

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur  
Université de 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 :*

**HARIDI ABIR  
NAILI ROUFAIDA**

---

---

**Etude in silico de l'inhibition de la cyclooxygénase -2**

---

---

**Sous la Direction de :**

**Dr. LACHI Nadia**

**Juin 2019**

# Remerciements

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

*Louange à ALLAH, le miséricordieux, qui nous adonné patience et courage, afin d'achever ce travail.*

*Nous remercions tout particulièrement notre promotrice M<sup>me</sup> LACHI Nadia pour l'honneur qu'elle nous a fait en nous encadrant, pour l'aide précieuse qu'elle nous apporté, pour ses remarques et ses conseils avisés, pour nous avoir guidé de la meilleur façon qui soit afin démener à bien ce travail et sa très grande gentillesse.*

*Nos sincères remerciements et considérations sont exprimés aux membres du jury*

*Je tiens à remercier tous les enseignant du département des sciences de la matière*

*A toute personne ayant participé de près ou de loin à notre formation et à tous ceux qui nous ont apporté leur soutien et encouragements durant la réalisation de ce travail.*

**ABIR ET ROUFAYDA**

# Dédicace

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Remercer Dieu pour son aide pour compléter cette  
recherche*

*A tout ceux qui m'ont poussé au succès*

*A qui dois -je porter son nom mon père DJEMEL*

*Au symbole de gentillesse et tendresse ma mère NORA*

*Ala source de l'amour ma grande mère FATIHA*

*Aimer un homme à mon cœur mon marée HAMDI*

*A ma petite sœur IBTIHEL*

*A mon cher oncle ABD SALAM*

*Amon chere ami ABIR*

*A ma chère grande famille et tous mes amis*

*Je remercie sincèrement, mon encadreur, Mme LACHI*

*Nadia*

**ROUFAYDA**

# Dédicace

*A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie, j'ai pu réaliser ce travail et avec un énorme plaisir, un cœur ouverts et une immense joie, que je dédie mon travail*

*Mes très chers parents, qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joie sain si que pour mes peines. C'est avec émotion, que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect j'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille.*

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

*Mes très chers frères : **WAIL, MOHAMMED***

*A ma petite sœur : **Lina***

*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.*

**ABIR**

## **Sommaire**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Liste des Figures              |   |
| Liste des Tableaux             |   |
| Liste des Abréviations         |   |
| Introduction général.....      | 1 |
| Référence bibliographique..... | 3 |

### ***Chapitre I : Docking Moléculaire***

|  |    |
|--|----|
| 1. Introduction.....                               | 4  |
| 2. Docking Moléculaire.....                        | 4  |
| 3. Les outils du docking .....                     | 5  |
| 3.1. Ligand.....                                   | 5  |
| 3.2. Récepteur.....                                | 5  |
| 3.3. Programme.....                                | 6  |
| 4. Les interactions protéine@ligand.....           | 6  |
| 4.1. Les force de Van Der Waals .....              | 6  |
| 4.2. Liaison d'hydrogène .....                     | 7  |
| 4.3. Les interactions électrostatiques.....        | 7  |
| 4.4. Les interactions hydrophobes .....            | 8  |
| 5. Les étapes de docking.....                      | 8  |
| 5.1. Searching.....                                | 8  |
| • L'approche classique.....                        | 8  |
| • L'approche rationnelle.....                      | 9  |
| 5.2. Le scoring.....                               | 9  |
| a).Les fonctions de scoring empiriques.....        | 9  |
| b).Les fonctions basées sur un champ de force..... | 9  |
| c).Les fonctions de type knowledge-based.....      | 10 |
| 6. Les algorithmes de recherche.....               | 10 |
| • Référence bibliographique.....                   | 11 |

### ***Chapitre II : Les Cyclooxygénases***

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 1. Introduction Général .....         | 13 |
| 2. L'acide arachidonique .....        | 13 |
| 3. Fonction de la cyclooxygénase..... | 14 |
| 3.1.La Cyclo-Oxygénase-1(COX-1) ..... | 14 |
| 3.2.La Cyclo-Oxygénase-2(COX-2).....  | 15 |
| 3.3.La Cyclo-Oxygénase-3(COX-3) ..... | 16 |
| 4. Notion de site actif.....          | 17 |
| 5. Sites actifs du COXs.....          | 17 |
| 5.1.Site actif du COX-1 .....         | 17 |
| 5.2.Site actif du COX-2.....          | 18 |
| 6. Les inhibiteurs du COXs.....       | 19 |
| 6.1.Inhibiteurs réversibles .....     | 19 |
| • Inhibiteur compétitif.....          | 20 |
| • Inhibiteur non-compétif .....       | 20 |
| • Inhibiteurs incompétitifs .....     | 20 |
| 6.2.Inhibiteurs Irréversibles.....    | 20 |
| 6.3.Les inhibiteurs naturels.....     | 20 |
| 6.4.Les inhibiteurs synthétiques..... | 20 |
| Référence bibliographique.....        | 22 |

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

|  |    |
|--|----|
| 1. Introduction.....                               | 23 |
| 2. Présentation du ligand étudiées .....           | 23 |
| 2.1.ARN2508.....                                   | 23 |
| 3. Les Banques de données.....                     | 24 |
| 3.1.Protein Data Bank(PDB).....                    | 24 |
| 3.2.Pubchem.....                                   | 24 |
| 4. La démarche de docking.....                     | 24 |
| 4.1.Préparation des protéines .....                | 24 |
| 4.2.Préparation du ligand.....                     | 26 |
| 5. Test de fiabilité du programmes du docking..... | 28 |
| 5.1.Test du RMSD.....                              | 28 |
| 5.2.Analyse visuelle.....                          | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3.Docking de ARN-2508 .....          | 30 |
| 6.interaction de ligand-protéines..... | 31 |
| 6.1.Analyse Visuelle .....             | 34 |
| Référence bibliographique.....         | 37 |
| Conclusion général                     |    |
| Annexe                                 |    |

