

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Mathématiques et de l'Informatique et des Sciences de la Matière  
Département des Sciences de la Matière  
Spécialité : Chimie Physique



Mémoire de fin d'études  
Master

---

## **Évaluation in-silico de l'effet biologique de composés flavonoïdes d'origine naturelle**

---

Présenté par :

**M<sup>me</sup> GHAMRI Loubna**

Sous la direction de :

**D<sup>r</sup>. AIMENE Yassine**

**Juin 2023**

# Remerciement

**Avant tout, nous remercions ALLAH, le tout puissant, de nous avoir donné la force, la volonté et la patience pour achever ce travail.**

**Je tiens en tout premier lieu à adresser mes plus vifs remerciements à mon directeur de recherche M. AIMENE Yassine pour son aide, ses conseils et son effort tout au long de mon travail.**

**Mes sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidée et contribué à la rédaction de ce mémoire et à la réussite de cette belle année d'université. J'exprime ma gratitude aux membres de jury d'avoir accepté d'évaluer et examiner mon travail ainsi que le Pr. Mekki Kadri, le directeur du Laboratoire de Chimie Physique (LCP) de l'Université de Guelma de m'avoir accueilli dans son Laboratoire de recherche**

**Merci.**





# Dédicace



## À mes parents

Qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien, leurs encouragements, leurs dévouements exemplaires et leurs énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir. Je les remercie pour tout ce qu'ils m'ont fait

## À mes beaux parents

Que dieu vous protège et vous garde insha'allah

## À mon mari

Au compagnon du chemin et à l'ami de tous les jours, avec ses bons et ses mauvais côtés : Mon cher époux, je te dédie cette recherche en guise d'expression de mes remerciements pour ton soutien continu. A toi qui a toujours été le premier à me soutenir et à m'encourager « **Ali** »

## À mon fils

Je n'étais pas prête pour toi et je n'étais pas prête à devenir mère mais Dieu savait ce qui me manquait et ce dont j'avais besoin. J'ai eu de la chance avec toi. Mon meilleur ami qui me pousse à devenir une meilleure personne. Je t'aime, « **Taj Elddin.** »

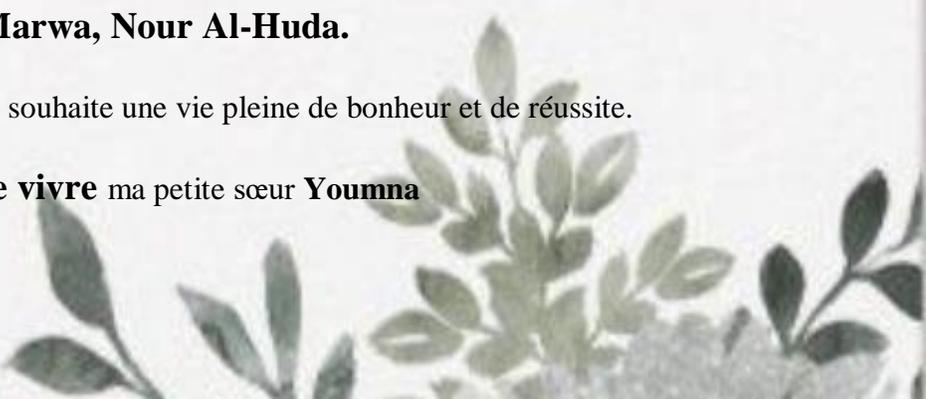
## À mes chers frères et sœurs.

**Loukman, Mehdi et Zakaria paix à son âme.**

**Nora, Marwa, Nour Al-Huda.**

Pour leur soutien moral, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de réussite.

**À ma joie de vivre** ma petite sœur **Youmna**



## Résumé

Le but de notre étude est l'évaluation in-silico de l'effet biologique de cinq composés flavonoïdes d'origine naturelle (L1 à L5) en tant qu'inhibiteurs potentiels de l'ACH<sup>9</sup>. À cette fin, des analyses de docking moléculaire ont été réalisées avec le programme Autodock4.2 pour évaluer la meilleure position de chaque ligand dans le site catalytique de l'enzyme ACH<sup>9</sup>. Cette approche nous permet d'explorer de nouvelles molécules naturelles potentiellement efficaces contre les tumeurs associées à la surexpression de l'ACH<sup>9</sup>.

Les résultats préliminaires montrent que les cinq dérivés flavonoïdes sont bien placés dans le site actif de l'ACH<sup>9</sup>, où elles sont alignées avec l'inhibiteur naturel 9FK. Les scores énergétiques varient de 6,31 à -9,67 kcal/mol. Cependant, L3 montre une énergie de complexation ( $\Delta G = -6,59$  kcal/mol) et une constante d'inhibition ( $K_i = 14,77$   $\mu$ M) plus faibles que les autres dérivés qui n'ont pas établi d'interactions avec le zinc. En conséquence, le pouvoir inhibiteur du ligand L3 pourrait en rendre un médicament prometteur pour les tumeurs.

Enfin, nous proposons de vérifier ces résultats théoriques par des études expérimentales in-vitro et/ou in-vivo.

**Mots clés :** Flavonoïde, ACH<sup>9</sup>, Docking Moléculaire.

## Abstract

The aim of our study is the in-silico evaluation of the biological effect of five natural flavonoid compounds (L1 to L5) as potential ACH<sup>9</sup> inhibitors. To this end, molecular docking analyzes were carried out with the Autodock4.2 program to evaluate the best position of each ligand in the catalytic site of the ACH<sup>9</sup> enzyme. This approach allows us to explore new natural molecules that are potentially effective against tumors associated with the ACH<sup>9</sup> overexpression.

Preliminary results show that the five flavonoid derivatives are well placed in the active site of ACH<sup>9</sup> and aligned with the natural inhibitor 9FK. Energy scores vary from 6.31 to -9.67 kcal/mol. However, L3 shows a lower complexation energy ( $\Delta G = -6.59$  kcal/mol) and an inhibition constant ( $K_i = 14.77$   $\mu$ M) than the other derivatives that did not establish interactions with zinc. As a result, the inhibitory power of the L3 ligand could make it a promising drug for tumors.

Finally, we propose to verify these theoretical results through experimental studies in-vitro and in-vivo.

**Keywords:** Flavonoid, ACH<sup>9</sup>, Molecular Docking.

## ملخص

الهدف من دراستنا هو التقييم الحاسوبي للتأثير البيولوجي لخمسة مركبات الفلافونويد من أصل طبيعي (L1) إلى (L5) كمثبطات محتملة لـ ACH9 تحقيقاً لهذه الغاية، تم إجراء تحليلات الالتحام الجزيئي باستخدام برنامج Autodock4.2 لتقييم أفضل وضع لكل جزيء في الموقع التحفيزي لإنزيم ACH9. يسمح لنا هذا النهج باكتشاف جزيئات جديدة من أصل طبيعي يحتمل أن تكون فعالة ضد الأورام المرتبطة بفرط في افراز ACH9 أو فرط تركيز .

تظهر النتائج الأولية أن مركبات الفلافونويد الخمسة متموضعة جيداً في الموقع النشط لـ ACH9 ، حيث تتطابق مع موقع المثبط الطبيعي FK. 9 تتراوح طاقة الالتحام من 6.31 إلى -9.67 كيلو كالوري/مول. ومع ذلك، يُظهر L3 طاقة ارتباط ( $\Delta G = -6.59 \text{ kcal/mol}$ ) وثابت تثبيط ( $K_i = 14.77 \mu\text{M}$ ) أقل من المشتقات الأخرى التي لم تنشئ تفاعلات مع الزنك. نتيجة لذلك، يمكن للقوة المثبطة للجزيء L3 أن تجعله دواءً واعدًا للأورام.

أخيراً، نقترح التحقق من هذه النتائج النظرية عن طريق الدراسات التجريبية في المختبر و في الجسم الحي.

**الكلمات المفتاحية:** الفلافونويد، ACH<sup>9</sup>، الالتحام بالمحاكاة.

## Abréviations

ACH<sup>9</sup> : Anhydrase carbonique humaine 9

ADT : AutoDock Tools

AGL : Algorithme génétique de Lamarkin

Asn : Asparagin

Asp : Aspartique

Cys : Cystéine

DLG : docking log file

DPF : Docking Paramètre File

GLG: Grid LoG file

Gln : Glycine

Glu : Glutamique

Glu : Glutamin

His : Histidine

Ki : Constante d'inhibition

L1 : Phytolarigenin

L2 : Pilosin

L3 : Ladanein

L4 : Chrysin

L5 : Apigenin

Leu : Leucine

PDB : Protéine Data Bank

Pro : Proline

RMSD : Root Mean Square Déviation

Thr : Théréonine

Trp : Tryptophane

Val : Valine

VDW : Van Der Waals

$\Delta G$  : Energie d'interaction

9FK: 5-(1-naphthalen-1-yl-1,2,3-triazol-4-yl)thiophene-2-sulfonamide.

# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	1
------------------------------------	---

## Partie bibliographique

<b>I. Les flavonoïdes</b> .....	2
I.1. Généralités .....	2
I.2. Structure .....	2
I.3. Classification .....	3
I.4. Propriétés biologiques .....	6
I.5. Distribution .....	7
<b>II. Anhydrases carboniques</b> .....	8
II.1. Généralités .....	8
II.2. Structure .....	8
II.3. Anhydrase carbonique 9 (AC <sup>9</sup> ) .....	9
II.3.1. Expression .....	9
II.3.2. Cause de surexpression .....	10
II.3.3. Rôle de l'AC <sup>9</sup> dans la tumorigenèse .....	10
II.3.4. Les inhibiteurs d'anhydrase carbonique .....	11
<b>III. Interactions intermoléculaires Protéine–Inhibiteurs</b> .....	13
III.1. Les liaisons hydrogènes .....	13
III.2. Les interactions électrostatiques .....	13
III.3. Les interactions hydrophobes .....	14
III.4. Les interactions de Van Der Waals .....	14
III.5. Les interactions entre systèmes $\pi$ .....	15
<b>IV. Docking moléculaire</b> .....	16
IV.1. Définition .....	16
IV.2. Les logiciels de docking moléculaire .....	16
IV.3. Principe de docking moléculaire .....	17
IV.4. Les outils de docking moléculaire .....	18
IV.5. Les Algorithmes Génétiques (AG) .....	18
IV.6. Fonctions de scores .....	19
Références .....	20

## Partie computationnelle

<b>V. Méthodes et matériels</b> .....	23
V.1. Programmes utilisés .....	23
V.2. Préparation des molécules pour le docking .....	23
V.2.1. Le récepteur .....	23
V.2.2. Les ligands .....	24
V.3. Mis en œuvre de l'amarrage moléculaire .....	25
V.3.1. Calculs de la boîte d'interaction (calculs AutoGraid4) .....	25
V.3.2. Recherche des solutions (calculs AutoDock4) .....	27
<b>VI. Résultats et discussions</b> .....	28
VI.1. Validation de la fiabilité du système de docking .....	28
VI.1.1. Ecart quadratique moyen (RMSD) .....	28
VI.1.2. L'analyse visuelle .....	28
V.1.3. Interactions entre le ligand naturel (9FK) et son récepteur (ACH <sup>9</sup> ) .....	29
VI.2. Docking des dérivés flavonoïdes .....	32
VI.2.1. Alignement des dérivés flavonoïdes .....	33
VI.2.2. Interprétation des histogrammes .....	33
VI.2.3. Interaction L1—ACH <sup>9</sup> .....	38
VI.2.4. Interaction L2—ACH <sup>9</sup> .....	39
VI.2.5. Interaction L3—ACH <sup>9</sup> .....	40
VI.2.6. Interaction L4—ACH <sup>9</sup> .....	41
VI.2.7. Interaction L5—ACH <sup>9</sup> .....	42
Références .....	42
<b>Conclusion générale</b> .....	43

# **Introduction générale**

## Introduction générale

Les flavonoïdes sont des molécules naturelles appartenant à la grande famille des polyphénols. Elles se trouvent dans différentes parties de la plante. Dans les fruits, les fleurs et les feuilles. D'après les chercheurs, il en existe plus de 8 000, sans compter celles qui n'ont pas encore été identifiées. Ainsi, les flavonoïdes sont bénéfiques pour le corps humain grâce à leurs puissantes propriétés antioxydantes. Ils ont la capacité de neutraliser les radicaux libres qui provoquent un stress oxydatif, endommagent nos cellules et accélèrent leur vieillissement.

À ce jour, les flavonoïdes constituent une grande famille utilisée dans la médecine traditionnelle tant qu'anti-inflammatoire, antibactérien, antitumoral, etc. Pour cela, nous nous intéressons ici à explorer l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes d'origine naturelle contre l'enzyme anhydrase carbonique humaine-9 (ACH<sup>9</sup>). D'un point de vue médical, bloquer l'ACH<sup>9</sup> est l'une des stratégies thérapeutiques visant à réduire les cancers associés. Les médicaments d'ACH<sup>9</sup> sont des molécules capables de se lier au site actif d'ACH<sup>9</sup>, formant un complexe 'protéine-ligand' pouvant limiter la progression tumorale.

Pour cette propose, nous utilisons les méthodes de docking moléculaire. Cette approche joue un rôle important dans la compréhension du mécanisme d'inhibition et de prédire les modes possibles d'interactions 'enzyme-inhibiteur'.

Notre travail est divisé en deux grandes parties :

**La partie bibliographique** qui comprend des notions générales sur les flavonoïdes, l'ACH<sup>9</sup> et ses mécanismes d'inhibition. Nous avons également présenté les interactions intermoléculaires inhibiteur-protéine et les méthodes théoriques permettant l'étude d'amarrage moléculaire.

**Partie computationnelle** est dédiée à la description de la méthodologie du docking utilisée ainsi que les résultats et discussions.

**PARTIE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Chapitre I :**

## **Les flavonoïdes**

# I. Les flavonoïdes

## I.1. Généralités

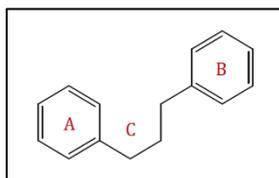
Les flavonoïdes (ou bioflavonoïdes) sont des métabolites secondaires des plantes vasculaires, ils ont tous la même structure de base, formée de deux cycles aromatiques reliés par trois atomes de carbone : C6-C3-C6, la chaîne est généralement fermée à six ou dans un cycle contenant un hétérocycle. Certains auteurs, comme Bruneton [1], préfèrent séparer les dérivés de flavanes, les anthocyanes et les isoflavones pour tenir compte de leurs propriétés spécifiques et réserver la nomenclature aux autres flavonoïdes.

Les flavonoïdes forment une classe de composés polyphénoliques omniprésents dans les plantes vasculaires (y compris les légumes et les céréales) où ils se rencontrent à la fois sous forme libre, ou le plus souvent sous forme de glycosides (hétérosides) dans tous les organes végétatifs et floraux.

Ces composés présentent un grand intérêt en raison de leurs nombreux effets bénéfiques sur la santé. Leurs propriétés antibactériennes, antivirales, antiplaquettaires, antiallergiques, anti-inflammatoires, antitumorales et leur activité antioxydante sont étudiées pour atteindre des objectifs thérapeutiques dans le traitement de certains cancers, maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Certains d'entre eux sont également utilisés comme additifs alimentaires, médicamenteux et cosmétiques [2-3].

## I.2. Structure

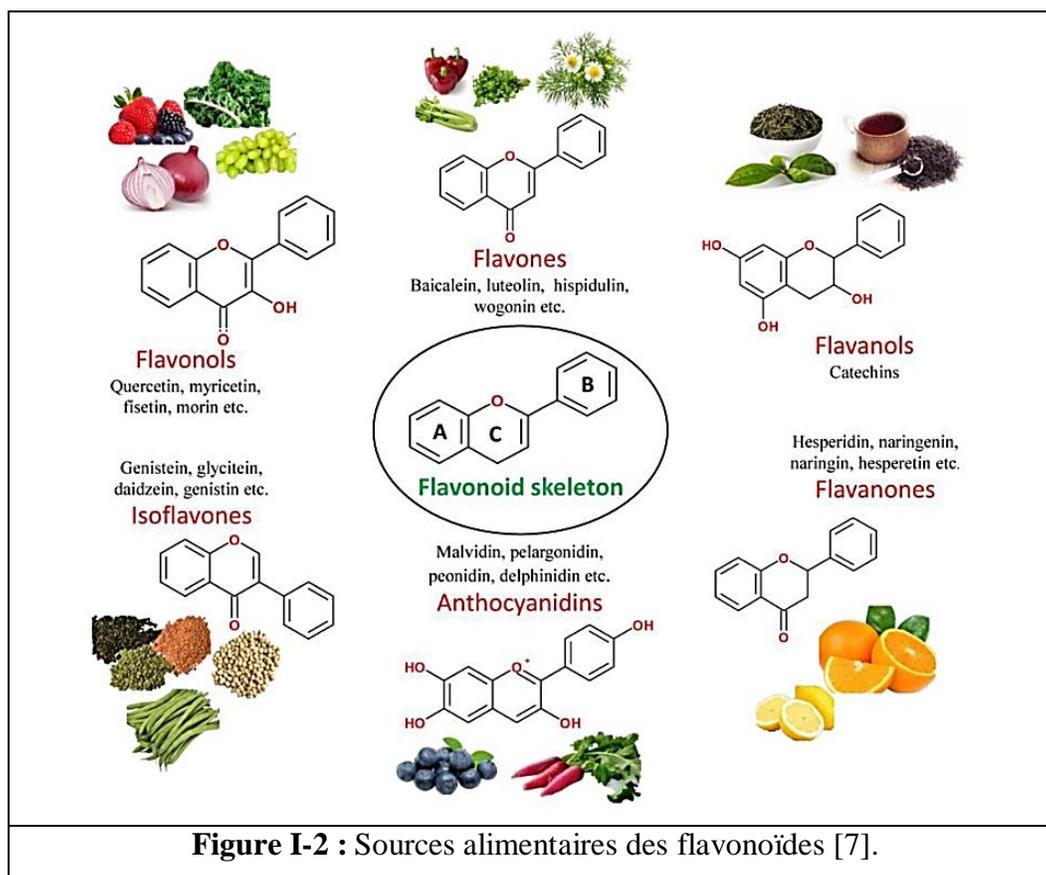
La classe des flavonoïdes est depuis bien des années définies par la nature de son squelette de carbone qui comprend 15 atomes répartis selon la séquence C6-C3-C6 commune à tous les flavonoïdes et dans laquelle deux cycles benzéniques A et B sont reliés par un élément à 3 atomes de carbones (voir figure I-1) [4].



