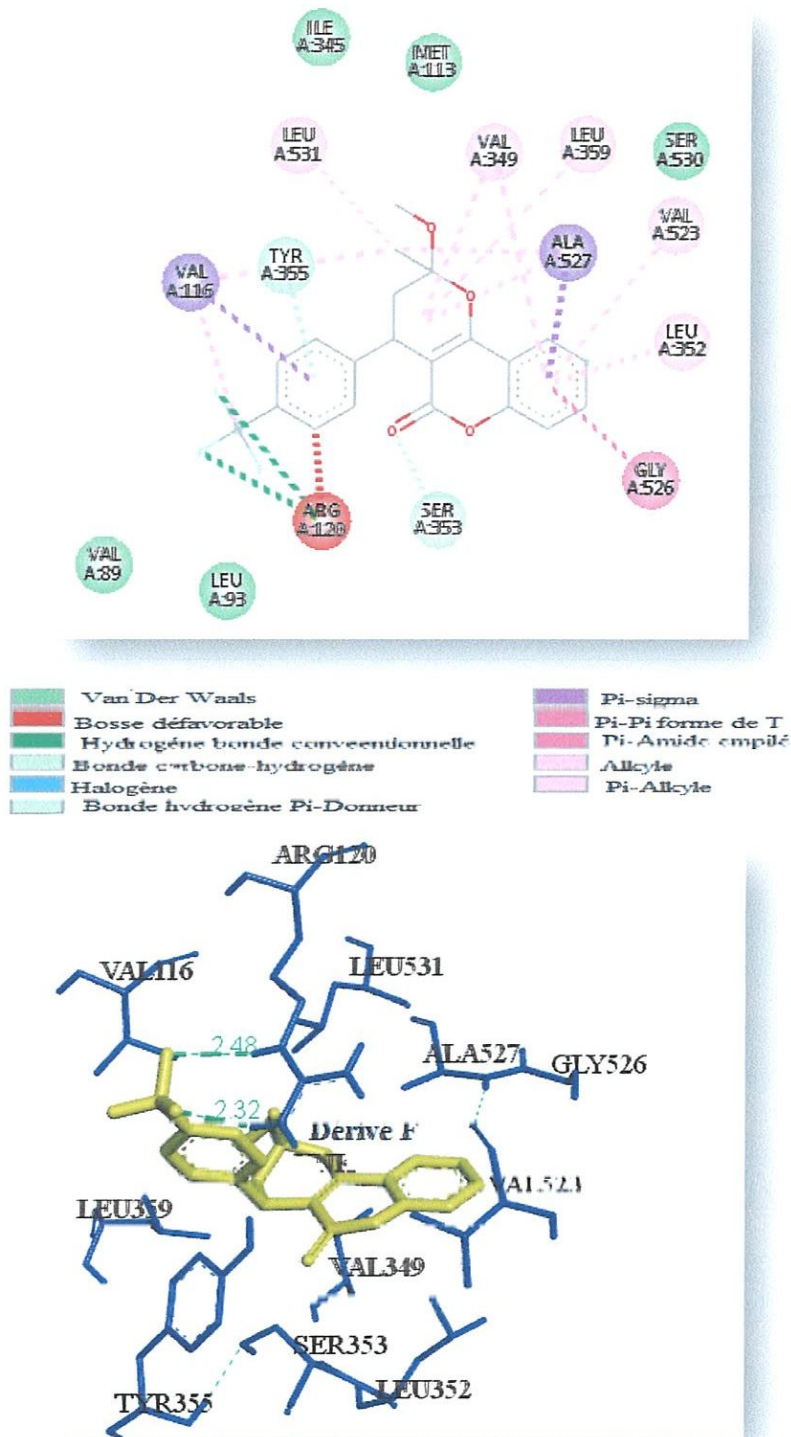


Figure III.15: Mode d'interactions dérivé F -5IKV

Références bibliographique

- [1] Barar, F.S.K., “ Essentials of Pharmacotherapeutics.: S. Chand Publishing”. (2000).
- [2] Gordon, P.C. “ Anticoagulants In The Treatment Of Myocardial”. American Heart j. 36 : p 801-815 (1948).
- [3] Arshad, A., Osman, H., Bagley, M.C., Lam, C.K., Mohamad, S., and Zahariluddin, A.S.M. “ Synthesis and antimicrobial properties of some new thiazolyl coumarin derivatives”. Eur J Med Chem. 46: p 3788-94 (2011).
- [4] Sandhu, S., Bansal, Y., Silakari, O., and Bansal, G. “Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. Bioorg. Med. Chem”. 22 : p 3806-3814 (2014) .
- [5] Venugopala, K.N., Rashmi, V., and Odhav, B. “ Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity”. BioMed Res. Int. 14 : p 963248, (2013).
- [6] Jung, J.-C. and Park, O.-S. “Synthetic approaches and biological activities of 4hydroxycoumarin derivatives”. Molecules. 14: p 4790-4803 (2009).
- [7] Pingaew, R., Saekee, A., Mandi, P., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, S., Ruchirawat, S., and Prachayasittikul, V. “Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalcone-coumarin hybrids as anticancer and antimalarial agents”. Eur. J. Med. Chem. 85: p. 65-76 (2014.)
- [8] João Matos, M.J., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O.A., Molina, E., and Guardado Yordi, E. Coumarins .“An Important Class of Phytochemicals. Available from. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/48076.pdf> ” (2015).
- [9] Kontogiorgis, C., Detsi, A., and Hadjipavlou-Litina, D. “Coumarin-based drugs: a patent review (2008 - present) ”. Expert Opin. Ther. Pat. 22 : p 437-454 (2012).
- [10] Sandhu, S., Bansal, Y., Silakari, O., and Bansal, G. “Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. Bioorg”. Med. Chem. 22 : p. 3806-3814 (2014).
- [11] Grover, J., and Jachak, S.M. “Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development”. RSC Adv. 5 : p 38892-38905 (2015).
- [12] Rayar, A.M., “In silico drug design et chimie médicinale : développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2”. Thèse de doctorat : Bioinformatique : Paris, CNAM (2017).
- [13] Stahl M., Rarey M. “Detailed analysis of scoring functions for virtual screening”. J. Med. Chem. 44 : p 1035-1042 (2001).

Références bibliographique