## *Liste des Figures*

| <i>N°</i>  | <i>Intitulé des Figure</i>                                | <i>Page</i> |
|--|---|-------------|
| <b><i>Chapitre I : Docking Moléculaire</i></b>       |   |             |
| <b>Figure I.1</b>                                    | Formation du complexe protéine-ligand .                   | 4           |
| <b>Figure I.2</b>                                    | Les interactions de Van der Waals .                       | 7           |
| <b>Figure I.3</b>                                    | Les liaisons hydrogène .                                  | 7           |
| <b>Figure I.4</b>                                    | Les interactions électrostatiques .                       | 8           |
| <b>Figure I.5</b>                                    | Représentation des étapes du docking .                    | 10          |
| <b><i>Chapitre II : Les Cyclooxygénases</i></b>      |   |             |
| <b>Figure II.1</b>                                   | Formule d'acide arachidonique .                           | 14          |
| <b>Figure II.2</b>                                   | Structure de la Cyclooxygénase-1 .                        | 15          |
| <b>Figure II.3</b>                                   | Structure de la Cyclooxygénase-2 .                        | 15          |
| <b>Figure II.4</b>                                   | Représentation du site actif de la COX-1 .                | 18          |
| <b>Figure II.5</b>                                   | Représentation du site actif de la COX-2 .                | 19          |
| <b><i>Chapitre III : Résultats et discussion</i></b> |   |             |
| <b>Figure III.1</b>                                  | représentation de la structure 2D, 3D du ligand ARN2508 . | 23          |
| <b>Figure III.2</b>                                  | L'enzyme 5W58 non simplifié .                             | 25          |
| <b>Figure III.3</b>                                  | L'enzyme 5W58 simplifiée .                                | 25          |



|                      |   |    |
|----------------------|---|----|
|                      | (une seule chaine)  |    |
| <b>Figure III.4</b>  | la structure géométrique de ARN2508 optimisée par B3LYP\6-31++ (d, p) . | 27 |
| <b>Figure III.5</b>  | Le spectre IR .   | 27 |
| <b>Figure III.6</b>  | La superposition des ligands .  | 29 |
| <b>Figure III.7</b>  | Les différentes interactions ARN2508-5W58 .                             | 34 |
| <b>Figure III.8</b>  | Les différentes interactions ARN2508-3PGH .                             | 35 |
| <b>Figure III.9</b>  | Les différentes interactions ARN2508-3LJ7 .                             | 35 |
| <b>Figure III.10</b> | Les différentes interactions ARN2508-1MT5 .                             | 36 |

## *Liste des Tableaux*

| <i>N°</i>  | <i>Intitulé des Tableaux</i>                                | <i>page</i> |
|--|---|-------------|
| <b><i>Chapitre II: Les Cyclooxygénase</i></b>        |   |             |
| <b>Tableau II.1</b>                                  | La Différence entre COX-1, COX-2 et COX-3 .                 | 16          |
| <b><i>Chapitre III : Résultats et discussion</i></b> |   |             |
| <b>Tableau III.1</b>                                 | La boîte GRID BOX des enzymes .                             | 26          |
| <b>Tableau III.2</b>                                 | les valeurs d'énergie calculent .                           | 26          |
| <b>Tableau III.3</b>                                 | Interprétation du spectre IR .                              | 27          |
| <b>Tableau III.4</b>                                 | Calcul du RMSD .  | 28          |
| <b>Tableau III.5</b>                                 | Résultats de docking moléculaire ARN2508-COXS .             | 31          |
| <b>Tableau III.6</b>                                 | Les différentes interactions ARN2508- Protéines (docking) . | 32          |
| <b>Tableau III.7</b>                                 | Les différentes interactions ligand naturel-Protéines .     | 33          |

## Liste des Abréviation :

**3D** : trois dimensions.

**AA** :acide arachidonique.

**AGPI** :acide gras polyinsaturé .

**AINS** :Anti inflammatoires non stéroïdiens.

**B3LYP** : la fonctionnelle d'échange-corrélation **Becke3-Lee-Yang-Parr** .

**Chr.1** : chromosome 1.

**Chr.9** : chromosome 9.

**COXS** : cyclooxygénase .

**COX-1** : cyclooxygénase-1.

**COX-2** : cyclooxygénase-2.

**COX-3** : cyclooxygénase-3.

**DM**: la dynamique moléculaire.

**DFT** : la théorie de la fonctionnelle de la densité.

[**E**] :l'enzyme.

[**ES**] : Enzyme-Substrat.

**FAAH** :Fatty Acid Amide Hydrolase.

**IR** : Infrarouge .

**MC** : la méthode de Monte Carlo .

**NCBI** :le National Center for Biotechnology Information .

**PDB** :Protein Data Bank .

**PGG2** : prostaglandines .

**PGH2** : prostaglandines .

**RMN** : résonance magnétique nucléaire .

**RMSD** :Root Mean Square Deviation .

**[S]** : substrat .

**UV-VIS** : spectroscopie UV-visible .

**Les acides aminés :**

**Ala** : Alanine .

**Arg** : L'Arginine .

**Gln** : Glutamine .

**Glu** : acide glutamique .

**Gly** : Glycine .

**His** :Histidine .

**Ser** : Sérine .

**Tyr** :Tyrosine .

**Iso** :L'Isoleucine .

**Leu** : Leucine .

**Lys** : Lysine .

**Met** : Méthionine .

**Phe** : Phénylalanine .

**Pro** : Proline .

## Résumé

En résumé, notre étude propose sur une méthode de modélisation moléculaire pour la double inhibition de FAAH / COX par le double inhibiteur hybride ARN2805. Nous avons choisis nos inhibiteur qui montre une activité élevée avec une concentration inhibitrice ( $IC_{50}$ ) de  $0,031 \pm 0,002 \mu M$  contre FAAH du rat,  $0,012 \pm 0,002 \mu M$  à l'encontre de la COX-1, et  $0,43 \pm 0,025 \mu M$  à l'encontre de la COX-2.

**Mots clés :** COX-1, COX-2, FAAH, modélisation moléculaire, ARN2805, concentration inhibitrice, inhibiteur.

## Introduction générale

La modélisation moléculaire est une approche scientifique multidisciplinaire : elle utilise des lois de la chimie, de la physique et de la biologie dans des programmes informatiques spécifiques afin de trouver la structure et les propriétés de composés chimiques et biochimiques (protéines, acides nucléiques, complexes moléculaires, solides, cristaux etc.) [1].