**Figure I-1** : Squelette de base des flavonoïdes.

### I.3. Classification

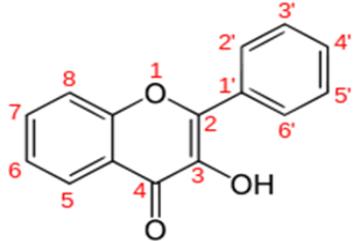
Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes selon le degré d'oxydation et la nature des substituants portés sur la chaîne à trois carbones. Quatorze groupes différents ont été identifiés dont six sont particulièrement les plus répandus et les mieux caractérisés : flavones, flavonols, isoflavones, flavanones, flavanols et anthocyanidines. Ces composés peuvent être trouvés dans une variété de fruits, de légumes et d'autres aliments à base de plantes (figure I-2) [5,6].



#### I.3.1. Les flavonols

Les flavonols sont les constituants flavoniques les plus abondants des aliments. Les composés les plus représentatifs de cette famille sont le quercétine, kaempferol et la quercétine (figure I-3). Ces dernières possèdent un très fort pouvoir antioxydant en raison de leur structure chimique favorable au piégeage des radicaux libres [8].

Composé	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Quercétine	OH	H	OH	H	H	H	OH	OH	H
Kaempférol	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Myricétine	OH	H	OH	H	H	OH	OH	OH	H

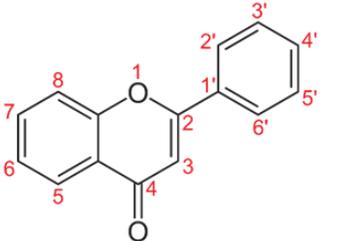


**Figure I-3** : Structure chimique des flavonols.

### I.3.2. Les flavones

Les flavones sont une classe de composés aromatiques trouvés dans les plantes supérieures sous deux formes, apigénine et lutéoline (figure I-4). Certaines sont responsables de l'aspect blanc ou ivoire de certaines fleurs, comme les roses et les œillets. Ils ont des activités physiologiques remarquables, notamment des propriétés antimicrobiennes et antivirales [9].

Composé	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Apigénine	OH	H	OH	H	H	OH	H	H	H
Lutéoline	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H



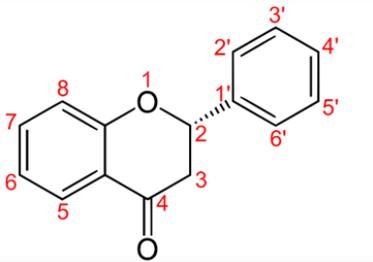
**Figure I-4** : Structure chimique des flavones.

### I.3.3. Les flavanones

Les flavanones ont une structure similaire à celle des flavones mais ne possèdent pas d'insaturation au niveau de l'hétérocycle. Les flavanones sont fréquemment rencontrés chez les Myrtacées. Dans l'alimentation, les flavanones se retrouvent dans les tomates, certaines plantes comme la menthe, et sont présents en grandes quantités dans les agrumes. Les principaux aglycones sont la naringénine dans le pamplemousse, l'héspéridine dans l'orange et l'ériodictyol dans le citron (figure I-5) [8].

## I. Les flavonoïdes

Composé	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Hespérétine	OH	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Naringinine	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H
Ériodictyol	OH	H	OH	H	H	H	OH	OH	H

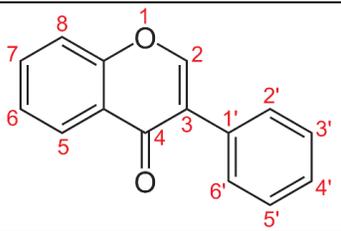


**Figure I-5** : Structure chimique des flavonones.

### I.3.4. Les isoflavones

Les produits dérivés du soja sont la principale source d'isoflavones dans l'alimentation, qu'elles soient glycosylées ou non (figure I-6). On les rencontre aussi dans les légumineuses [8].

Composé	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Biochanin	OH	H	OH	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H
Calycosine	H	H	OH	H	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H	H
Genistein	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	H



**Figure I-6** : Structure chimique des isoflavonones.

### I.3.5. Les flavanols

Les flavanols existent sous forme de monomères. L'unité la plus simple est la catéchine, ou polymérique appelés proanthocyanidines. La catéchine est présente dans de nombreux fruits comme la pomme, le chocolat et le thé [8].

### I.3.6. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels qui donnent les couleurs à de nombreuses plantes. Leur aptitude à se solubiliser facilement dans les milieux aqueux offre des possibilités très larges dans le domaine industriel. Ils sont responsables de la coloration (orange, rose, rouge, violet et bleue) de certaines fleurs (tulipe, rose, orchidée) et fruits (pomme, baies, raisin). Une propriété importante de ces composés réside dans leur aptitude antioxydante, et de nombreuses études sur leurs activités biologiques en témoignent [8].

### I.4. Propriétés biologiques

#### I.4.1. Propriétés antioxydantes

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydant et leur capacité à piéger les radicaux libres, comme radicaux hydroxyles (OH<sup>·</sup>), anions superoxydes (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) et radicaux peroxylipidiques.

Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (3-OH) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques qui peuvent renforcer ces effets délétères par la production des radicaux hydroxyles (OH<sup>·</sup>) [10].

En tant qu'antioxydants, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la cancérogenèse. Ils inhibent en plus l'angiogenèse, la prolifération cellulaire et affectent le potentiel invasif et métastatique des cellules tumorales [10].

#### I.4.2. Propriétés antiallergiques

Les flavonoïdes sont également connus pour leurs effets antiallergiques. Ils agissent par inhibition des enzymes qui favorisent la libération d'histamine à partir des mastocytes et des basophiles : l'AMPC phosphodiesterase et la Ca<sup>2+</sup>ATPase [11,12].

En outre, la quercétine exerce un puissant effet inhibiteur de la libération d'histamine à partir des mastocytes avec le même caractère et même interligne.

#### I.4.3. Propriétés anti-inflammatoires

Les flavonoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent aider à soulager les maux et les douleurs associés à l'inflammation. Des études ont montré que les flavonoïdes peuvent réduire l'inflammation et aider à prévenir les maladies cardiovasculaires et le cancer.

Les flavonoïdes peuvent également aider à réduire les symptômes de l'asthme et à prévenir l'ostéoporose. Ils sont également connus pour améliorer la santé des yeux et réduire le risque de cataracte et de dégénérescence maculaire liée à l'âge.

### I.4.4. Propriétés antibactériennes

Les flavonoïdes sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [13].

### **I.5. Distribution**

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens, ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages.

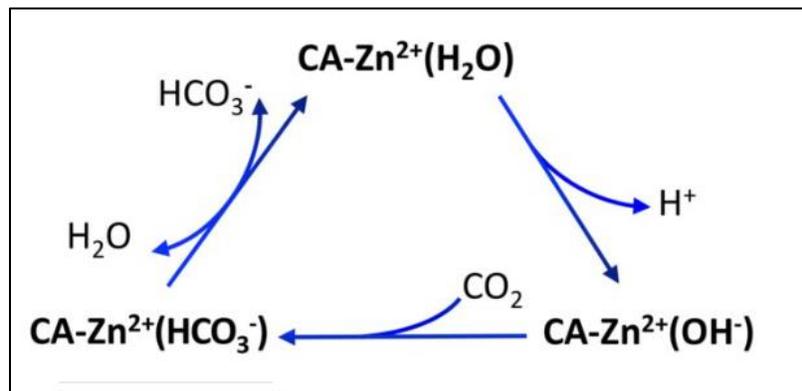
Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eu une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes [8].

**Chapitre II :**  
**Anhydrases carboniques**

## II. Anhydrases carboniques

### II.1. Généralités

Les anhydrases carboniques (ACs) sont des métalloenzymes omniprésentes impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. En plus du rôle bien établi des inhibiteurs d'AC comme diurétiques et médicaments anti-glaucome, il a été montré récemment que les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique pourraient être une cible potentielle pour la découverte d'anticancéreux. Jusqu'ici 16 isoformes de l'AC ont été mises en évidence. Elles se distinguent par des localisations subcellulaires et tissulaires différentes, ainsi que par une variation de leurs activités catalytiques. Plusieurs ACs sont cytosoliques (AC 1, 2, 3, 7 et 8), cinq sont transmembranaires (AC 4, 9, 12, 14, 15), deux mitochondriales (AC 7A et 7B) et une est sécrétée (AC 6). Les anhydrases carboniques catalysent la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone en anion bicarbonate et proton, selon la réaction : (voir la figure II-1)



**Figure II-1** : Mécanisme catalytique de l'AC

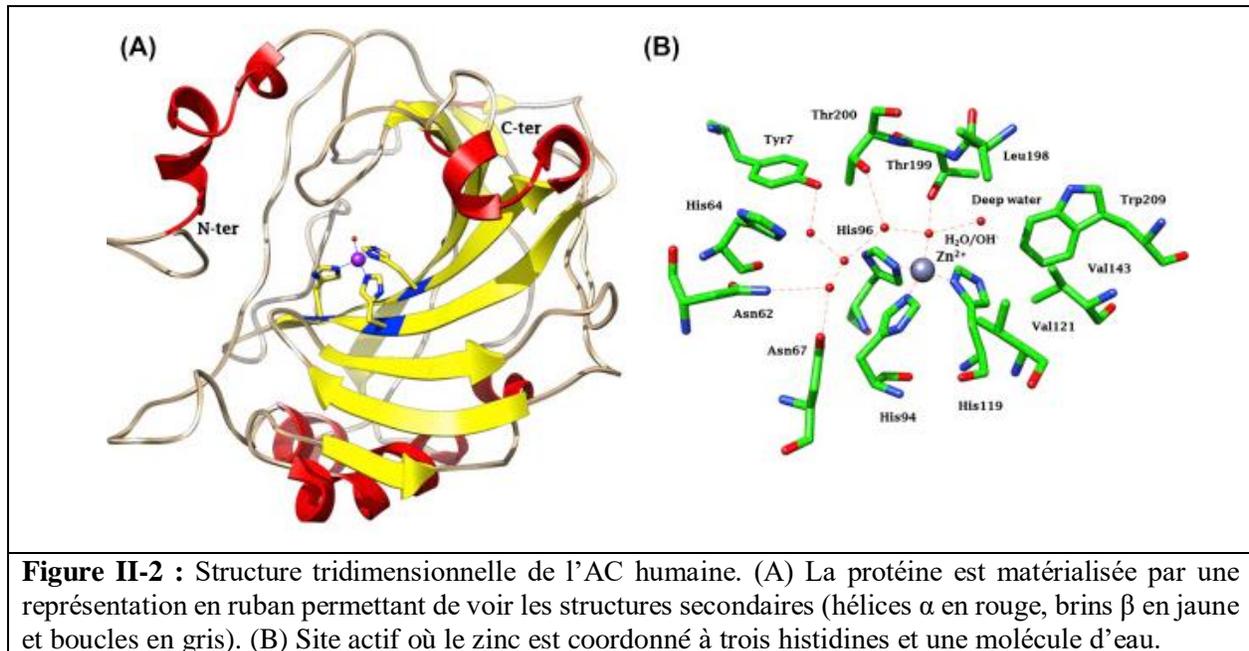
Les isoformes 1 et 2 sont principalement responsables des rôles physiologiques alors que d'autres isoformes sont impliquées dans des phénomènes pathologiques comme, le cancer (AC 9 et 12), l'épilepsie (AC 7), l'obésité (AC 9), la diurèse (AC 2, AC 4, AC 12 et AC 15) ou l'ostéoporose (AC 4 et AC14) [14].

### II.2. Structure

L'étude cristallographique des ACs souligne l'homologie structurale des isoformes et la conservation des sites actifs avec une même architecture. La protéine, quasi sphérique à l'exception de la région N-terminal plus éloignée de la molécule, possède un seul domaine actif

## II. Anhydrases carboniques

(poche contenant le Zn) entouré de trois résidus histidines en position 94, 96 et 119, avec l'H<sub>2</sub>O ou OH<sup>-</sup> comme quatrième ligand. L'atome du zinc est situé dans une grande cavité conique, large d'environ 12 Å et profonde de 13 Å, qui s'étend de la surface de la protéine vers le centre de la molécule (figure II-2) [15].

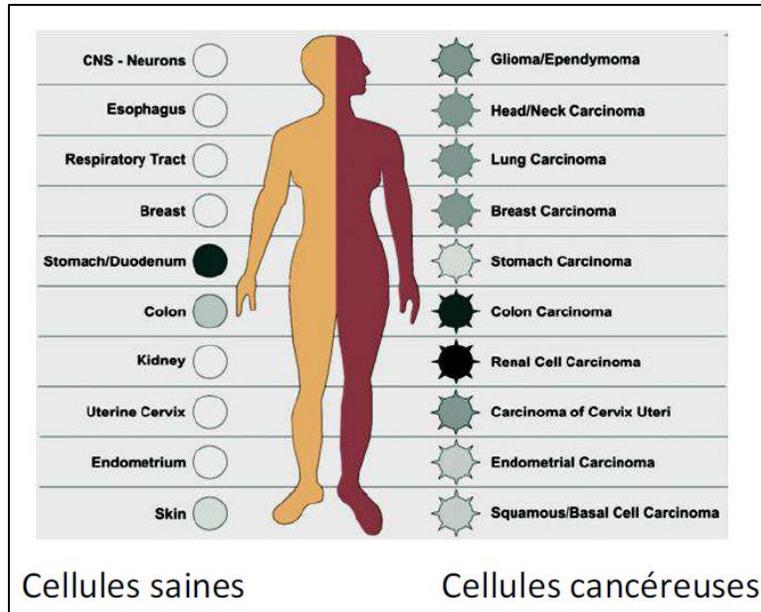


### II.3. Anhydrase carbonique 9 (AC<sup>9</sup>)

#### II.3.1. Expression

Deux isoformes d'AC sont surexprimées dans certains cancers. La première est l'AC<sup>9</sup>, caractérisée par Pasterokeva et son équipe en 1992 ; la seconde est l'AC<sup>12</sup>.

L'AC<sup>9</sup> est très peu exprimée dans les cellules saines, par contre, elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses (notamment dans les tumeurs solides), suggérant la possibilité d'une action thérapeutique sélective, (figure II-3). Sa surexpression a été reportée dans des carcinomes cellulaires de plusieurs organes, dont l'œsophage, le poumon, le rein, le côlon, le sein,... [16]



**Figure II-3 :** Expression de l'AC<sup>9</sup> dans les tissus sains et cancéreux (plus le gris est prononcé plus l'AC<sup>9</sup> est surexprimée).

### II.3.2. Cause de surexpression

Les cellules cancéreuses formant une tumeur solide sont caractérisées par un état d'hypoxie. Les cellules situées au centre de la masse cancéreuse se retrouvent éloignées des capillaires sanguins les approvisionnant en oxygène et en glucose. L'hypoxie régule ainsi l'expression de différents gènes comme celui de l'AC<sup>9</sup>. En raison de sa surexpression en milieu hypoxique, l'AC<sup>9</sup> a été proposée comme marqueur de l'hypoxie tumorale.

### II.3.3. Rôle de l'AC<sup>9</sup> dans la tumorigenèse

L'AC<sup>9</sup> catalyse la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone. Lors de cette réaction, elle favorise les phénomènes d'invasion et de migration cellulaire. Par ailleurs, elle participe à l'acidification du milieu extracellulaire ce qui contribue à l'induction d'une chimiorésistance en diminuant l'efficacité des agents anticancéreux, comme certains inhibiteurs de topoisomérases (doxorubicine, bléomycine, mitomycine, irinotécan,...).

En effet, certains médicaments (tels que des anthracyclines) étant des bases faibles, le milieu extracellulaire acide augmente la proportion de formes ionisées et réduit ainsi leur passage

membranaire passif. Une étude récente démontre que, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein précoce et traitées par la doxorubicine, l'expression de l'AC<sup>9</sup> est corrélée à un mauvais pronostic thérapeutique.

De façon générale, la surexpression de l'AC<sup>9</sup> est souvent associée à une réponse faible des thérapies classiques de radiothérapie ou de chimiothérapie. Dans des modèles de tumeurs du sein, une diminution de la croissance tumorale et du processus métastatique a été observée lors de l'inhibition de l'AC<sup>9</sup>.

En conséquence, l'AC<sup>9</sup> a été proposée comme une cible thérapeutique potentielle et une des approches possibles serait d'inhiber son activité enzymatique avec des « petites molécules » inhibitrices.