- [14] Chang M.W., Ayeni C., Breuer S., Torbett B.E. “Virtual screening for HIV protease inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina”. PLoS ONE 5, e11955 (2010).
- [15] Nocedal J., Wright S.J.. Quasi-Newton Methods. “In Numerical Optimization. T. V. Mikosch, S. I. Resnick, S. M. Robinson (Ed.) ”. (2006).
- [16] Gaussian 09, Révision D.01, M.J. Frisch, G.Z. Trucks, H.B. Schlegel, G.E.
- [17] Sousa, S.F., Fernandes, P.A., and Ramos, M.J. “Protein-ligand docking: current status and future challenges. Proteins: Struct., Funct., Bioinf”. 65 : p 15-26 (2006).

Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail axé sur la modélisation moléculaire par docking par l'AutoDock Vina, a pour but essentiel d'étudier théoriquement l'inhibition du cyclooxygénase 2 par le cyclocoumarol et ses dérivées qui peuvent avoir un intérêt biologique et thérapeutique vis-à-vis l'inflammation.

Afin de réaliser le Docking pour comprendre le mécanisme grâce auquel les composés vont inhiber la COX et plus particulièrement dans quelle partie de l'enzyme ils vont se fixer et déterminer leurs modes de liaisons, des étapes de préparation ont été effectuées.

Le logiciel Discovery Studio nous a permis la visualisation des différentes interactions qui peuvent stabilisées les complexes enzyme-ligand.

Le calcul du RMSD montre que le cyclocoumarol peut inhiber la série des COXs étudiées.

Les principales interactions qui guident et orientent les ligands au sein des macromolécules sont de type liaisons hydrogène et hydrophobiques.

Pour créer d'autres inhibiteurs de la COX-2, un deuxième docking est réalisé avec l'enzyme choisi (3NTB) et sept dérivés du cyclocoumarol. Les résultats montrent que le dérivé D est le meilleur inhibiteur, ce qui est en accord avec les tests biologiques.

Annexe

Annexe 02

| dérivés | Nomenclature |
|----------|---|
| A | 2-methoxy-2-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one |
| B | 2-methoxy-2-methyl-(1-(p-tolyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one |
| C | methoxy-2-methyl-(1-(4-tert-butylphenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one |
| D | 2-methoxy-2-methyl-(1-(4-methoxyphenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one |
| E | 2-methoxy-2-methyl-(1-(4-fluorophenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one |
| F | 2-methoxy-2-methyl-(1-(4-trifluoromethyl)phenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one |
| G | 2-methoxy-2-methyl-(1-(4-nitrophenyl))-3,4-dihydropyrano[3,2-c]chromen-5(2H)-one |