Elle permet d'étudier des systèmes complexes et de représenter leur comportement en simulant, à l'aide de fonctions appropriées, les grandeurs réelles. Les différentes interactions des atomes entre eux et avec leur environnement sont décrites. Il existe plusieurs méthodes pour modéliser le comportement d'une molécule et de son environnement : La minimisation d'énergie, la méthode de Monte Carlo (MC), la dynamique moléculaire (DM) [2].

La modélisation moléculaire s'est développée grâce à l'évolution de l'informatique qui a permis d'intégrer les concepts de chimie théorique dans les algorithmes et de développer des machines capables d'exécuter les lourds calculs demandés et de stocker les données générées[3-5].

Utilisées dans le domaine du Docking, ces applications permettent l'étude au niveau atomique d'interactions entre deux entités moléculaires. Elles visent la prédiction de l'agencement le plus probable d'un ligand au sein de son récepteur en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favorisent la formation du complexe ligand@récepteur le plus stable[6].

L'inflammation est une réaction normale de l'organisme en réponse à un traumatisme biologique, physique ou chimique entraînant une altération de certaines cellules. Cette réaction se manifeste cliniquement par une rougeur, un œdème et une douleur. Le traitement de l'inflammation est souvent basé sur l'apport des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Les AINS regroupent les molécules qui bloquent la synthèse des prostanoides en agissant sur les cyclooxygénases [7]. Ces derniers sont une famille d'enzymes impliquées dans la biosynthèse des prostaglandines.

C'est dans ce contexte, qu'on s'est intéressé à étudier in silico le mécanisme d'action d'un AINS non classique, l'ARN2508, sur les cyclooxygénase (COXs) et les fatty acide amide hydrolase (FAAH).

Le présent mémoire est structuré en trois chapitre :

## **Introduction générale**

- **Chapitre 1:** est consacré au docking moléculaire, sa définition, ses concepts et sa démarche.
- **Chapitre 2:** représente une description générale des cyclooxygénase (COXs) : leur structure, leur rôle, leur localisation tissulaire, et similitude structurelle entre la cyclooxygénase 1 et 2.
- **Chapitre 3 :** analyse et discussion des résultats obtenus au cours de cette étude. Enfin nous exposons l'essentiel de nos résultats et une discussion.
- **Conclusion générale**

## Références bibliographiques

- [1] :Leach A., 2001. - Molecular modelling, principles and application, prentice hall, new jersey.
- [2] : Bastard K., 2005.- Assemblage flexible de macromolécules : la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques. UFR Biologie et Sciences de la Nature.
- [3]:Liotta D., 1988. - Advances in molecular modeling, Ed, JAI Press, P1.
- [4] : Deremble c.e.t., Laver y, r, 2005.- Macromolecular recognition. curropin. struct. biol, 15 (2):171–175.
- [5]:Toulhoat H. 2007.- Modélisation moléculaire. bases théoriques : des propriétés microscopiques aux propriétés macroscopiques. techniques de l'ingénieur J 1-013
- [6] :Warren G., Andrews c.w. Capelli a.m., Clarke .B, and al. 2006.- A Critical assessment of docking programs and scoring functions, J. Med. Chem, 49:5912-5931.
- [7] :Gheddab Nadjat. ,2016.- Inhibition de la cyclooxygénase par les flavonoïdes. etude bibliographique. mémoire de master en génétique moléculaire, université des frères mentouri constantine



## 1. Introduction

Les interactions protéine-protéine et protéine-ligand jouent un rôle clé dans l'organisation de systèmes biologiques. Elles permettent la régulation de certains processus biologiques, la transmission des signaux, ou encore la catalyse de diverses réactions biochimiques. Ceci ouvre la voie à la prédiction de leur structure 3D constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour l'industrie pharmaceutique dont l'intérêt réside dans la création de nouveaux médicaments et l'étude de leurs propriétés associées.

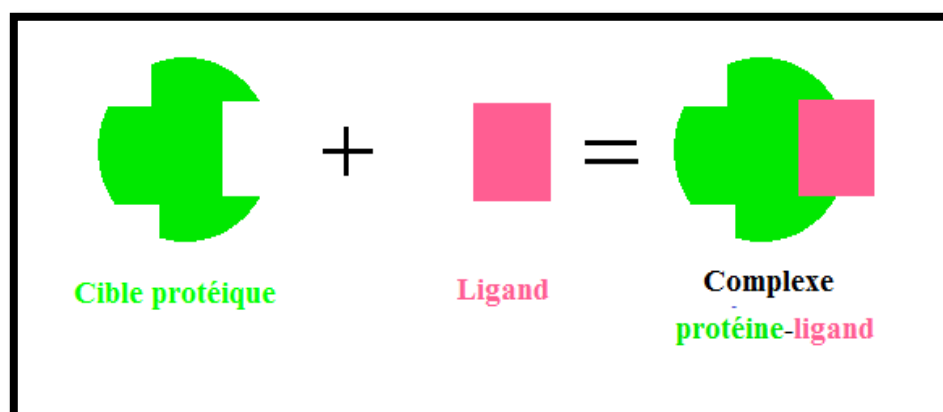
Un médicament est généralement constitué d'un ligand et d'une protéine. Le ligand constitue la partie thérapeutique du médicament, la protéine correspond au transporteur du ligand. L'industrie pharmaceutique produit tous les jours de nouveaux ligands qui ont besoin d'un moyen d'assimilation au sein des cellules pour être efficaces médicalement [1].

## 2. Docking Moléculaire

Le docking (ancrage ou amarrage) est l'expression donnée aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches chimique, physique et biologique sont combinées pour étudier au niveau atomique les interactions entre deux molécules :

- L'une, la cible, une protéine possédant un ou plusieurs sites actifs spécifiques avec une structure tridimensionnelle connue.
- L'autre, le ligand, une petite molécule flexible.

Il permet la détermination des conformations les plus favorables pour la fixation du ligand à la cible conduisant à la formation du complexe ligand@protéine le plus stable [2](figure 1).