### II.3.4. Les inhibiteurs d'anhydrase carbonique

Les inhibiteurs d'anhydrases carboniques (IAC) sont répartis en quatre classes principales [17]:

- I. Les sulfonamides tels que les sulfamates, les sulfamides et leurs analogues, et des anions, qui coordonnent le zinc du site actif de l'enzyme (figure II-4 A et B) ;
- II. Les phénols, tels que les phénols simples (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) qui se lient à l'ion hydroxyde ou la molécule d'eau coordonnée au zinc à partir du site actif, à travers un réseau de deux liaisons hydrogène (figure II-4 C) ;
- III. Les polyamines, telles que la spermine, la spermidine et les congénères, qui se lient de manière semblable aux phénols mais non identiques, c'est-à-dire par ancrage à la molécule d'eau coordonnée au Zn(II) (figure II-4 D) ; et récemment une nouvelle classe d'inhibiteurs efficaces a été déclarée,
- IV. Les coumarines et les thiocoumarines, qui ont un mécanisme d'inhibition non dépendant du zinc. Ces inhibiteurs masquent l'entrée (sous forme hydrolysée) au site actif (figure II-4 E). Tous ces inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ont été utilisés en médecine depuis longtemps comme des prodrogues [18].

## II. Anhydrases carboniques

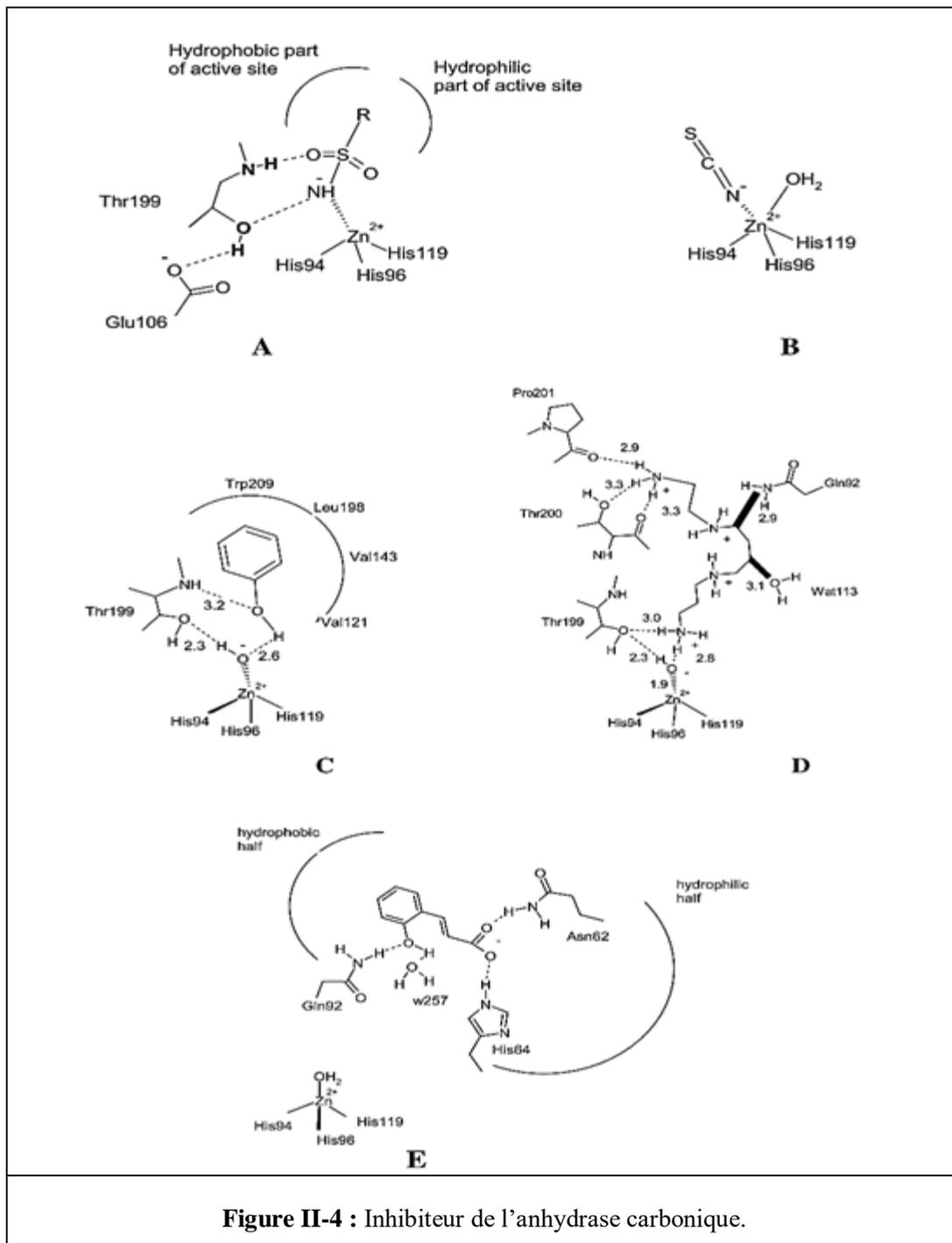


Figure II-4 : Inhibiteur de l'anhydrase carbonique.

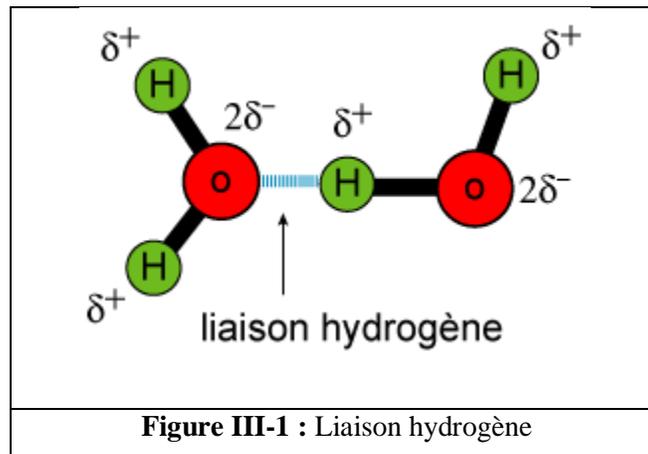
**Chapitre III :**  
**Interactions intermoléculaires**  
**Protéine–Inhibiteurs**

### III. Interactions intermoléculaires Protéine–Inhibiteurs

Au niveau du site actif, le processus d'interaction se fait par liaison complémentaire du ligand avec l'architecture protéique. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles.

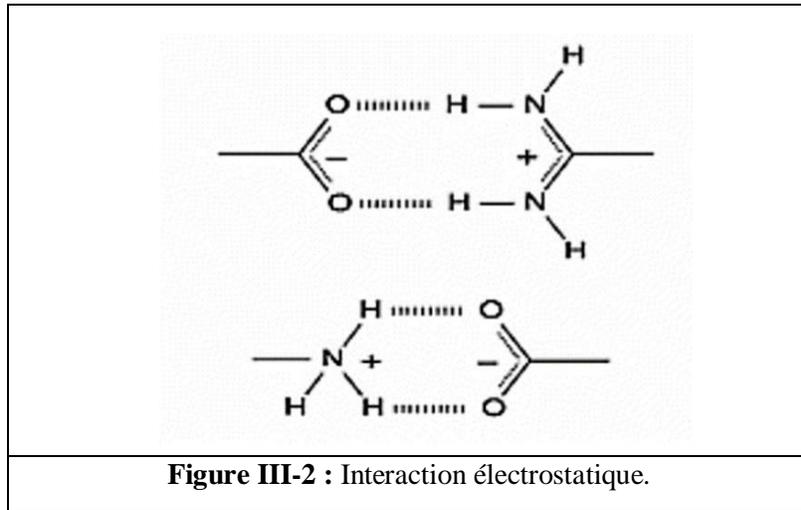
#### III.1. Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogène sont des interactions d'origine électrostatique de type dipôle-dipôle entre un atome électronégatif dit "accepteur" (porteur d'une charge partielle  $\delta^-$ ) et un atome d'hydrogène polaire (porteur d'une charge partielle  $\delta^+$ ) qui est lié de manière covalente à un atome électronégatif dit "donneur" (porteur d'une charge partielle  $\delta^-$ ). Une distance faible entre le donneur et l'accepteur est nécessaire pour qu'une liaison hydrogène soit significative (0,8 à 2,8 Å), et son énergie est maximale (de l'ordre de 5 kcal.mol<sup>-1</sup>) [19]. Les liaisons hydrogènes sont définies par la distance entre les deux atomes qui forment la liaison covalente D–H de type  $\delta$ , la longueur de l'interaction H...A et l'angle D–H...A.



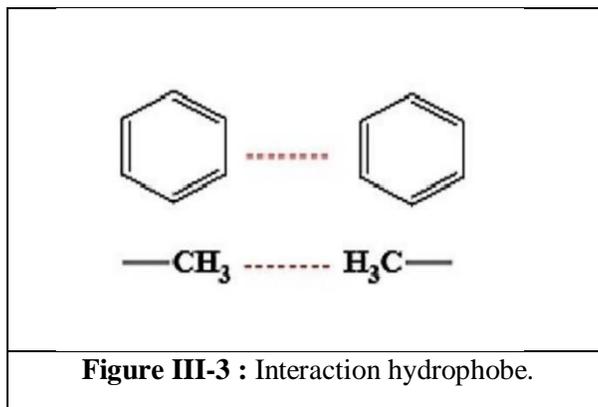
#### II.2. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatique assez contre est l'une des interactions fondamentales simplifiée qui permet l'étude des phénomènes électriques pour des charges immobiles [20].



### III.3. Les interactions hydrophobes

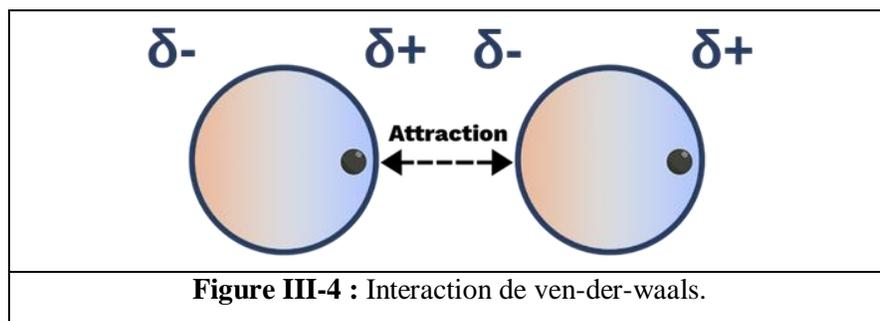
Les molécules dépourvues de groupes chargés ou d'atomes capables de former des liaisons hydrogène ne peuvent donc pas s'hydrater ; pour cette raison on les nomme substances hydrophobes. L'effet hydrophobe est la tendance de ces groupes à se rassembler par coalescence de façon à minimiser les contacts avec l'eau [21].



### III.4. Les interactions de Van Der Waals

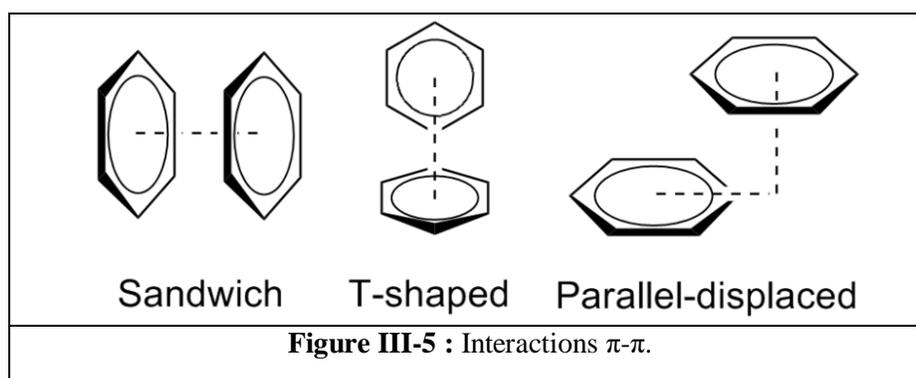
Ce sont des interactions entre atomes, molécules, ou entre une molécule et un cristal. Ces interactions Van Der Waals s'appliquent à très courte distance et ne concernent donc que les atomes

de surface. Elles sont nombreuses et contribuent essentiellement dans la recherche de la concordance stérique entre le ligand et la protéine réceptrice [22]. Les interactions de VDW sont de faible intensité (ordre de grandeur du  $\text{kcal.mol}^{-1}$ ) de distance entre 3 à 4 Å.



#### III.5. Les interactions entre systèmes $\pi$

- L'interaction  $\pi$ - $\pi$  ce forme « sandwich » qui est la configuration la plus courante
- L'interaction  $\pi$ - $\pi$  face à face : les deux cycles aromatiques sont parallèles et leurs centres géométriques sont distants de moins de 4 Å environ.
- L'interaction  $\pi$ - $\pi$  en forme de T : les deux cycles aromatiques forment un angle droit et leurs centres géométriques (centroïde) sont distants de moins de 5,5 Å environ [23].



**Chapitre IV :**  
**Doking moléculaire**

## IV. Docking moléculaire

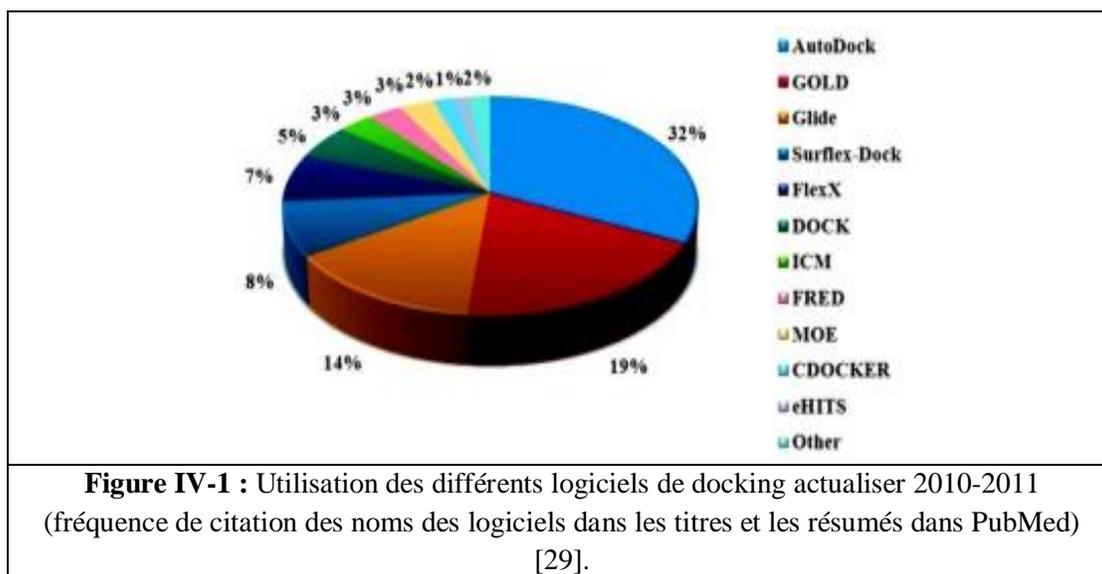
### IV.1. Définition

Dans le domaine de la modélisation moléculaire, le docking moléculaire est connu sous le nom « amarrage moléculaire ». Le docking reste une étape importante dans la compréhension des réactions biologiques et par suite la conception de médicaments ; est un processus de simulation qui prédit de la structure et la conformation d'un complexe moléculaire récepteur-ligand. Le récepteur macromoléculaire étant généralement une protéine et le ligand soit une petite molécule soit une autre protéine [24,25]. Le Docking moléculaire est également un outil important dans la conception de médicaments où on utilise une simulation assistée par ordinateur [26].

Le Docking moléculaire a pour but de prédire la conformation et l'orientation d'un ligand dans le site actif de la protéine, ainsi que la détermination de mode d'interaction des liaisons probables, et énergétiquement, en prédisant l'affinité de liaison [27].

### IV.2. Les logiciels de docking moléculaire

De nombreux logiciels de docking sont actuellement disponibles et la plupart sont conçus pour le criblage virtuel. Les cinq les plus fréquemment cités représentent 80% du total de citations trouvées dans la littérature (figure IV-1) : AutoDock (32%), GOLD (19%), Glide (14%), Surflex-Dock (8%) et FlexX (7%) [28].



Il est intéressant de remarquer que les deux logiciels les plus cités, AutoDock et GOLD, reposent sur une fonction objective basée sur un champ de force combiné avec un algorithme évolutionnaire (génétique). Dans notre étude, nous choisirons un programme d'amarrage moléculaire, AutoDock4.2, qui utilise un algorithme génétique (GA).

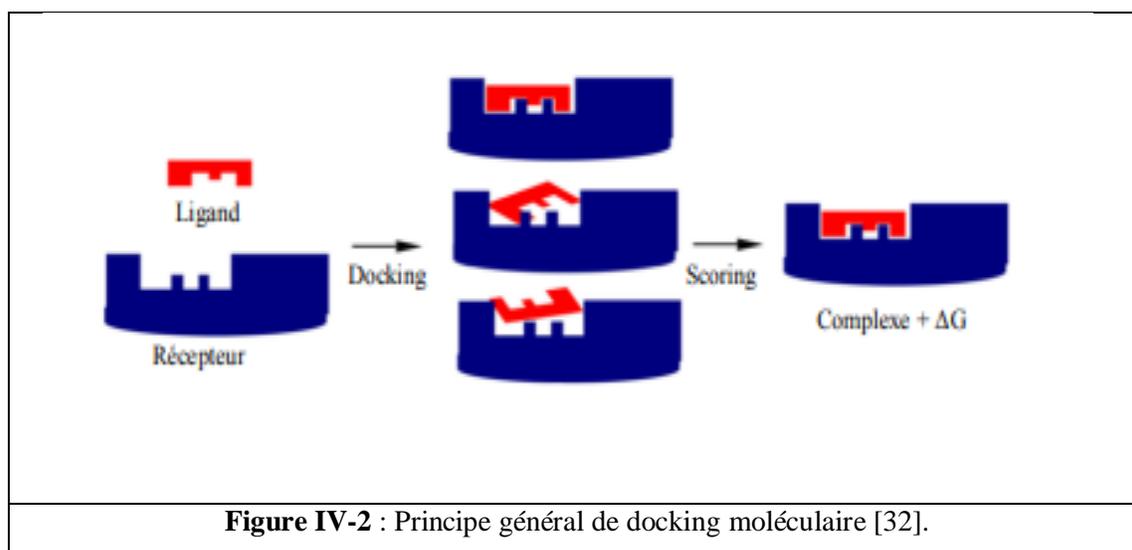
### IV.3. Principe de docking moléculaire

Le docking moléculaire a pour but de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules, en cherchant des orientations et des conformations favorables pour une meilleure fixation d'un ligand à un récepteur.

La simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring (figure IV-2) :

La 1<sup>ère</sup> étape : **Le docking** est 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 celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.

La 2<sup>ème</sup> étape : **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 [30,31].



### IV.4. Les outils de docking moléculaire

#### Récepteur :

Cette étape préliminaire du docking moléculaire est consistée au téléchargement des structures chimiques (enzyme dans notre cas). Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la PDB (Protéine Data Bank, en anglais) (site web: <http://www.rcsb.org/pdb/>) [33]. La PDB est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X [34].

#### Ligands :

Les structures de nos ligands ont été téléchargées depuis le site web PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) et enregistrées dans format SDF. Les fichiers ont été convertis du format SDF au format PDB à l'aide du programme ChemDraw Office [35].

### IV.5. Les Algorithmes Génétiques (AG)

Les algorithmes génétiques (AG) reprennent des mécanismes et la terminologie de la génétique naturelle et de l'évolution biologique. L'organisation d'un ligand en complexe avec un récepteur peut être définie par un jeu de paramètres décrivant la position, l'orientation et la conformation du ligand par rapport au récepteur. Ces paramètres sont les « variables d'état » et dans un AG, chaque variable d'état correspond à un gène. La valeur de ces variables correspond au génotype et les coordonnées atomiques associées correspondent au phénotype. Chaque état défini du ligand correspond à un individu [36].

Pour l'implémentation de l'AG dans AutoDock, le chromosome est composé d'une chaîne de valeur-gènes réelle qui décrit :

- ✓ **L'emplacement ligand** : trois coordonnées.
- ✓ **L'orientation** : trois coordonnées pour définir l'axe principal de la rotation, et une valeur pour l'angle de rotation du ligand autour de l'axe principal. Ces 4 coordonnées constituent le « quatérion » d'orientation.
- ✓ **La conformation** : une valeur pour chaque torsion.

## IV.6. Fonctions de scores

La procédure de docking permet de générer une liste de complexes représentant les modes d'association favorables entre le ligand et le récepteur. Les méthodes de "scoring" permettent, par la suite, d'évaluer l'énergie de liaison du complexe formé et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking, afin de trouver celui ou ceux les plus susceptibles de reproduire un mode d'association réel. L'association non covalente et réversible d'un récepteur (R) et d'un ligand (L) pour former un complexe récepteur-ligand (RL), dans un milieu aqueux contenant des électrolytes peut être décrite par l'équation 1 [54].



À l'équilibre, cette réaction est déterminée par l'énergie libre de liaison  $\Delta G$ . Cette quantité est liée (équation 2) aux constantes d'association (inhibition)  $K_i$ , qui peuvent être déterminées expérimentalement (Équation3) [55].

$$\Delta G = -RT \ln K_i \dots\dots\dots (2)$$

$$K_i = \frac{[RL]}{[R][L]} \dots\dots\dots (3)$$

Le principe thermodynamique est le suivant :  $\Delta G = \Delta G_{\text{Complexe}} - (\Delta G_{\text{Ligand}} + \Delta G_{\text{protéine}})$

L'association entre protéines et ligands est gouvernée par plusieurs paramètres thermodynamiques (voire le chapitre III) [37] :

- ✓ Les interactions hydrophobes.
- ✓ Les interactions électrostatiques.
- ✓ Les liaisons hydrogène.
- ✓ Les interactions de Van Der Waals.
- ✓ Les interactions entre systèmes  $\pi$ .

**Références de la partie  
bibliographique**

## Références

- [1] Bruneton, Jean. Pharmacognosie : phytochimie plantes médicinales. No. 581.634 B7. 1993.
- [2] Ross, Julie A., and Christine M. Kasum. "Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety." *Annual review of Nutrition* 22.1 (2002): 19-34.
- [3] Burta, O., et al. "Phytotherapy in cardiovascular diseases: from ethnomedicine to evidence based medicine." *Journal of Biological Sciences* 8.2 (2008): 242-247.
- [4] Emerenciano, Vicente P., et al. "Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18 (2007): 891-899.
- [5] Pietta, Pier-Giorgio. "Flavonoids as antioxidants." *Journal of natural products* 63.7 (2000): 1035-1042.
- [6] Narayana, K. Raj, et al. "Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential." *Indian journal of pharmacology* 33.1 (2001): 2-16.
- [7] Rabidas, Shyam Sunder, et al. "A Comprehensive Review on Anti-Inflammatory Response of Flavonoids in Experimentally-Induced Epileptic Seizures." *Brain Sciences* 13.1 (2023): 102.
- [8] <http://dspace.univmsila.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/24460/memoire%20flavonoide%20correg%C3%A9.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [9] Rabidas, Shyam Sunder, et al. "A Comprehensive Review on Anti-Inflammatory Response of Flavonoids in Experimentally-Induced Epileptic Seizures." *Brain Sciences* 13.1 (2023): 102.
- [10] Ghedira, Kamel. "Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique." *Phytothérapie* 3.4 (2005): 162-169.
- [11] Formica, J. V., and W. Regelson. "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids." *Food and chemical toxicology* 33.12 (1995): 1061-1080.
- [12] Di Carlo, Giulia, et al. "Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs." *Life sciences* 65.4 (1999): 337-353.
- [13] Cowan, Marjorie Murphy. "Plant products as antimicrobial agents." *Clinical microbiology reviews* 12.4 (1999): 564-582.
- [14] <https://theses.hal.science/tel-01207424/document>
- [15] Lindskog, Sven. "Structure and mechanism of carbonic anhydrase." *Pharmacology & therapeutics* 74.1 (1997): 1-20.

- [16] BOUZIT, Habiba. Synthèse, Structure, et Réactivité d'une série de sulfonamides couplés à l'acide lipoïque et étude de leurs complexes d'inclusion avec la  $\beta$ -cyclodextrine. Diss. 2017.
- [17] Durdagi, Serdar, et al. "Kinetic and docking studies of phenol-based inhibitors of carbonic anhydrase isoforms I, II, IX and XII evidence a new binding mode within the enzyme active site." *Bioorganic & medicinal chemistry* 19.4 (2011): 1381-1389.
- [18] Supuran, Claudiu T. "Carbonic anhydrases-an overview." *Current pharmaceutical design* 14.7 (2008): 603-614.
- [19] Hajduk, Philip J., Warren RJD Galloway, and David R. Spring. "A question of library design." *Nature* 470.7332 (2011): 42-43.
- [20]:<https://www.kartable.fr/ressources/physique-chimie/cours/les-interactions-fondamentales-1/54471>
- [21] Salahi, Dehbia. Modélisation de la structure d'une protéine impliquée dans le cancer et de ses interactions avec quelques ligands. Diss. UMMTO, 2016.
- [22] <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-du-vivant/les-forces-de-vander-waals-et-le-gecko>
- [23] Borsi, Valentina, et al. "Entropic contribution to the linking coefficient in fragment based drug design: a case study." *Journal of medicinal chemistry* 53.10 (2010): 4285-4289.
- [24] Brooijmans, Natasja, and Irwin D. Kuntz. "Molecular recognition and docking algorithms." *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 32.1 (2003): 335-373.
- [25] Heberlé, G., and W. F de Azevedo. "Bio-inspired algorithms applied to molecular docking simulations." *Current medicinal chemistry* 18.9 (2011): 1339-1352.
- [26] Duhovny, Dina, Ruth Nussinov, and Haim J. Wolfson. "Efficient unbound docking of rigid molecules." *Algorithms in Bioinformatics: Second International Workshop, WABI 2002 Rome, Italy, September 17–21, 2002 Proceedings 2*. Springer Berlin Heidelberg, 2002.
- [27] Morris, Garrett M., and Marguerita Lim-Wilby. "Molecular docking." *Molecular modeling of proteins* (2008): 365-382.
- [28] Sousa, Sergio Filipe, Pedro Alexandrino Fernandes, and Maria Joao Ramos. "Protein–ligand docking: current status and future challenges." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65.1 (2006): 15-26.

- [29] Sousa, Sergio Filipe, Pedro Alexandrino Fernandes, and Maria Joao Ramos. "Protein–ligand docking: current status and future challenges." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65.1 (2006): 15-26.
- [30] Warren, Gregory L., et al. "A critical assessment of docking programs and scoring functions." *Journal of medicinal chemistry* 49.20 (2006): 5912-5931.
- [31] Halperin, Inbal, et al. "Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 47.4 (2002): 409-443.
- [32] Beautrait, Alexandre. Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du domaine FAT de la kinase d'adhérence focale FAK. Diss. Université Henri Poincaré-Nancy I, 2008.
- [33] Eddine, BOUTRIF Chams, and Pr BENSEGUENI Abderrahmane. "Nd'ordre: Nde série: En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Option: Biochimie Moléculaire et Santé."
- [34] Sekiou, Omar, et al. "In-silico identification of potent inhibitors of COVID-19 main protease (Mpro) from natural products." (2020).
- [35] Sekiou, Omar, et al. "In-silico identification of potent inhibitors of COVID-19 main protease (Mpro) from natural products." (2020).
- [36] Fortuné, Antoine. Techniques de Modélisation Moléculaire appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance. Diss. Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2006.
- [37] ZERDAOUI, Sara, and Sara BOUNASLA. Docking moléculaire de deux flavones naturels contre l'acétylcholinestérase et le butylcholinestérase. Diss. UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF-M'SILA, 2020.

**PARTIE**  
**COMPUTATIONNELLE**

# **Chapitre V :**

## **Méthodes et matériels**

## V. Méthodes et matériels

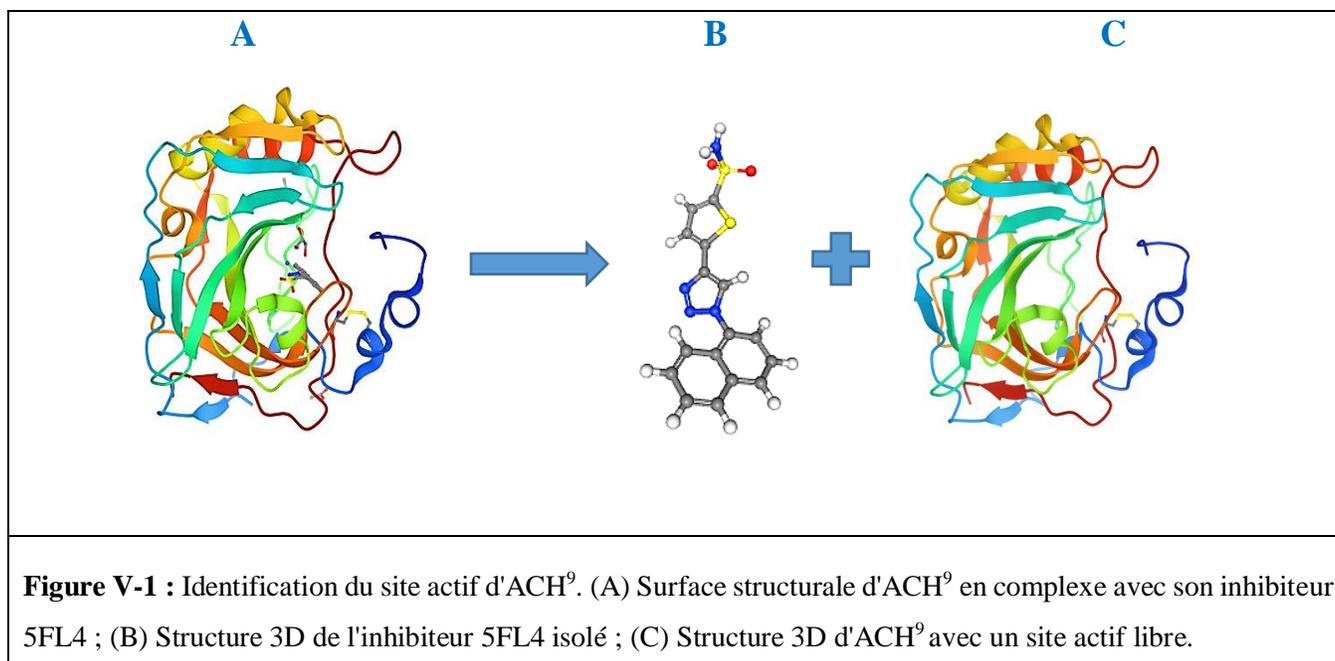
### V.1. Programmes utilisés

Pour étudier les interactions Ligands-Protéase, nous choisirons le programme Autodock4.2 dans sa version récente [1]. L'Autodock est un programme de simulation conçu pour prédire les interactions mises en jeu entre un ligand et son récepteur. Nous avons également utilisé l'interface graphique « ADT » (AutoDock Tools) version 1.5.4 pour visualiser la localisation précise de l'espace à l'intérieur duquel va se faire les calculs [2]. Le programme ChemDraw Professional a été utilisé pour dessiner et minimiser l'énergie des molécules avant les procédures de docking moléculaire. Les résultats des calculs d'amarrage ont été traités par le code de visualisation « Discovery Studio » [3].

### V.2. Préparation des molécules pour le docking

#### V.2.1. Le récepteur

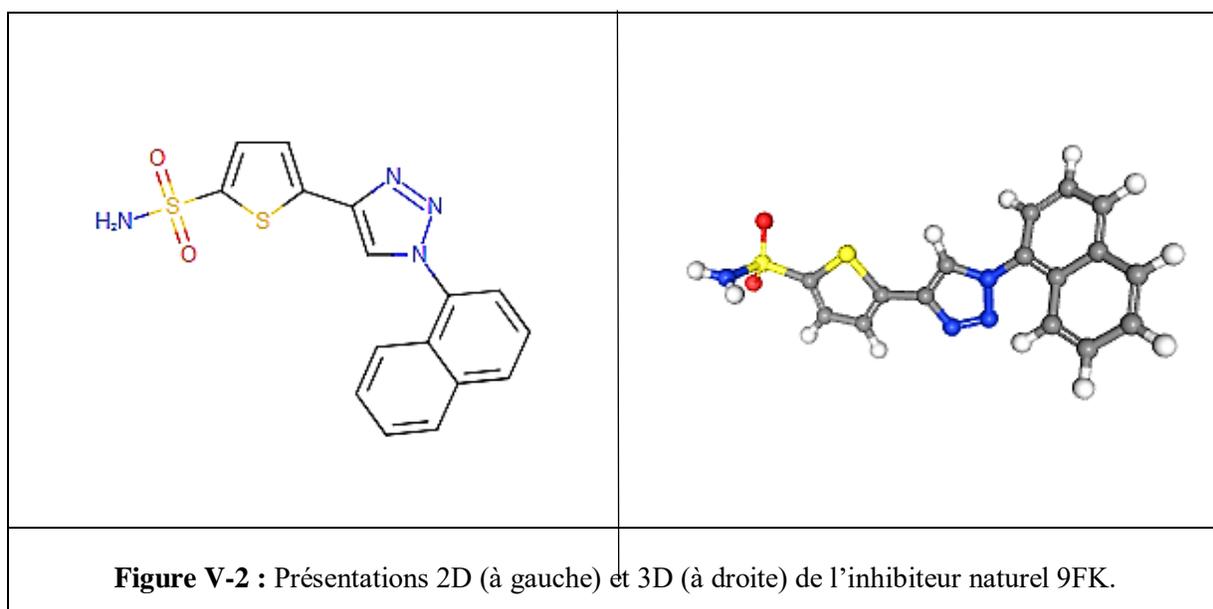
Avant l'utilisation par d'Autodock, le complexe 5FL4 (protéine-ligand : ACH<sup>9</sup>-9FK) est séparé de son ligand naturel (pdb id: 9FK) pour obtenir un récepteur (ACH<sup>9</sup>) avec un site actif libre (voir la figure V-1).



Le récepteur est ensuite préparé en définissant les charges partielles de ses atomes par l'intermédiaire du sous-programme Autodock-Tools qui attribue des charges du type "Kollman" calculées avec le champ de forces empirique Amber. Il est aussi nécessaire de rajouter à ce récepteur les hydrogènes dits polaires. Le fichier de récepteur préparé est converti par ADT au format pdbqt correspondant aux données des charges [4].