**Figure.I.1** : Formation du complexe ligand@protéine .

### 3. Les outils du docking

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

#### 3.1. Ligand

Un ligand est un atome, un ion ou une molécule portant des fonctions chimiques lui permettant de se lier à un ou plusieurs atomes ou ions centraux. Le terme de ligand est le plus souvent utilisé en chimie de coordination et en chimie organométallique (branches de la chimie inorganique).

En biologie, un ligand (du latin ligand Um, liant) est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule ciblée, protéine ou acide nucléique, jouant en général un rôle fonctionnel : stabilisation structurale, catalyse, modulation d'une activité enzymatique, transmission d'un signal.

Ce terme, très utilisé pour l'étude de protéines, et qui désigne les molécules qui réagissent avec la protéine de manière non-covalente et spécifique et qui jouent un rôle dans ses fonctions.

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

#### 3.2.Récepteur

Un récepteur est un macromoléculaire étant le plus souvent une protéine[4].La *Protein Data Bank* (PDB)est un répertoire mondial de dépôt d'informations sur la structure tridimensionnelle de macromolécules biologiques : protéines, essentiellement et des acides nucléiques. Ces molécules proviennent de l'ensemble des règnes biologiques. Les structures tridimensionnelles sont issues principalement de l'analyse par diffraction des rayons X, les autres par résonance magnétique nucléaire (RMN) ou de modélisations moléculaires[5].

Les différentes conformations tridimensionnelles sont téléchargeables sous extension pdb lisibles par les logiciels de docking et contenant diverses informations sur la protéine en question. Par exemple : le nom du récepteur, l'équipe qui a résolue la structure, la méthode expérimentale, ...etc.

### **3.3.Programme**

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

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

A l'heure actuelle, plusieurs programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles. Les plus fréquemment cités sont respectivement : Auto Dock, AutoDockVina, GOLD, FlexX, DOCK et ICM [6].

## **4. Les interactions protéine-ligand**

Le docking moléculaire permet l'étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation du complexe ligand@récepteur. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles :

### **4.1.Les interactions de Van Der Waals**

Elles résultent de l'interaction des nuages électroniques de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive. Le potentiel de Van Der Waals contient une composante attractive lorsque les atomes sont liés, et une composante répulsive si les atomes sont trop proches Il peut être utilisé pour empêcher l'interpénétration de deux protéines durant un docking interactif, en calculant les forces entre les atomes à l'interface. (Figure.I.2)

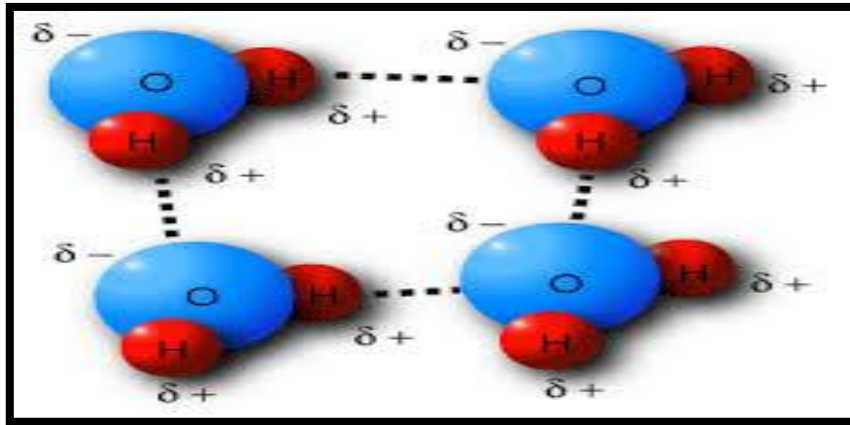


Figure.I.2 : Les interactions de Van der Waals .

#### 4.2. Les liaisons hydrogènes

Les liaisons hydrogène découlent de l'interaction électrostatique entre un atome d'hydrogène (donneur) et un élément très électronégatif portant au moins un doublet non liant (accepteur) comme (oxygène, azote ou fluor)[7]. (Figure.I.3)

La liaison hydrogène est le responsable de la structure secondaire des protéines car cette dernière est composée par une chaîne (ou séquence) d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques.

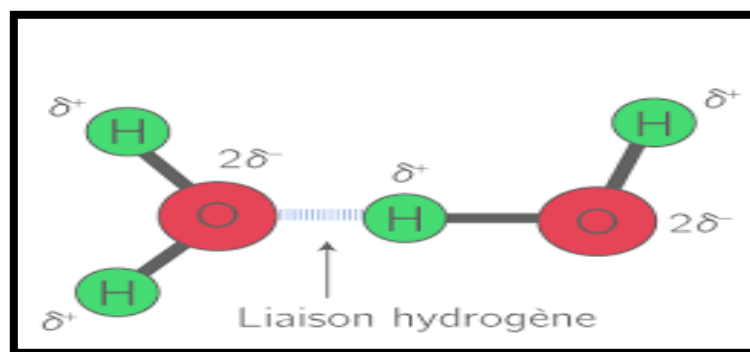


Figure.I.3 : Les liaisons hydrogène .

#### 4.3. Les interactions électrostatiques

Les interactions électrostatiques, liaisons ioniques résiduelles faibles, proviennent de l'interaction entre deux atomes de charges opposées conduisant à la création d'une force attractive[7].

Certains acides aminés peuvent être rechargés positivement ou négativement, ce qui donne lieu à des phénomènes électrostatiques qui favorisent la formation d'un complexe protéique spécifique. (Figure.I.4)

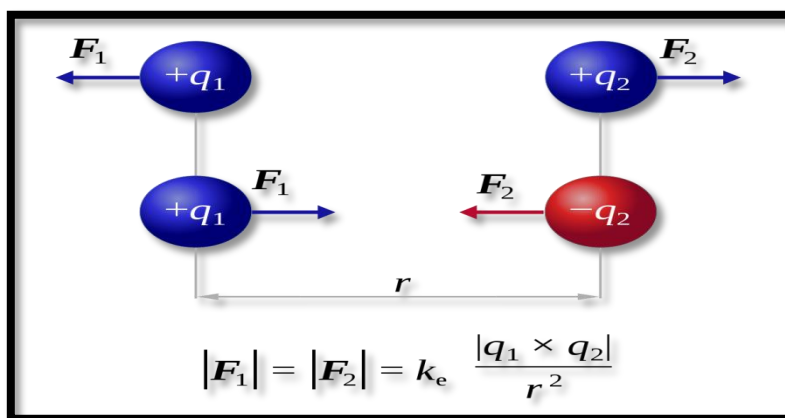


Figure.I.4 : Les interactions électrostatiques .