### V.2.2. Les ligands

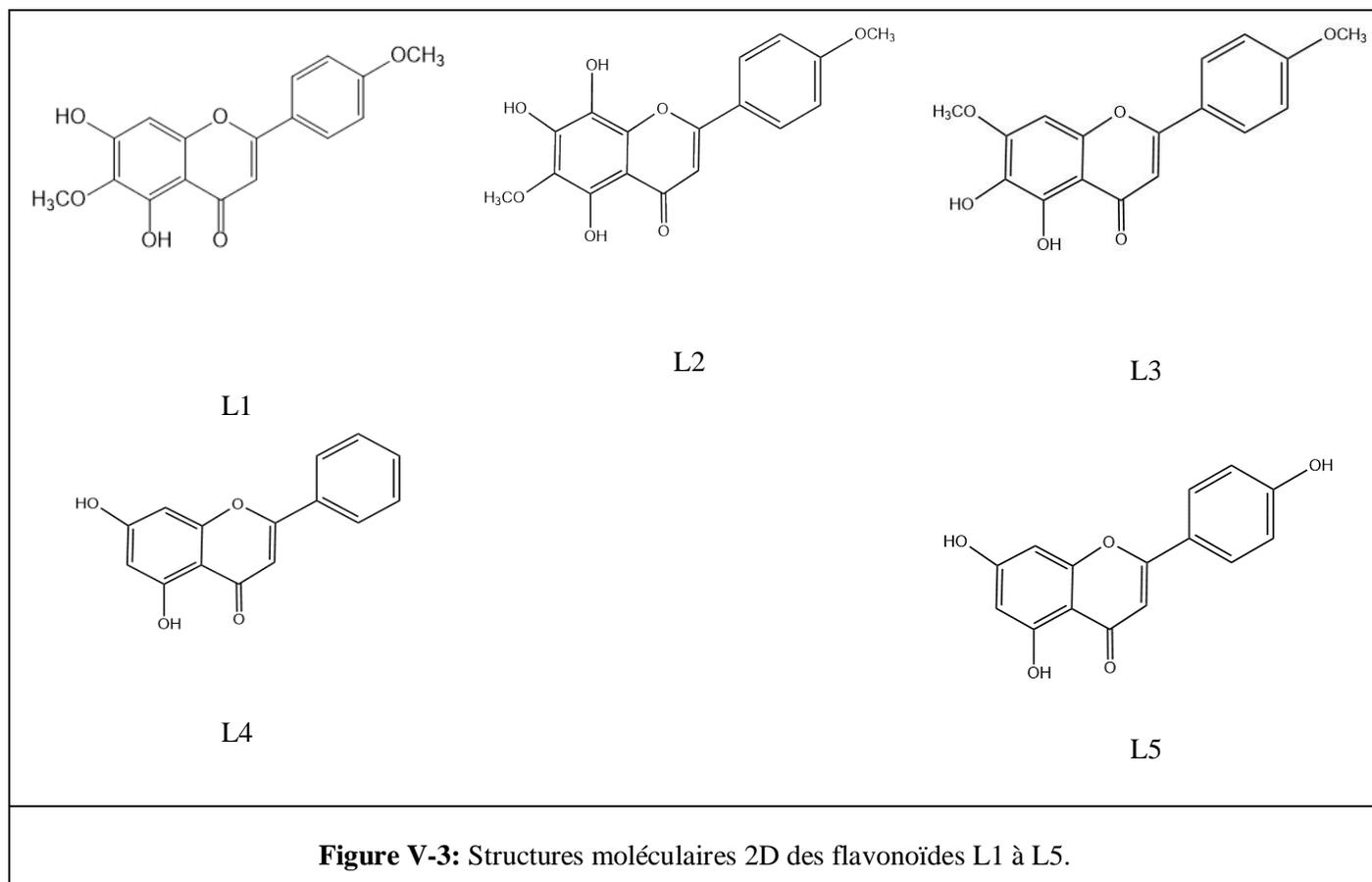
Le fichier d'entrée du ligand naturel (forme pdb id : 9FK) (voir la figure V-2) a été préparé de la même manière que nous l'avons fait avec son récepteur. Ce fichier est également converti par ADT en format pdbqt correspondant aux nouvelles données d'hydrogènes et de charges.



D'autre part, le matériel biologique qui est l'objet de notre étude est un ensemble de biomolécules en l'occurrence des flavonoïdes : pectolinarigenin (L1), pilosin (L2), ladanein (L3), chrysin (L4), and apigenin (L5). Ces composés phénoliques ont été isolés à partir d'extraits de propolis récoltés dans le nord de l'Algérie [5]. Les structures initiales de ces flavonoïdes, non disponible dans la base PDB, ont été dessinées et visualisées en 3D à l'aide du programme ChemDraw Professional.

Les géométries initiales des ligands utilisés dans ce travail sont optimisées avec la méthode de la Mécanique Moléculaire pour minimiser leurs énergies (figure V-3). Les molécules obtenues sont enregistrées au format pdb. La préparation des ligands est réalisée par le sous-programme

AutoTors4. Le rôle de ce programme est de contrôler les mouvements des ligands, en définissant les atomes aromatiques, les liaisons flexibles et les angles de torsion. Les molécules finales sont enregistrées dans le format pdbqt avant leur utilisation par AutoDock 4.2.



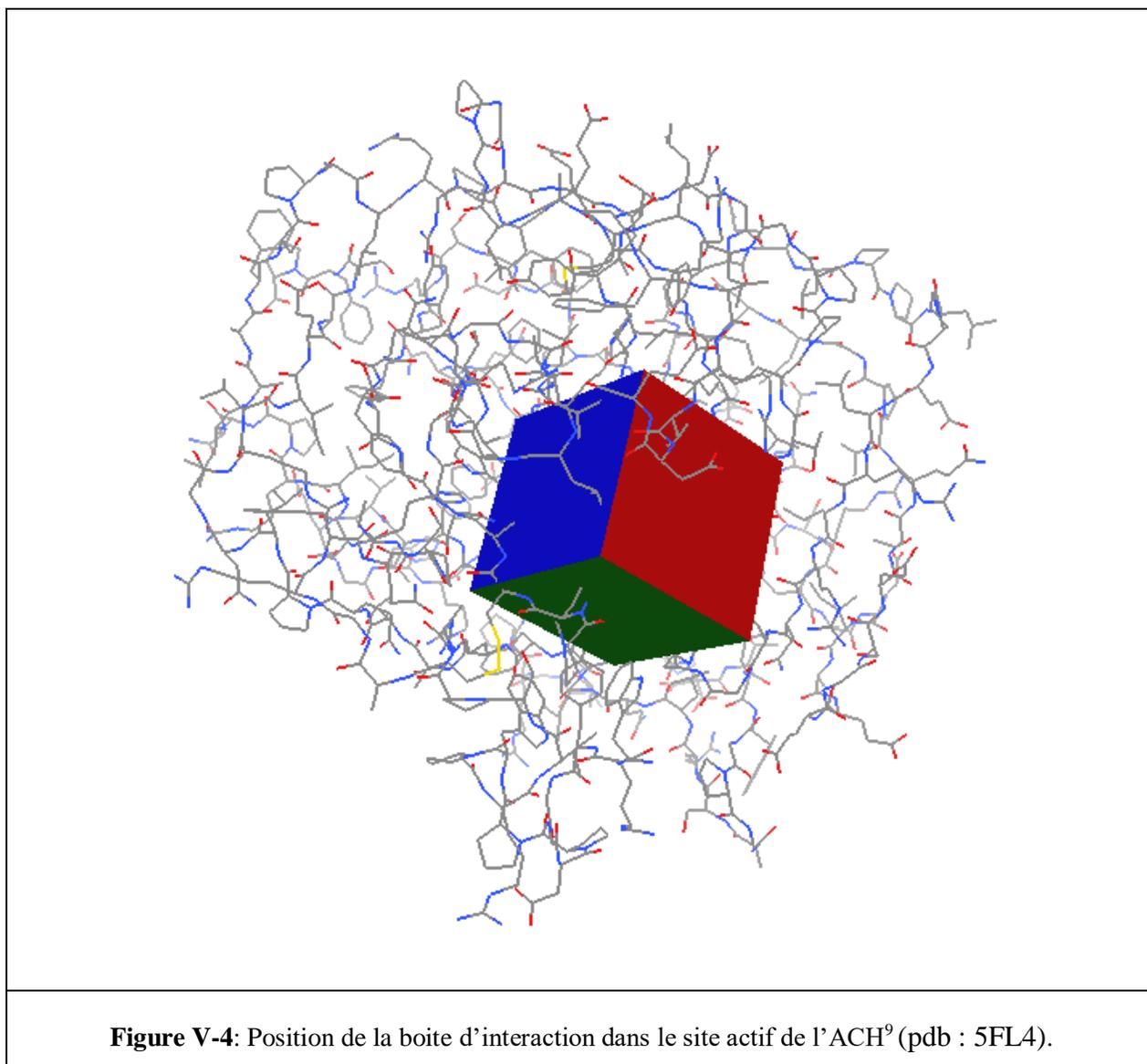
### V.3. Mis en œuvre de l'amarrage moléculaire

Les simulations d'amarrage moléculaire se composent essentiellement des étapes suivantes :

#### V.3.1. Calculs de la boîte d'interaction (calculs AutoGraid4)

Pour augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, le récepteur ACH<sup>9</sup> est plongé dans une boîte tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine étudiée (complexe 5FL4) et permettant la libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées X = 14.09 Å, Y = -27.413 Å et Z = 59.605 Å, avec les dimensions « 40\*40\*40

Å<sup>3</sup>». La boîte est centrée sur le ligand de référence avec des dimensions proportionnelles à la taille de tous les ligands flavonoïdes étudiés. (Voir la figure V-4).



Toutes ces instructions sont enregistrées dans un fichier texte de l'extension GPF (Grid Paramètres File). Ensuite, le programme AutoDock4 consiste à exécuter ces instructions (fichier GPF) grâce au sous-programme AutoGrid4. Il s'agit de calculer l'affinité entre les différents types d'atomes, de la protéine et l'inhibiteur, à l'intérieur de la boîte. Les résultats sont générés dans un autre fichier texte de l'extension GLG (Grid LoG file).

### V.3.2. Recherche des solutions (calculs AutoDock4)

Le sous-programme AutoDock4 a servi à exécuter l'étape de docking moléculaire. Il cherche les solutions d'amarrage selon les paramètres du fichier de commandes DPF (Docking Paramètres File). Dans notre recherche, nous utilisons l'algorithme AGL avec plusieurs cycles à exécuter est égal à 100, c'est-à-dire le nombre de solutions désirées.

Les résultats de docking sont générés dans un fichier texte avec une extension DLG (Docking LoG file). Ce fichier fournit les coordonnées atomiques de 100 meilleures positions d'un ligand dans le site actif de l'enzyme étudié, leurs énergies d'interaction  $\Delta G$ , leur constante d'inhibition ( $K_i$ ) et les différentes valeurs de l'écart quadratique moyen RMSD (Root Mean Square Deviation) entre le ligand de référence et celui re-arrimé.

**Chapitre VI :**  
**Résultats et discussions**

## VI. Résultats et discussions

### VI.1. Validation de la fiabilité du système de docking

La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugée par  $\Delta G$  et au RMSD de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB (pdb id : 9FK).

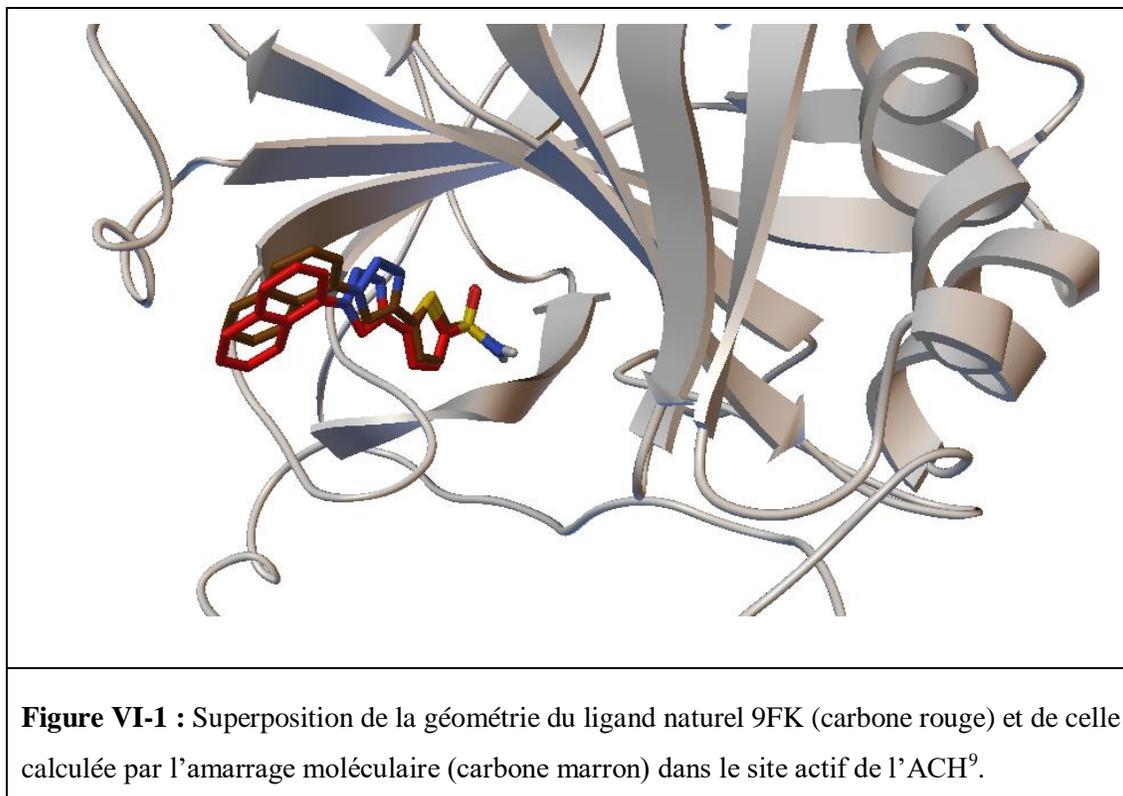
#### VI.1.1. Ecart quadratique moyen (RMSD)

L'essai de fiabilité du programme AutoDock4.2 a été réalisé avec le complexe co-cristallisé protéine–ligand, ACH<sup>9</sup>–9FK (pdb id : 5FL4), pris de manière arbitraire de la PDB.

Au cours du processus de docking moléculaire, 100 conformations ont été calculées. Nous avons sélectionné les conformations préférées en regardant les clusters avec  $\Delta G$  et  $K_i$  les plus faibles. Nous utilisons également une RMSD scalaire, qui représente la moyenne des différences dans les positions des atomes appartenant à deux conformations différentes. D'après le fichier DLG, la pose la plus favorable du ligand 9FK re-amarré est inférieure 2 Å en RMSD. Cette valeur indique que la petite molécule 9FK se lie dans la même zone qu'avant sans changer sa conformation pour s'adapter à la cavité [6].

#### VI.1.2. L'analyse visuelle

Comme le montre la figure VI-1, les résultats du RMSD sont fortement étayés par l'analyse visuelle qui montre une superposition idéale entre la conformation optimale du ligand calculée par AutoDock4.2 et la géométrie du même ligand 9FK donnée par la diffraction des rayons X.

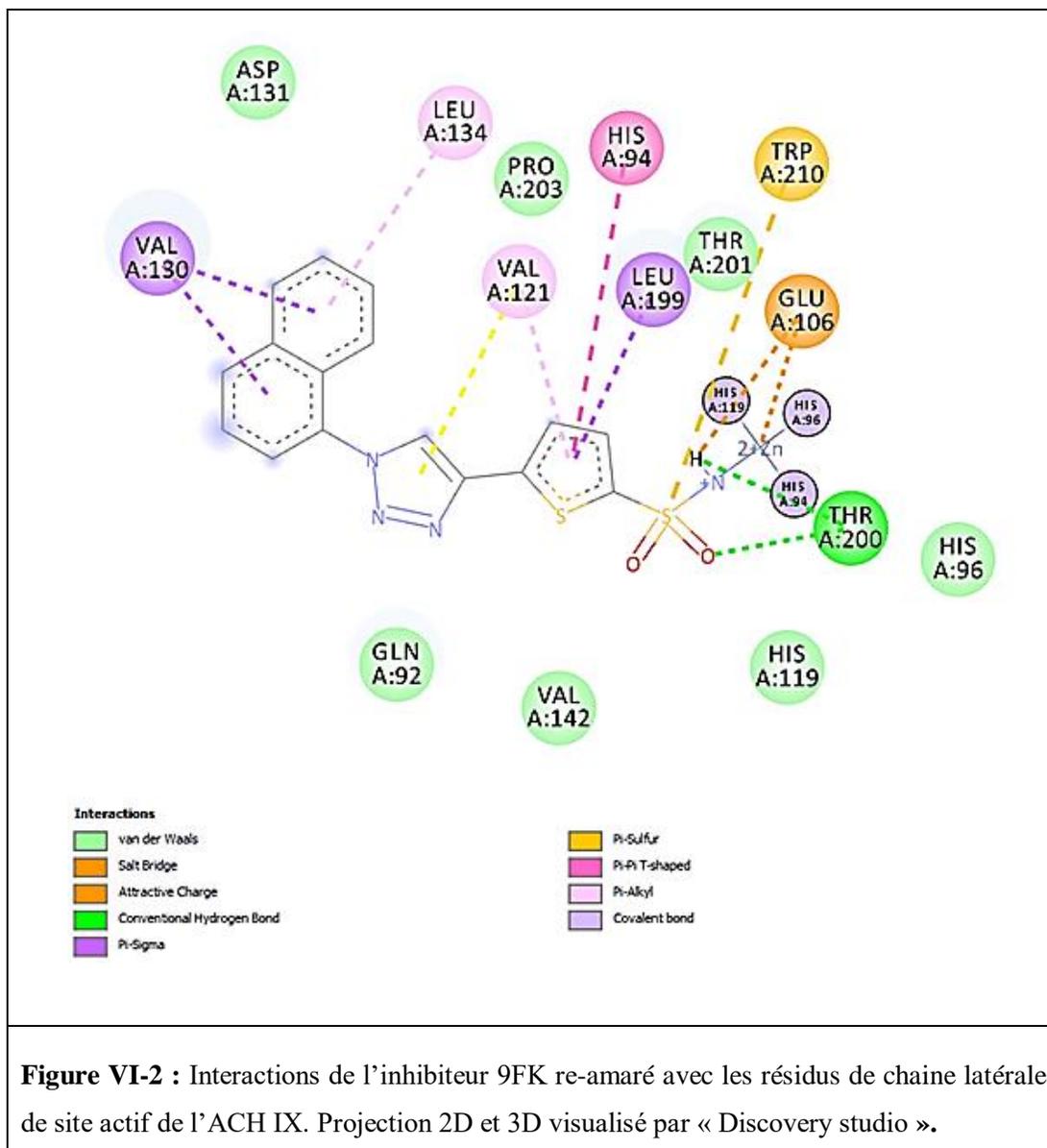


### V.1.3. Interactions entre le ligand naturel (9FK) et son récepteur (ACH<sup>9</sup>)

Pour comprendre comment nos dérivés de flavonoïdes interagissent avec le site actif de l'ACH<sup>9</sup>, il nous semble judicieux d'étudier d'abord le mécanisme d'interaction naturel mis en jeu entre l'inhibiteur original 9FK et le site actif de l'ACH<sup>9</sup>, en utilisant toujours le même complexe (pdb id : 5FL4). Les interactions protéine-inhibiteur ont été évaluées à l'aide du programme « AutoDock 4.2 » puis visualisées par le code « Discovery Studio ».

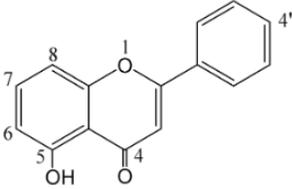
Le programme « Discovery Studio » peut détecter les différents contacts impliqués dans les interactions d'amarrage telles que les liaisons Van-der-Waals, hydrogène, électrostatiques, hydrophobes, etc.

D'après la figure VI-2, le groupement sulfonamide de l'inhibiteur ré-améré 9FK se lie à l'ion Zn<sup>2+</sup> de manière monodentée. Cette fonctionnalité (-SO<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) est connue pour sa capacité à se coordonner au niveau du site catalytique (ion Zn<sup>2+</sup>) via un hétéroatome (O, N ou S) en remplaçant la molécule d'eau attachée au zinc.



L'analyse visuelle a indiqué que l'inhibiteur 9FK forme deux liaisons hydrogène avec les résidus de chaîne latérale THR<sup>200</sup> (Thr<sup>200</sup> : NH<sub>2</sub> ••• O, d = 1.942 Å ; Thr<sup>200</sup> : O ••• NH, d = 1.877 Å) (voir le tableau VI-1).

**Tableau VI-1** : Les résultats de docking moléculaire entre l'ACH<sup>9</sup> et les flavonoïdes. (D) donneur, (A) accepteur. Les distances entre les atomes intervenant en interactions sont en Å.

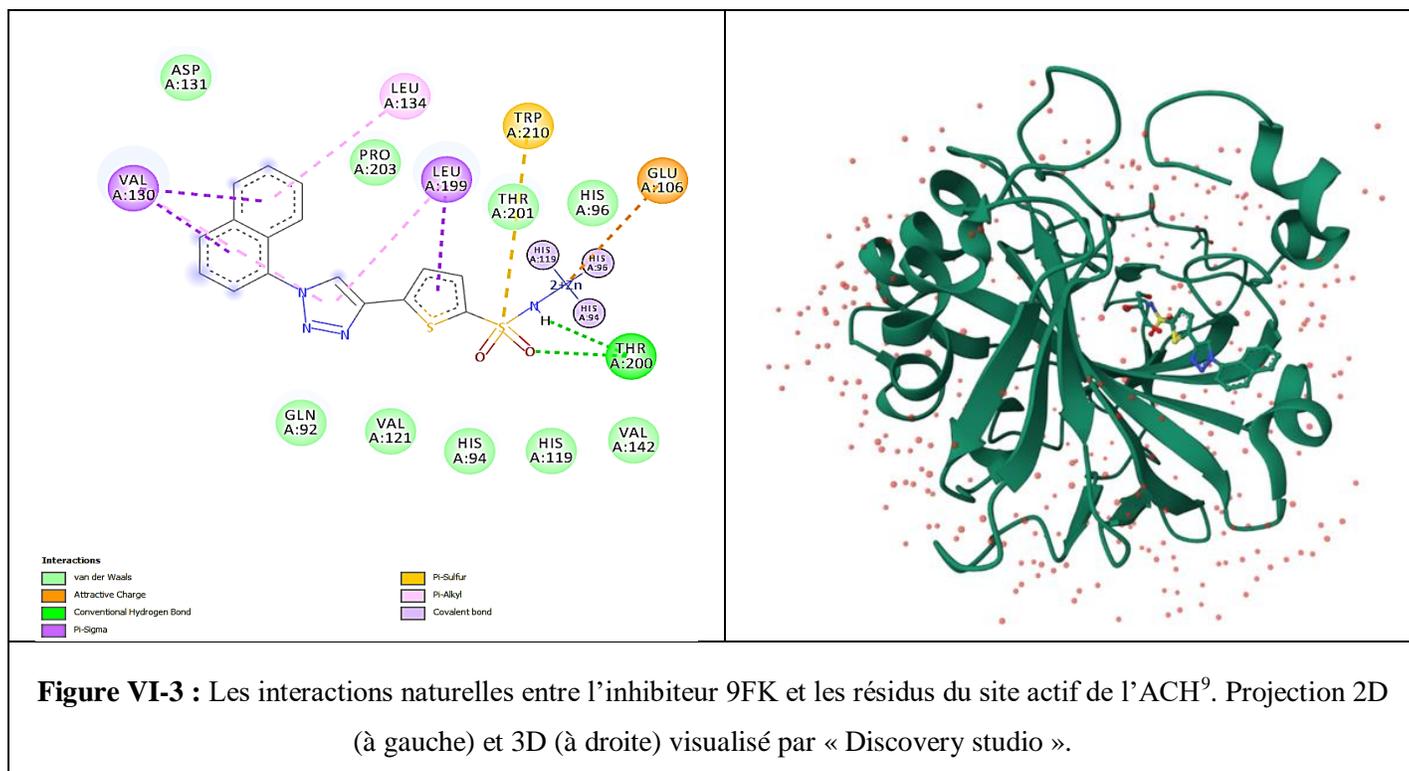
	<b>Liaison Zn-Ligand (Distances)</b>	<b>Liaisons hydrogènes</b>		
		<b>Résidus</b>	<b>Ligands</b>	<b>Distances</b>
<b>9FK*</b>	2.0485 (N)	Thr <sup>200</sup> : NH <sub>2</sub> (D)	=O (A)	1.942
		Thr <sup>200</sup> : =O (A)	NH (D)	1.877
<b>L1</b>	1.704 (O <sub>7</sub> )	Glu <sup>106</sup> : O (A)	7-OH (D)	2.820
		Thr <sup>200</sup> : O (A)	7-OH (D)	1.704
<b>L2</b>	-	Gln <sup>92</sup> : H (D)	4=O (A)	3.046
		Thr <sup>200</sup> : H (D)	8-OH (A)	2.708
		Thr <sup>200</sup> : O (A)	7-OH (D)	1.860
		Thr <sup>201</sup> : O (A)	8-OH (D)	1.850
<b>L3</b>	2.2673 (O <sub>5</sub> )	Thr <sup>200</sup> : NH (D)	5-OH (A)	2.377
		Thr <sup>200</sup> : O (A)	6-OH (D)	2.183
		Thr <sup>201</sup> : H (D)	4=O (A)	2.206
		Thr <sup>201</sup> : O (A)	5-OH (D)	1.801
<b>L4</b>	-	His <sup>68</sup> : H (D)	7-OH (A)	1.862
		Pro <sup>202</sup> : O (A)	5-OH (D)	1.983
<b>L5</b>	-	Trp <sup>9</sup> : H (D)	7-OH (A)	1.848
		Gln <sup>71</sup> : H (D)	4=O (A)	1.704
		Thr <sup>200</sup> : O (A)	4'-OH (D)	1.927

\*Ligand naturel re-amarré

L'inhibiteur 9FK est également stabilisé par plusieurs interactions faibles (voir la figure VI-2), notamment :

- Des interactions hydrophobes ( $\pi-\pi$ ,  $\pi-\sigma$  et  $\pi$ -Alkyl) avec les résidus His<sup>94</sup>, Val<sup>130</sup>, Leu<sup>199</sup>, Val<sup>121</sup> et Leu<sup>134</sup>
- Une interaction  $\pi$ -sulfur entre l'atome de soufre et le résidu Trp<sup>210</sup>.
- Des interactions VDW avec les résidus His<sup>96</sup>, His<sup>119</sup>, Val<sup>142</sup>, Gln<sup>92</sup>, Pro<sup>203</sup>, Thr<sup>201</sup>, Asp<sup>131</sup>.

L'énergie de docking prédite par AutoDock était  $\Delta G = -7,71$  Kcal/mol pour la meilleure Conformation. Ce mode d'interaction est presque similaire à celui du complexe ACH<sup>9</sup>-9FK naturel (voir la figure VI-3). Nous en concluons que le programme Autodock4.2 peut reproduire correctement le mode de liaison naturel.



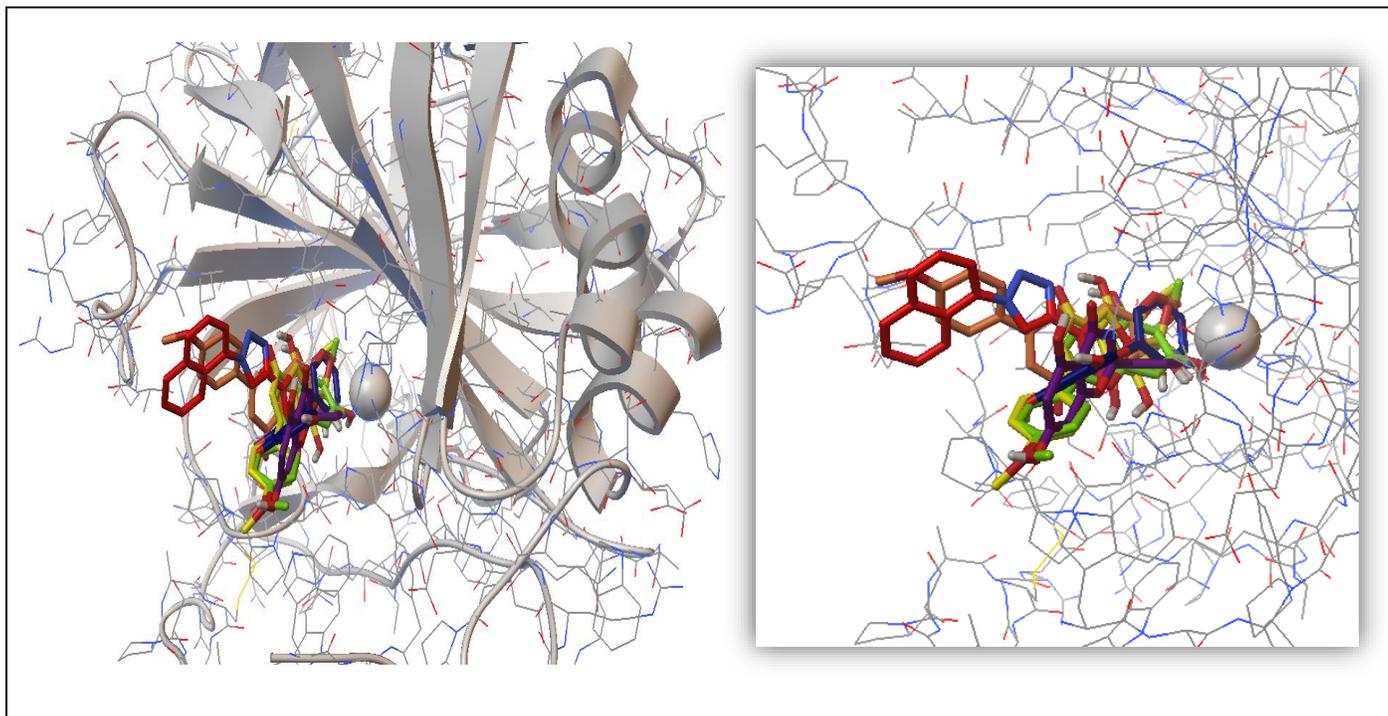
## VI.2. Docking des dérivés flavonoïdes

A la lumière des résultats obtenus avec le ligand 9FK naturel, nous pouvons conclure que le programme Autodock4.2 est performant et qu'on peut l'utiliser sans trop de risque d'erreurs pour générer (par docking moléculaire) d'autres inhibiteurs et de prédire leur mode d'interaction.

À cet effet, nous avons amarré nos molécules de flavonoïdes (L1 à L5) dans la même cavité occupée par le ligand naturel 9FK, en utilisant toujours la protéine ACH<sup>9</sup> (code pdb : 5FL4) avec les mêmes conditions de calcul.

### VI.2.1. Alignement des dérivés flavonoïdes

D'après les résultats obtenus par Autodock4.2, comme le montre la figure VI-4, les conformations optimales de tous les dérivés flavonoïdes sont bien placées dans le site actif de l'ACH<sup>9</sup>, où elles sont alignées avec l'inhibiteur naturel 9FK.

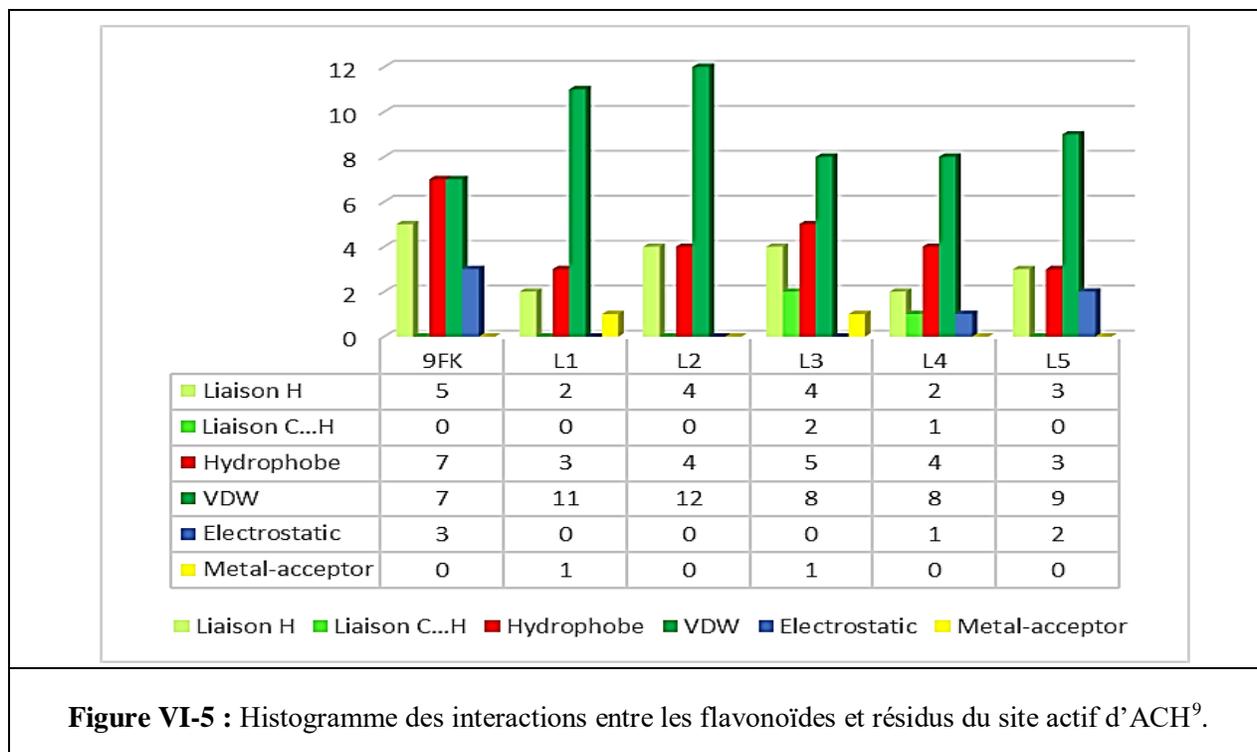


**Figure VI-4 :** Alignements des cinq flavonoïdes dans le site actif d'ACH<sup>9</sup>. Ligand naturel 9FK est coloré en rouge, L1 en vert, L2 en jaune, L3 en orange, L4 en bleu et L5 en violet.

### VI.2.2. Interprétation des histogrammes

L'histogramme de la figure VI-5 montre que les cinq composés flavonoïdes sont généralement impliqués dans plusieurs types d'interactions, avec les acides aminés du site actif d'ACH<sup>9</sup>, notamment : les interactions hydrogènes, van-der-waals, hydrophobes et électrostatiques.

Une interaction spécifique de type métal-accepteur a été observée dans les deux dérivés L1 et L3. Cette liaison est essentiellement formée entre une base de Lewis (donneur d'électrons : O ou N) et un acide de Lewis (accepteur d'électrons : Zn<sup>2+</sup>).