#### 4.4. Les interactions hydrophobes

Les interactions hydrophobes sont des chaînes organiques saturées ou aromatiques non polaires ayant très peu d'affinité pour l'eau. Ils ont tendance à se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'environnement aqueux[8].

### 5. Les étapes du docking moléculaire

Tout programme de docking repose sur la réalisation de deux étapes principales : la première (searching) et la seconde (scoring). (Figure.I.5)

#### 5.1. Searching

La principale préoccupation de l'opération de docking est de prendre en compte la flexibilité des deux entités. Tout algorithme de docking requiert en amont une recherche conformationnelle la plus exhaustive possible de la molécule organique. La génération et le choix de l'ensemble de conformères peuvent être effectués de plusieurs manières.

De multiples stratégies ont été élaborées pour déterminer les conformations de plus basse énergie. Les principales approches de cette étape sont : l'approche classique et l'approche rationnelle.

- **L'approche classique :**

L'approche dite «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 représenter l'intérieur de la protéine, la molécule à analyser est explorée dans certaines conditions physico-chimiques d'hydrophilie et de lipophilie. La difficulté est de définir les Proportions en caractère hydrophile ou lipophile à l'intérieur du site actif, qui varient selon la protéine étudiée[9].

- **L'approche rationnelle :**

Cette approche est un moyen adapté pour générer les conformères de plus basse énergie en tenant compte de la protéine. Plus précisément, ces techniques de construction incrémentale sont réalisées sous l'influence de la protéine. De ce fait, l'espace conformationnel se trouve réduit et, par la même occasion, les solutions finales sont moins nombreuses et parfois plus pertinentes[10].

## 5.2. Scoring

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à leur association sous forme de complexe[11].

L'utilisation des fonctions de score permet de déterminer la conformation qui représentera au mieux le ligand concerné et classer les premières poses de chaque ligand afin d'établir un classement final des molécules les plus prometteuses. Représentant le résultat de la prédiction de l'interaction protéine-ligand, ces fonctions peuvent être classées dans des grandes catégories :(empirique, champs de force et knowledge-base) :

### a. Les fonctions de scoring empiriques :

Les termes représentant chacun des types d'interactions connues dans le complexe (liaison hydrogène, contact hydrophobe, interaction ionique, surface de contact ligand@protéine et parfois les contributions entropiques). La pondération de chaque terme est déterminée par des méthodes de régression multi variées appliquées à un ensemble d'apprentissage.

### b. Les fonctions basées sur un champ de force :

Le score est calculé en faisant la somme de l'énergie d'interaction protéine-ligand et de l'énergie interne du ligand [12].

### c. Les fonctions de type knowledge-based :

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles de complexes ligand-protéine déterminés de manière expérimentale.

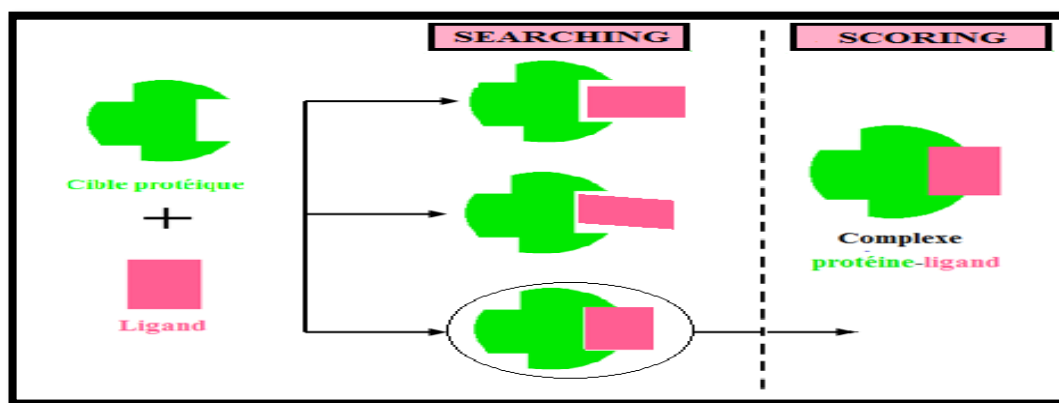


Figure.I.5 : Représentation des étapes du docking .

## 6. 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 [13].

Les algorithmes ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association récepteur-ligand les plus favorables. La prédiction de la conformation du ligand dans le site actif de la protéine est le plus grand défi du design des drogues basé sur la structure. Le rôle des algorithmes de docking désignés à exécuter cette tâche est divisé en deux parties essentielles :

- Trouver toutes les conformations, translations, rotations du ligand dans le site actif de la protéine en un temps d'exécution très petit.
- Calculer l'énergie utilisée pour évaluer les interactions entre la protéine et le ligand, et classer les solutions[14-15].

## Références bibliographiques

- [1] : M<sup>ELLE</sup> Attaf Dalila., Résolution du docking moléculaire le prototype API-Dock.
- [2] : Yang Y., Chakravorty D.K., Merz K.M., 2010.- Finding a needle in the haystack: computational modeling of Mg<sup>2+</sup> binding in the active site of protein farnesyltransferase. *biochemistry*, 49: 9658-9666
- [3]: Leacha.R. molecular modelling: Principles and application. pearson education canada. 2001.582. 10-6p.
- [4] : El Hadji Said K. , Contribution à l'étude de l'inhibition d'enzyme par des tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. thèse de master d'université de tlemcen faculté des sciences département de chimie. tlemcen. algérie. 2016. 50P
- [5] :Antoine.F.,Techniques de modélisation moléculaire appliquées à l'étude et à l'optimisation de molécules immunogènes et de modulateurs de la chimiorésistance. thèse de doctorat, université joseph fourier - grenoble I, 2006.
- [6] : 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. 90 p.
- [7] :Demachy I., Piquemal J.P., 2014.- La surface d'énergie potentielle vue par les champs de forces. *actualité chimique*, 388(389) : 37-42.
- [8] : Veselovsqy A.V., Ivanov Y.D., Ivanv A.S., Archakov A.I., Lewi P., Janssen P., 2002.- "Protein-protein interactions : mechanisms and modification by drugs". *pub. med.*, 15(6) : 405-22.
- [9] : Kuntz, I.D. ; Blaney, J.M.; Oatley, S.J;Langridge, R.;Ferrin, T.E.,A geometric approach to macromolecule ligand interactions *J. mol. Bio.* 1982, 161, 269-288.
- [10]: Bohm,H.j .,The computer program ludi a new method for the de novo design of enzyme inhibitors *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 1992, 6, 593-606.
- [11] :Kollman P.A., Massova.I., Reyes.C., Kuhl.B., and al., 2000.- Calculating Structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models, *Acc. Chem. Res.*, 33: 889-897.