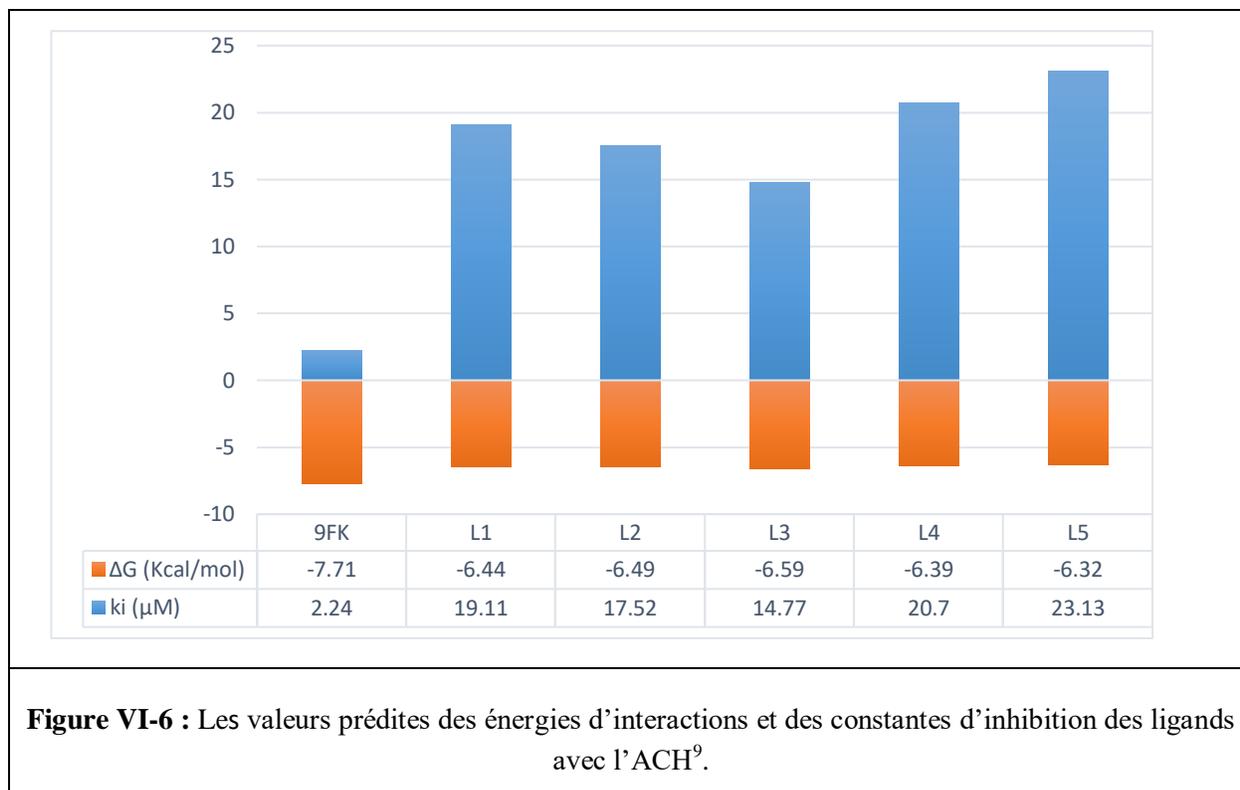


En raison de la rareté des données publiées à cet égard, nous avons semblé intéressés par la détermination théorique de certains paramètres décrivant l'activité inhibitrice, en particulier la constante d'inhibition ( $K_i$ ) et l'énergie d'interaction ( $\Delta G$ ).

Comme le montre l'histogramme de la figure VI-6, la prédiction de l'énergie d'interaction ( $\Delta G$ ) entre les ligands flavonoïdes et le site actif d'ACH<sup>9</sup> a donné des scores négatifs, variant entre -6,32 et -6,59 kcal/mol. Une valeur d'énergie négative signifie que le ligand s'est effectivement lié à la protéine [7]. Bien qu'une valeur positive indique que le complexe Ligand-Récepteur n'est pas formé, cela signifie que le système d'amarrage n'indique aucune interaction.

En général, les valeurs énergétiques sont proches de celle du ligand 9FK re-docké ( $\Delta G = -7,71$  Kcal/mol). Parmi les cinq flavonoïdes, nous avons trouvé que le ligand L3 avait une énergie de liaison inférieure de -6,59 kcal/mol mol, indiquant une affinité ligand-récepteur plus élevée [8].

La détermination théorique de la constante d'inhibition  $K_i$  a donné des valeurs dans la gamme micromolaire inférieure (entre 14,77 et 23,13  $\mu\text{M}$ ) (voir figure VI-6). Le ligand L3 présentait une faible valeur de  $K_i$  (14,77  $\mu\text{M}$ ), indiquant une activité inhibitrice relativement forte par rapport aux autres ligands ancrés.



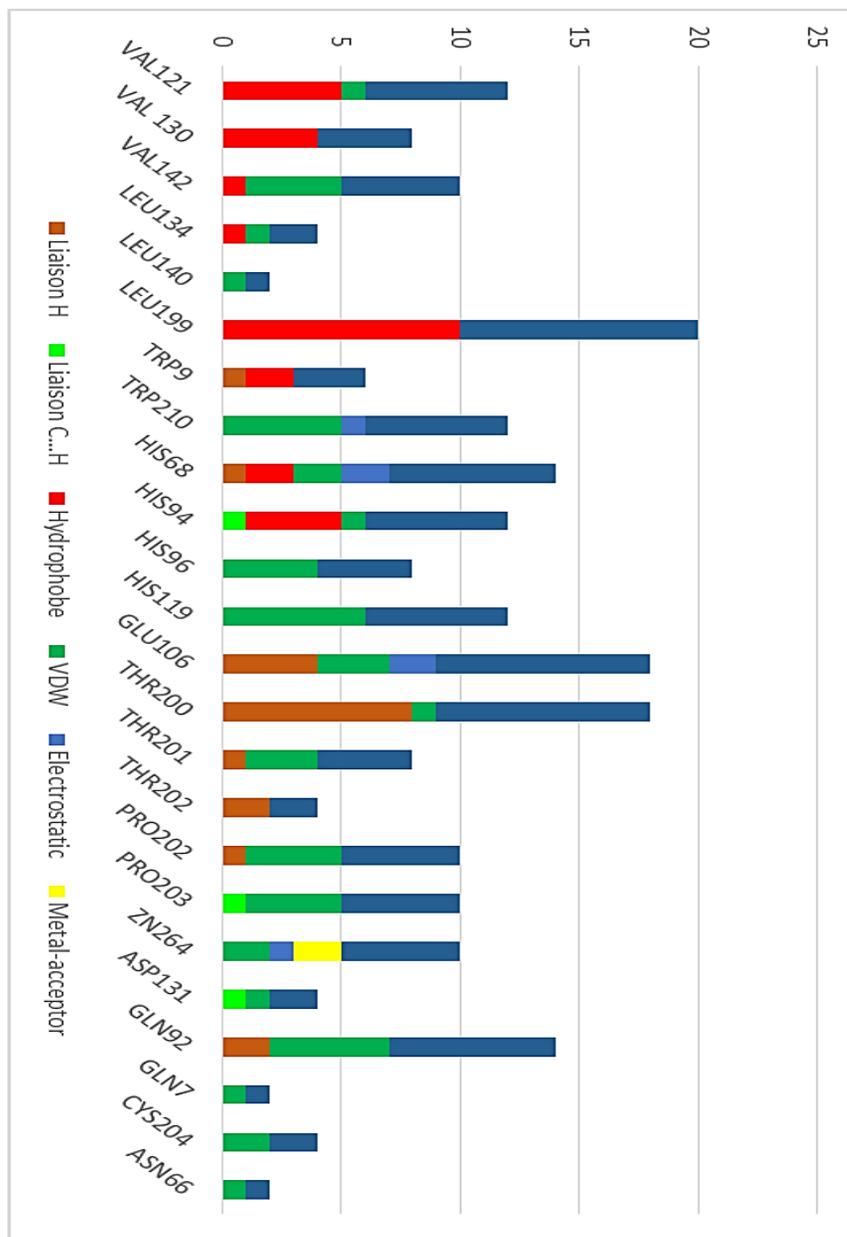
**Figure VI-6 :** Les valeurs prédites des énergies d'interactions et des constantes d'inhibition des ligands avec l'ACH<sup>9</sup>.

L'histogramme de la figure VI-7 montre que la plupart des acides aminés, situés autour de la poche catalytique de l'ACH<sup>9</sup>, sont intervenus dans des contacts « protéine-ligand » avec tous les dérivés de flavonoïdes amarrés, dont le ligand naturel 9FK ré-amarré.

Le mode de liaison obtenu par l'amarrage moléculaire pour tous les résidus du domaine actif a révélé plusieurs types d'interactions, telles que : hydrogènes, van-der-waals, hydrophobes, électrostatiques, etc. Parmi tous les acides aminés du site actif, cinq résidus « Leu<sup>199</sup>, Glu<sup>106</sup>, Thr<sup>200</sup>, Gln<sup>92</sup> et His<sup>68</sup> » ont le plus grand nombre d'interactions favorisées avec toutes les molécules amarrées (figure VI-7). Ces résidus sont essentiels pour identifier le site actif en raison de leur rôle central dans les données expérimentales (voir la figure VI-3).

Les liaisons hydrogène sont les plus importantes parmi les liaisons faibles, et elles ont un effet plus puissant sur la valeur de l'énergie de liaison [9]. Ils jouent également un rôle important dans la stabilité biologique des complexes protéine-ligand, en raison de leur forte influence sur la spécificité, l'adaptation et l'adsorption des inhibiteurs, ce qui ouvre la voie à la conception de nouveaux médicaments.





Nombre d'interactions

**Figure VI-7 : Résidus catalytiques impliqués dans des contacts Protéine-Ligands.**

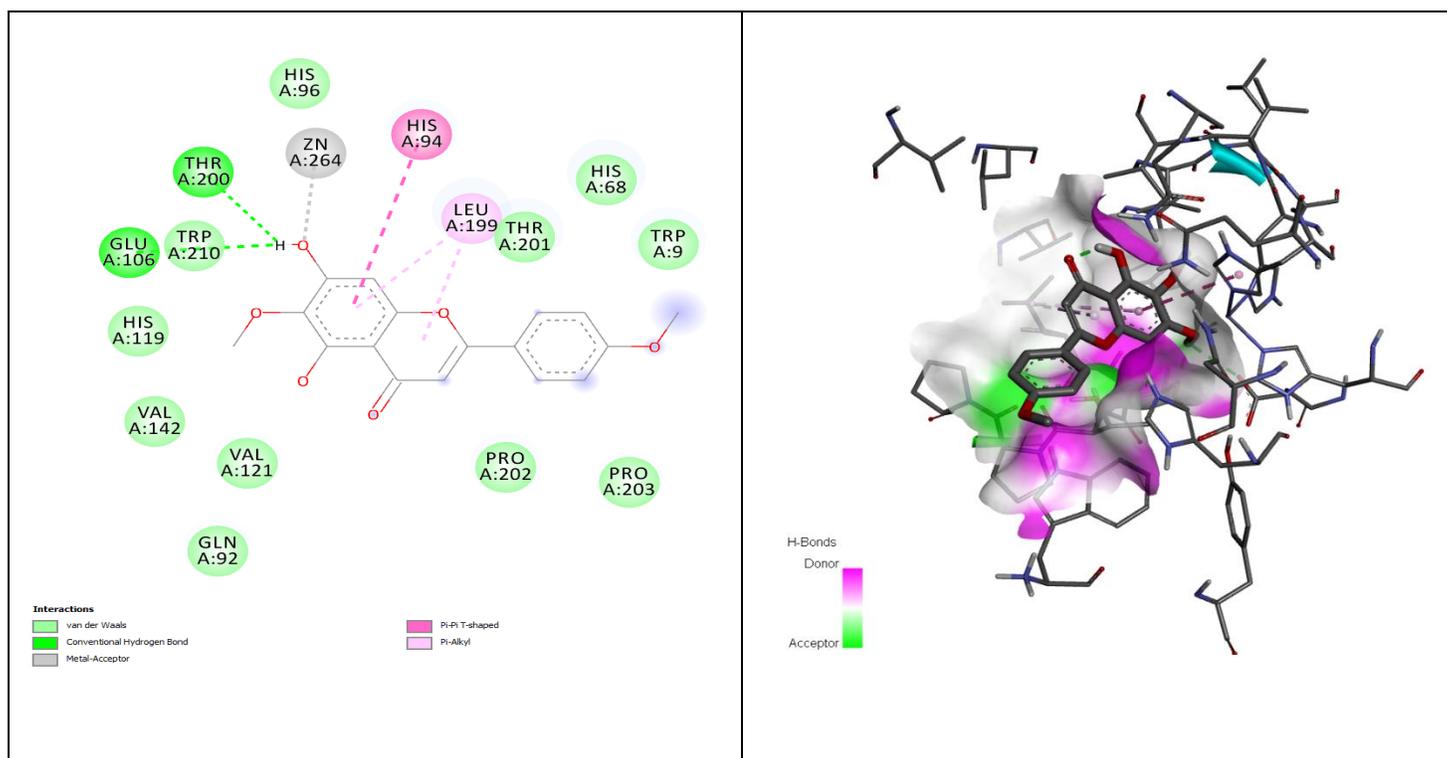
### VI.2.3. Interaction L1—ACH<sup>9</sup>

La figure VI-8 a montré que le complexe L1—ACH<sup>9</sup> est essentiellement stabilisé par deux liaisons hydrogène. Ces deux liaisons H ont été établies entre l'hydroxyle 7-OH et deux résidus Glu<sup>106</sup> et Thr<sup>200</sup> (Glu<sup>106</sup> -O ... 7-OH, d = 2,820 Å ; Thr<sup>200</sup> -O ... 7-OH, d = 1,704 Å).

L'hydroxyle 7-OH et l'ion zinc sont situés à une distance appropriée permettant de former une liaison de type métal-accepteur avec une distance d = 1,704 Å (voir tableau VI-1).

L'analyse visuelle montre également que le complexe L1—ACH<sup>9</sup> est stabilisé par de plusieurs interactions de type :

- $\pi$ - $\pi$  avec His<sup>94</sup> ;
- $\pi$ -Alkyl avec Leu<sup>199</sup> ;
- VDW avec His<sup>68</sup>, His<sup>96</sup>, His<sup>119</sup>, Val<sup>121</sup>, Val<sup>142</sup>, Gln<sup>92</sup>, Pro<sup>202</sup>, Pro<sup>203</sup>, Trp<sup>9</sup>, Trp<sup>210</sup> et Thr<sup>201</sup>.

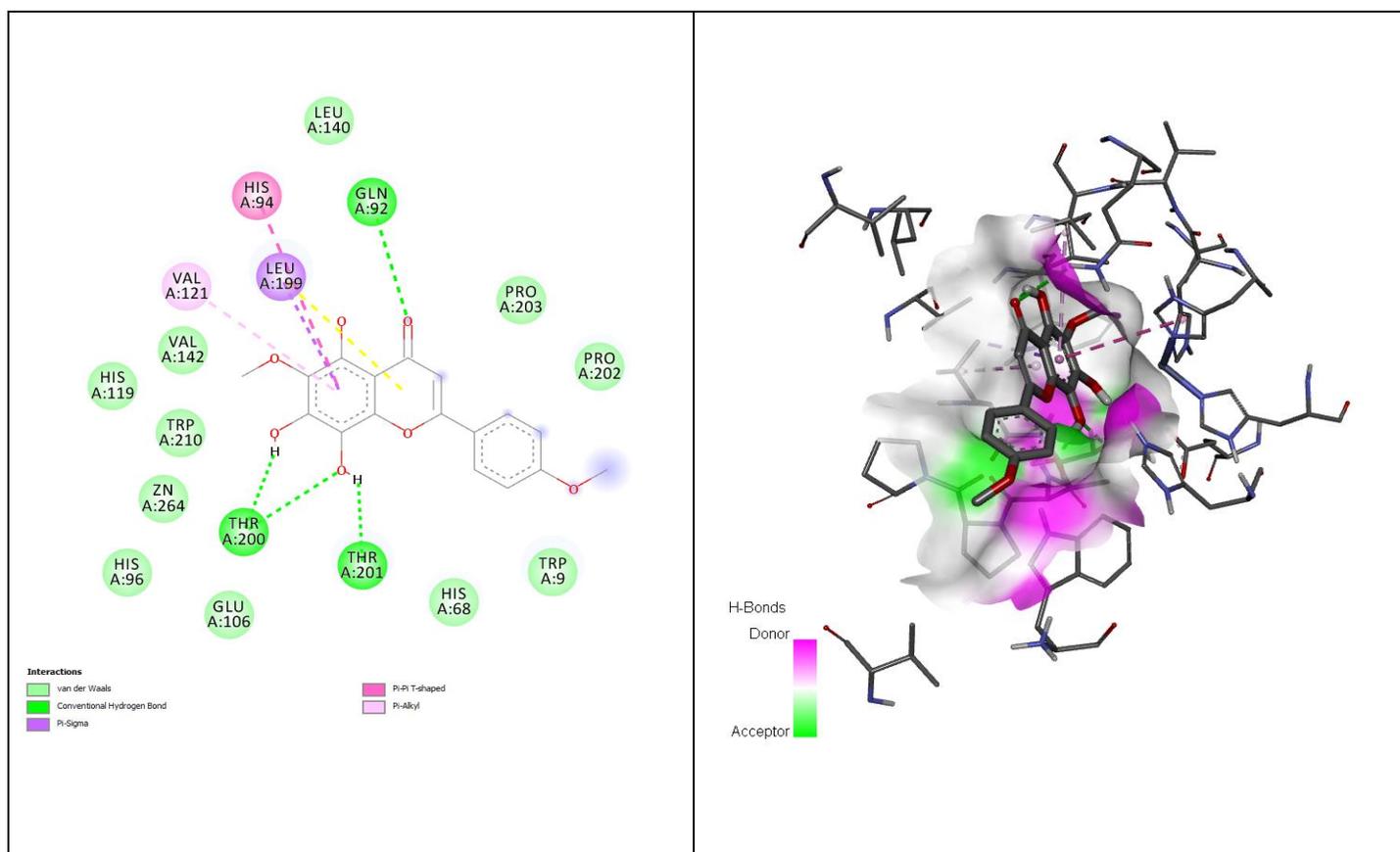


**Figure VI-8 :** L'interaction entre L1 et ACH<sup>9</sup>. Projection 2D (à gauche) et 3D (à droite) visualisés par Discovery studio.

#### VI.2.4. Interactions L2—ACH<sup>9</sup>

L'analyse visuelle montre que le ligand L2 est stabilisé par quatre liaisons hydrogène avec les résidus Thr<sup>200</sup>, Thr<sup>201</sup> et Gln<sup>92</sup>, et trois interactions hydrophobe (de type  $\pi$ - $\sigma$ ,  $\pi$ -alkyl et  $\pi$ - $\pi$  en forme T) avec les acides aminés Leu<sup>199</sup>, His<sup>94</sup>, Val<sup>121</sup> (voir la figure VI-9).

Ces liaisons reflète la forte affinité entre L2 et ACH<sup>9</sup> ( $\Delta G = -6,49$  kcal/mol ;  $K_i = 17,52$   $\mu$ M) par rapport aux autres dérivés qui ont établi un nombre inférieur d'interactions hydrogène (i.e. L1, L4 et L5).



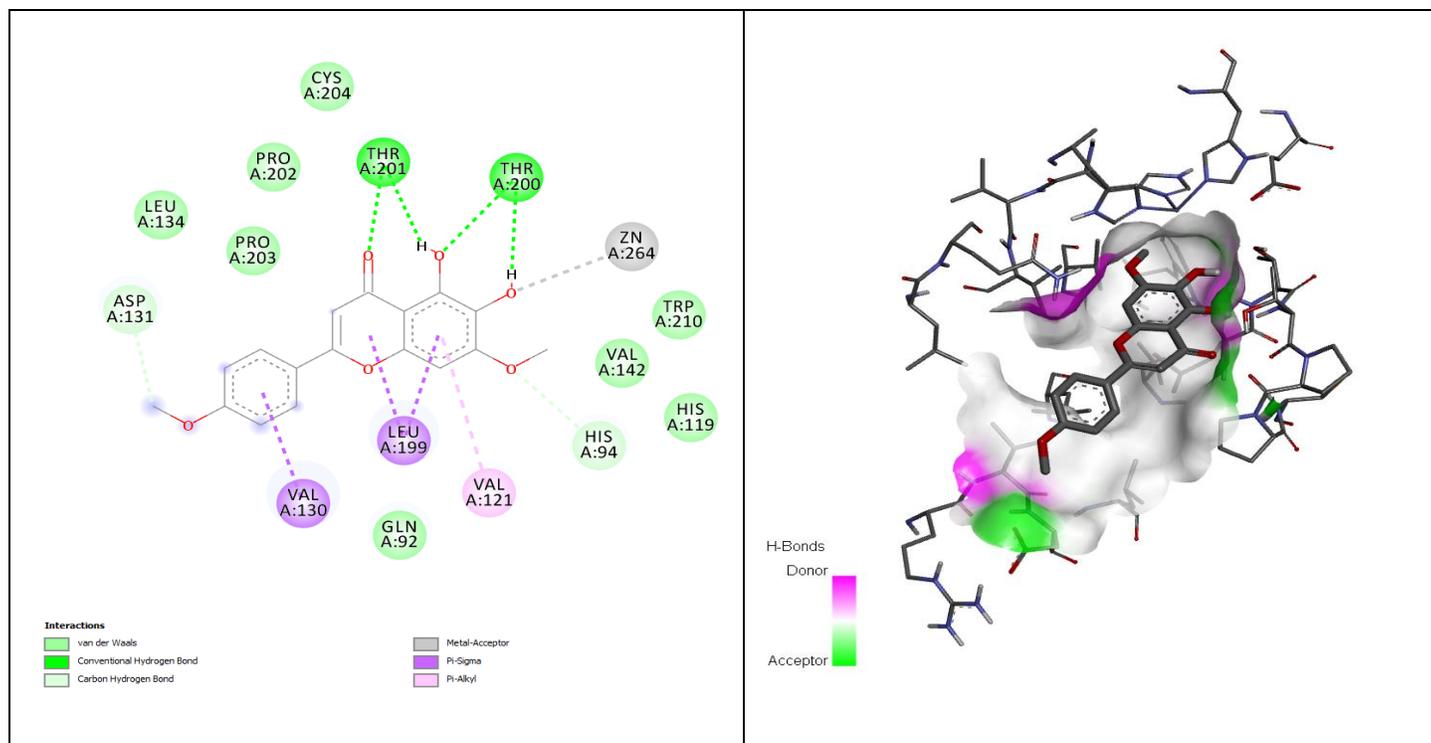
**Figure VI-9 :** L'interaction entre L2 et ACH<sup>9</sup>. Projections 2D et 3D visualisés par Discovery studio.

### VI.2.5. Interactions L3—ACH<sup>9</sup>

La visualisation des résultats du docking, mentionnée dans la figure VI-10, montre que le composé organique L3 forme un profil d'interaction similaire à celui du ligand L1.

Cependant, les interactions fournies dans la figure VI-10 révèlent que le ligand L3 a été stabilisé non seulement par quatre liaisons hydrogène avec les deux résidus Thr<sup>201</sup> et Thr<sup>200</sup> (5-O ••• NH :Thr<sup>200</sup> ; d = 2.377Å, 6-OH ••• O :Thr<sup>200</sup> ; d = 2.183Å, 4-O ••• NH :Thr<sup>201</sup>, d = 2.206Å ; 5-O ••• O :Thr<sup>201</sup>, d=1.801Å), mais aussi par une interaction de type métal-accepteur entre l'ion de Zn<sup>2+</sup> et l'atome d'oxygène du 6-OH (d= 3,2673 Å).

Ce réseau d'interaction intense fourni par la molécule L3 reflète les valeurs théoriques de  $\Delta G$  et  $k_i$  les plus petites, par rapport aux autres dérivés qui n'ont pas établi d'interactions avec le zinc ( $\Delta G = -6,59$  kcal/mol ;  $K_i = 14,77$   $\mu$ M).

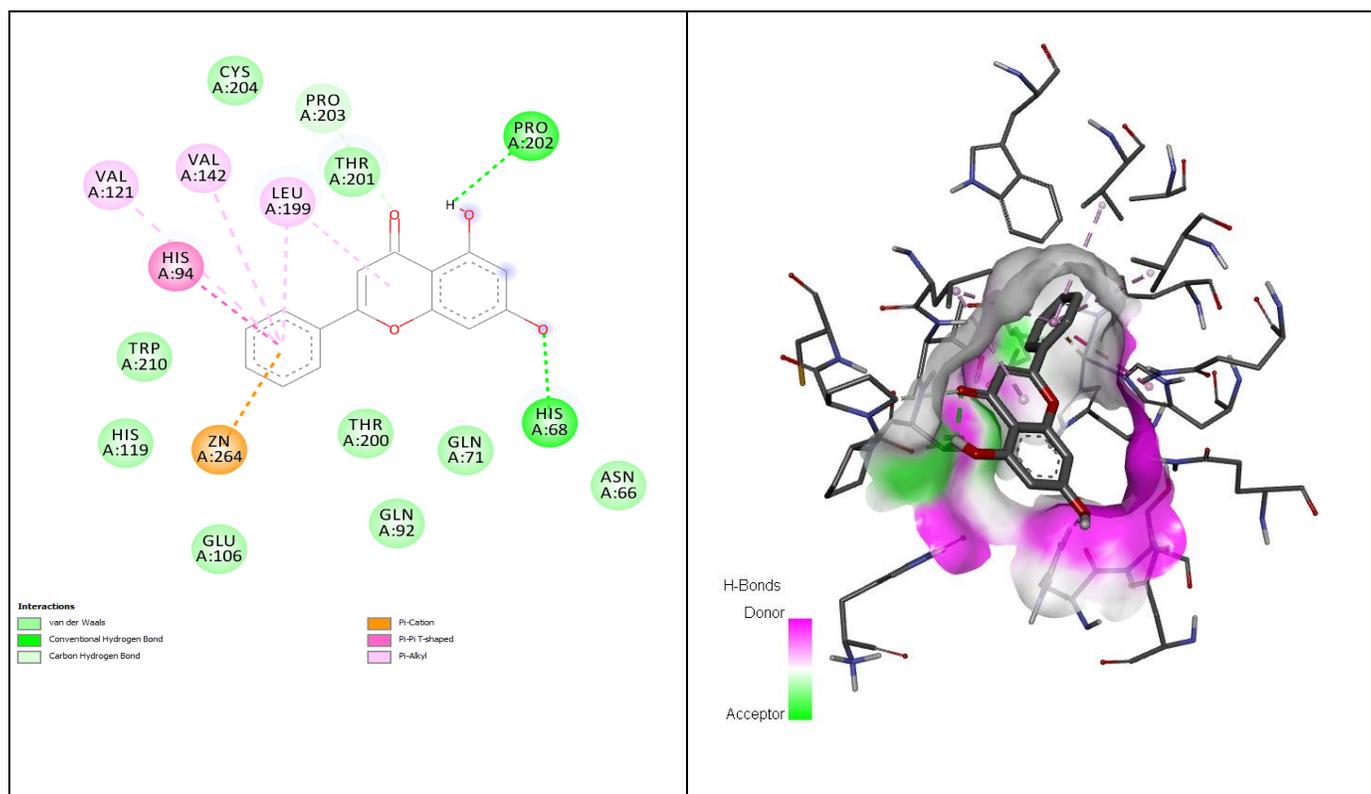


**Figure VI-10 :** L'interaction entre L3 et ACH<sup>9</sup>. Projections 2D et 3D visualisés par Discovery studio.

### VI.2.6. Interaction L4—ACH<sup>9</sup>

Les résultats de la figure VI-11 montrent que les résidus du site actif de la protéine ACH<sup>9</sup> qui ont formé des liaisons hydrogène avec le ligand L4 sont Pro<sup>202</sup> et His<sup>68</sup>, avec des distances de 1.983 Å et 1.862 Å, respectivement (voir le tableau VI-1).

On peut également observer cinq interactions hydrophobes avec les acides aminés Leu<sup>199</sup>, Val<sup>121</sup>, Val<sup>142</sup> ( $\pi$ -alkyl) et His<sup>94</sup> ( $\pi$ - $\pi$  en forme T), ainsi qu'une interaction électrostatique entre le Zinc et le cycle aromatique du ligand L4.

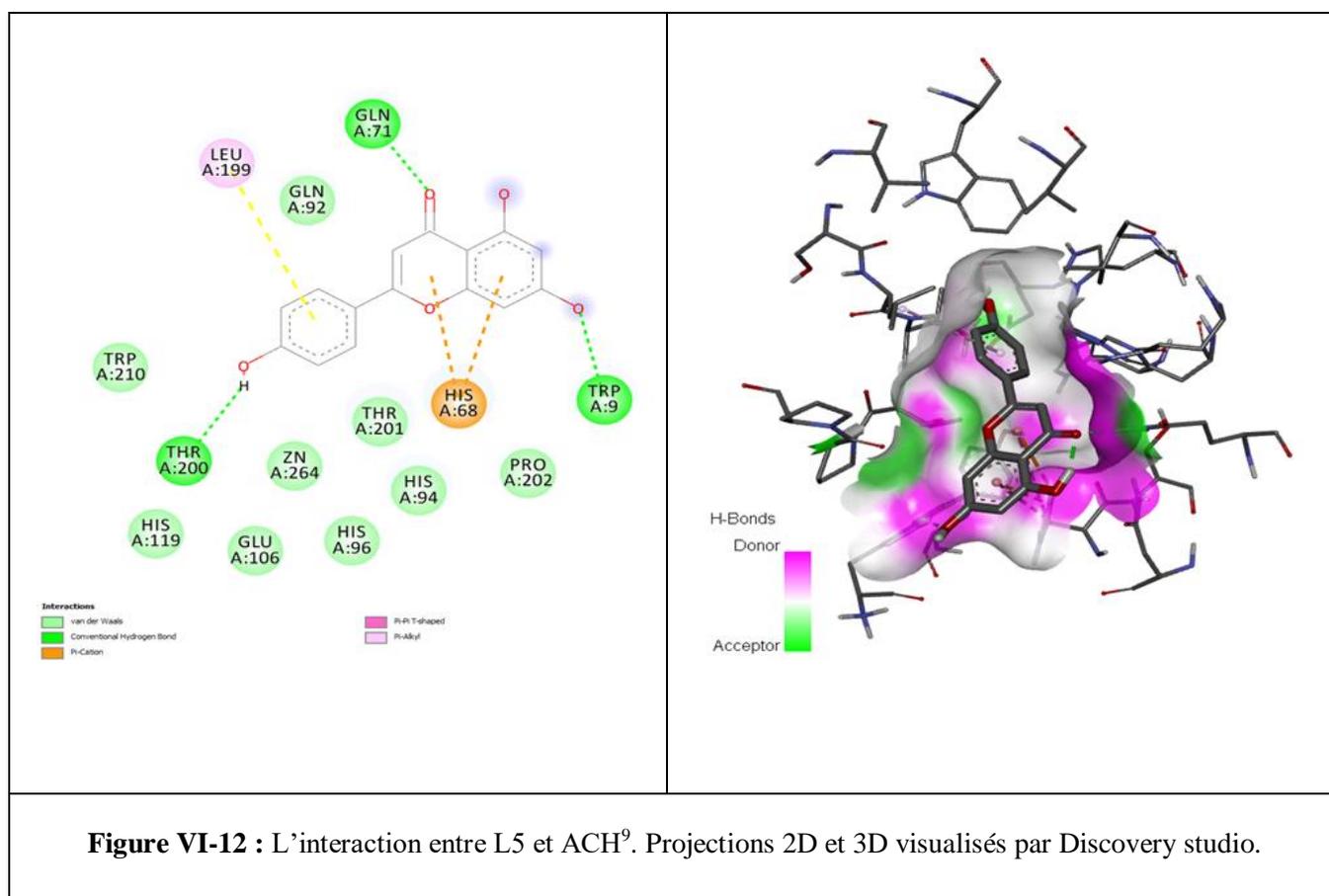


**Figure VI-11** : L'interaction entre L4 et ACH<sup>9</sup>. Projections 2D et 3D visualisés par Discovery studio.

VI.2.7. Interaction L5—ACH<sup>9</sup>

Le composé L5 est le dernier dérivé étudié dans cette classe d'inhibiteurs d'origines naturelles. La projection 2D de la figure VI-12 a montré que le complexe L5—ACH<sup>9</sup> est essentiellement formé par trois liaisons hydrogène entre le ligand L5 et trois acides aminés du site catalytique Trp<sup>9</sup>, Gln<sup>71</sup> et Thr<sup>200</sup>.

Le réseau d'interaction hydrophobe le moins intense entre L5 et ACH<sup>9</sup> reflète le mode d'interaction le plus faible, qui présente une valeur d'énergie égale à -6,32 kcal/mol.



**Figure VI-12** : L'interaction entre L5 et ACH<sup>9</sup>. Projections 2D et 3D visualisés par Discovery studio.

# **Références de la partie computationnelle**

## Références

- [1] Morris, Garrett M., et al. "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." *Journal of computational chemistry* 19.14 (1998): 1639-1662.
- [2] Morris, Garrett M., et al. "AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility." *Journal of computational chemistry* 30.16 (2009): 2785-2791.
- [3] Biovia, Dassault Systèmes, and D. Systèmes. "Biovia, Discovery Studio Modeling Environment." San Diego, CA, USA: Dassault Systèmes Biovia (2016).
- [4] Aimene, Yassine, et al. "Synthesis, crystal structure, inhibitory activity and molecular docking of coumarins/sulfonamides containing triazolyl pyridine moiety as potent selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors." *Crystals* 11.9 (2021): 1076.
- [5] Segueni, Narimane, et al. "Flavonoids from Algerian propolis." *Arabian Journal of Chemistry* 9 (2016): S425-S428.
- [6] Bachwani, M., and R. Kumar. "Molecular docking: a review." *IJRAP* 2.6 (2011): 1746-51.
- [7] Kitchen, Douglas B., et al. "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications." *Nature reviews Drug discovery* 3.11 (2004): 935-949.
- [8] Du, Xing, et al. "Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods." *International journal of molecular sciences* 17.2 (2016): 144.
- [09] Arora, Rohit, and Luba Tchertanov. *The HIV-1 Integrase: Modeling and Beyond*. INTECH, 2012.

# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

Les flavonoïdes sont connus en médecine traditionnelle pour leur pouvoir anti-inflammatoire, antibactérien, anti-tumoral, etc. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à explorer l'effet inhibiteur de certains flavonoïdes naturels contre l'enzyme d'anhydrase carbonique humaine-9 (ACH<sup>9</sup>). D'un point de vue médical, le blocage d'ACH<sup>9</sup> fait partie des stratégies thérapeutiques destinées à réduire les cancers associés.

Lors de la simulation moléculaire, nous avons testé la performance du programme AutoDock4.2, en déterminant l'énergie d'interaction ( $\Delta G \leq 0$ ) et l'écart (RMSD  $\leq 2\text{\AA}$ ) entre la position du ligand naturel (PDB id : 9FK) et celle calculée par AutoDock4.2. Ces tests nous apportent la preuve que le programme AutoDock4.2 est hautement performant et peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions d'autres inhibiteurs, tels que les flavonoïdes dans notre cas.

Les résultats théoriques indiquent que les cinq dérivés flavonoïdes (L1 à L5) sont bien positionnés dans le site actif d'ACH<sup>9</sup>. Les deux hydroxyles 7-OH et 6-OH étaient à une distance d'interaction favorable avec l'ion zinc dans les deux cas L1 et L3, respectivement.

Cependant, L3 présente des valeurs d'énergie d'interaction ( $\Delta G = -6,59$  kcal/mol) et de constante d'inhibition ( $K_i=14,77$   $\mu\text{M}$ ) plus faibles. Le réseau d'interaction intense fourni par la molécule L3 reflète ces valeurs ( $\Delta G$  et  $k_i$ ) plus petites, par rapport aux autres dérivés qui n'ont pas établi d'interactions avec le zinc. En conséquence, le ligand L3 devrait être plus stable et nécessite une investigation plus approfondie.

En fin, en termes de perspectives d'avenir, ce travail pourra être complété par une étude expérimentale in-vitro et in-vivo afin de valider ces résultats théoriques et vérifier l'efficacité de l'approche in-silico.