[12] : Beautrait. A.,2008., Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel. Thèse de Doctorat en Chimie Informatique et Théorique. France: Université Henri Poincaré – Nancy I. 122

[13] : Asses.Y., Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré. France. (2011). p 137.

[14 ]: Sharp.K.A., Honig.B., 2015 Structural Determinants of Promiscuous and Specific Binding in Protein—Protein Complexes Using Component Analysis Techniques .,vol 19.p301-332.

[15 ] : Kramer.B., Rarey . M, Lengauer.T. Proteins Supplement. (1997).,vol 1. P 221-225.

## 1. Introduction

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

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

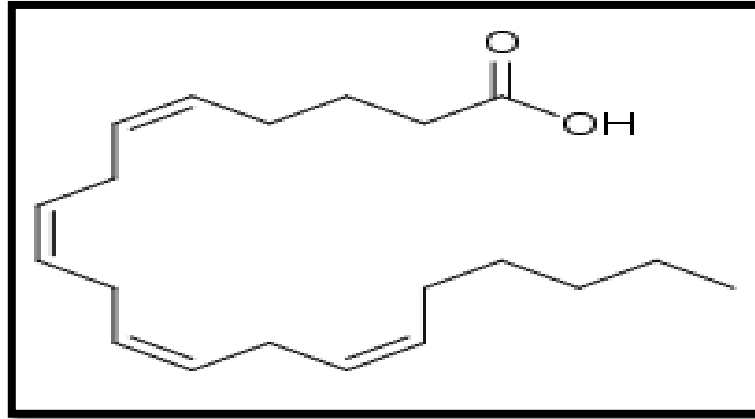
1. La cyclooxygénase de type 1 (COX-1) est exprimée de manière constitutive dans l'organisme c'est-à-dire de façon permanente. Son inhibition conduit généralement à des événements tels que des dérégulations rénales et des dysfonctionnements de la fonction ulcéro-gastrique.
2. La cyclooxygénase de type 2 (COX-2) est un isoforme exprimé par l'action d'agents inducteurs. Cette forme de cyclooxygénase est responsable de la production élevée en prostaglandine lors du processus inflammatoire induisant fièvre, douleur et inflammation. L'intérêt majeur dans le traitement des phénomènes inflammatoires est d'inhiber spécifiquement l'isoforme 2 [2,3].

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

## 2. L'Acide arachidonique (AA)

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

Il y a plusieurs aliments riches en acide arachidonique comme Huile de foie de morue ; cœur de poulet, cuite etc..... [4]. (Figure.II.1)



**Figure.II.1** : formule développée d'acide arachidonique .

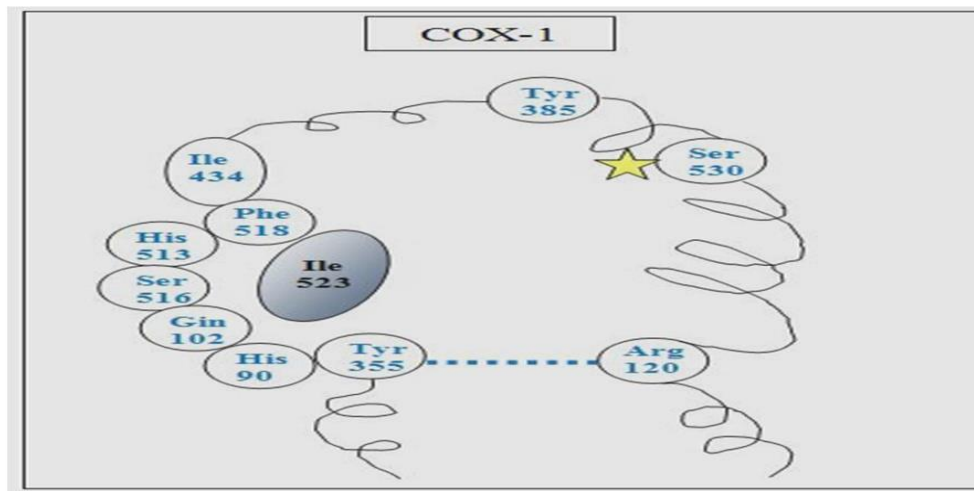
### 3. Fonction de la cyclooxygénase

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

#### 3.1 La Cyclo-Oxygénase-1 (COX-1)

La COX-1 humaine, composée de 576 acides aminés (71 Kilo daltons), est codée par un gène qui se situe sur le chromosome 9. Elle est constitutivement exprimée dans la majorité des cellules et des tissus, notamment dans l'appareil digestif, les reins et les plaquettes sanguines. On la retrouve dans l'estomac, les plaquettes, le foie, les poumons, l'intestin, le système nerveux central de l'humain, du rat, et de chien.

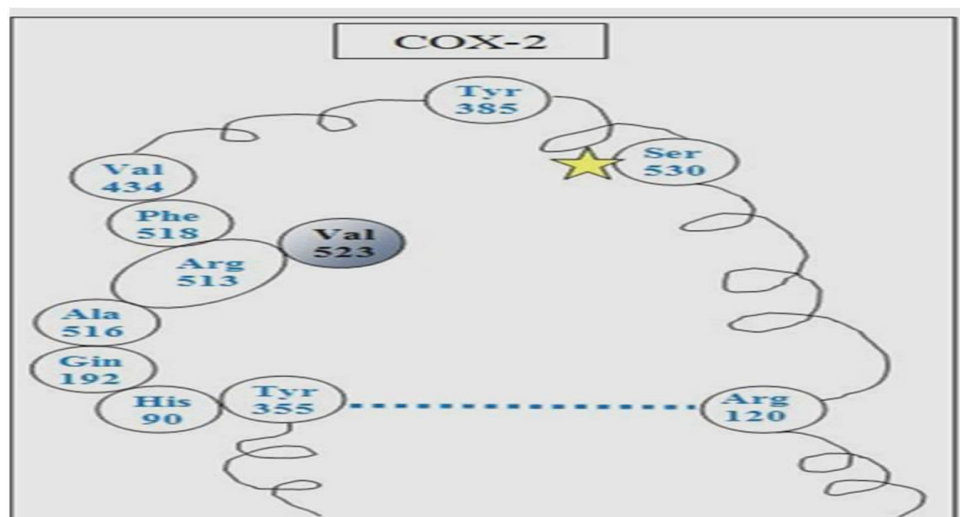
La COX-1 est localisée principalement dans le réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire des cellules endothéliales [5]. (Figure.II.2)



**Figure. II.2:** Structure de la Cyclooxygénase-1 .

### 3.2. La Cyclo-Oxygénase-2 (COX-2)

Elle a été découverte en 1991. La COX-2 humaine est composée de 581 acides aminés (72Kilo daltons) dont la séquence est homologue à 60% environ à celle de la COX-1. Codée par un gène qui se situe sur le chromosome 1, la COX-2 est une enzyme principalement inductible. Cependant, elle est constitutivement exprimée dans certains tissus tels que le cerveau et le rein Cette enzyme se retrouve dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans les feuillettes internes et externes de l'enveloppe nucléaire des monocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Cependant, COX-2 préfère se localiser dans l'enveloppe nucléaire où son activité est plus importante [6]. (Figure.II.3)



**Figure. II.3 :** Structure de la Cyclooxygénase-2 .

### 3.3. La Cyclo-Oxgénase-3 (COX-3)

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

**Tableau 01** : Différences entre COX-1, COX-2 et COX-3.

|                                | COX-1  | COX-2   | COX-3           |
|--------------------------------|--|---|-----------------|
| <b>Similitude structurelle</b> | Seulement 60% d'homologie dans la séquence d'acides aminés(COX-1 et COX-2 sont codées par des gènes différents).<br>Le siteactif de COX-2 est plus grand que celui de COX-1. |   |                 |
| <b>Régulation</b>              | Présence physiologique, multiplication possible de laconcentration par un facteurdeux à quatre.  | Formation induite lors d'inflammation (synthèsemultipliée par 10 à 80 en casde stimulation appropriée : inflammation,hormones). |                 |
| <b>Expression</b>              | Constitutive   | Induite   | constitutive    |
| <b>Nom du gène</b>             | PTGS1  | PTGS2   | PTGS1           |
| <b>Localisation du gène</b>    | Chr.9  | Chr.1   | Chr.9           |
| <b>Poids moléculaire</b>       | 71kDa  | 72kDa   | 65kDa           |
| <b>Nombre d'acide aminé</b>    | 576  | 581   | 576             |
| <b>Localisation tissulaire</b> | Présente dans la plupart destissus, surtout abondante dans les thrombocytes, les cellulesendothéliales, l'estomac, lesreins et les muscles lisses.                           | Présence :<br>-Physiologique dans la prostate,l'utérus, les testicules et lespoumons.<br>-dans tous les tissus après induction. | Cerveau         |
| <b>Fonction physiologique</b>  | Maintien desfonctions HoméostatiquesNeuro inflammation   | Inflammation,fièvre et douleurOvulation, accouchement ,Maintien des fonctions homéostatiques (coagulation).                     | Fièvre, douleur |

#### 4. Notion de site actif

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

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

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

#### 5. Sites actifs des COXS

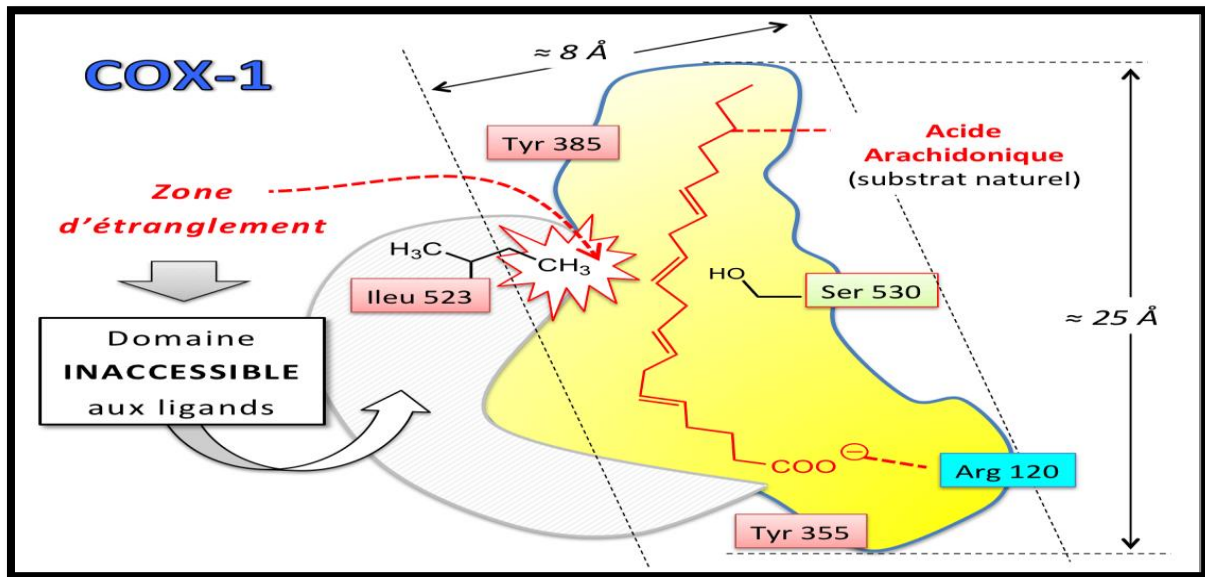
Le site actif d'une enzyme est schématiquement formé par un petit nombre d'acides aminés organisés en un arrangement tridimensionnel précis formant une poche ou une crevasse dans la protéine. Le site a une affinité élevée pour le substrat, parce que la nature chimique des acides aminés du site et leur arrangement spatial forment une région complémentaire de certains groupements de la molécule de substrat [8].

##### 5.1.Site actif des COX-1

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

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

- **L'Isoleucine 523** est responsable d'un effet stérique en raison de sa chaîne latérale isobutyle. Ce motif ramifié génère une zone d'étranglement dans la partie centrale du site catalytique de la COX-1[9]. (Figure.II.4)



**Figure.II.4 :** Représentation du site actif de la COX-1 .

### 5.2.Site actif des COX-2

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

- Le site actif COX-2 est dépourvu de **l'isoleucine 523** et possède à la place une **valine** dont le groupement isopropyle est plus petit par rapport à l'isobutyle. La perte d'un groupe CH<sub>3</sub> permet de diminuer l'encombrement stérique : il se crée un passage vers une poche latérale qui devient alors accessible à des molécules relativement volumineuses.
- Cette poche latérale se distingue par certains résidus à caractère polaire : Arginine (**Arg.**), Glutamine (**Gln**), Histidine (**His**) [9]. (Figure.II.5)

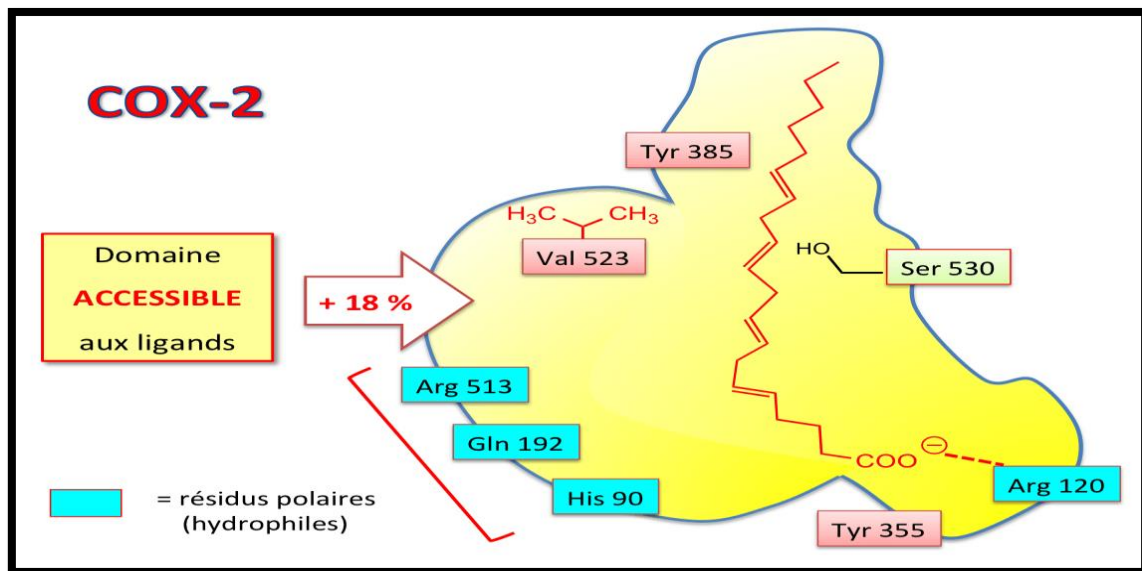


Figure.II.5 : Représentation schématique du site actif de la COX-2 .

## 6. Les inhibiteurs des COXS

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

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

### 6.1. Les inhibiteurs réversibles

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



- **Inhibiteur compétitif**

Ils se lient de manière réversible au site actif de l'enzyme en bloquant l'accès au substrat. Ils diminuent donc la concentration d'enzyme libre. En général ils ressemblent chimiquement au substrat. D'ailleurs, si une enzyme a plusieurs substrats possibles, ceux-ci peuvent aussi agir comme inhibiteurs compétitifs réciproques. Les meilleurs inhibiteurs sont souvent des analogues de l'état de transition de la réaction [12].

- **inhibiteur non-compétitif**

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

- **Inhibiteurs incompétitifs**

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

### **6.2. Inhibiteurs irréversibles**

Ces substances se fixent sur l'enzyme de manière irréversible, en général par liaison covalente. Leur effet est de diminuer la quantité totale d'enzyme disponible, leur effet sur la cinétique ressemble donc à l'inhibition non-compétitive pure [12].

### **6.3. Inhibiteurs naturels**

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

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

### **6.4. Les inhibiteurs synthétiques**

Plusieurs molécules synthétisées sont maintenant considérées comme principaux agents thérapeutiques pour le traitement et la prévention des maladies inflammatoires. Les

Anti Inflammatoires Non Stéroïdiens regroupent l'ensemble des médicaments symptomatiques inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines.

Ils agissent principalement au niveau de la cascade de l'acide arachidonique et plus précisément par blocage d'enzymes de cyclooxygénases [12].

## Référence bibliographique :

- [1] : Eschwege P., Deledinghen V., Camilli T., Kulkarnis., Dalbagni G., Droupy S., Jardin A., Benoit G., 2001.30 (10) ., Weksler B. .Acide arachidonique et prostaglandines, inflammation et oncologie la presse médicale:508-510
- [2] : Vanryn, J.;Pairet, M., 1999 ., Clinical experience with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Inflammares.*, 48, 247-254.
- [3] : Dubois, R.N.;Abramson, S.B.; Crofford, L.; Gupta, R.A.; Simon, L.S.; Van de Putte, L.B.; Lipsky, P.E. Cyclooxygenase in biology and disease *FASEB J* 1998, 12, 1063-1073.
- [4] : Laetitia Matrat ., Diététicienne-nutritionniste du. sources :[www.personal-sport-trainer.com](http://www.personal-sport-trainer.com)
- [5] : Piootd ., Loll P.J ., Garavito M., 1994., The x-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin h2 synthase-1. *J Biol Chem* 269: 243-249.
- [6] : Knights K., Mangoni A., Miners J., 2011 ., Defining the COX inhibitor selectivity of nsaids :Implications for un derstanding toxicity. *Expert Rev.*, 3 : 769 776.
- [7] : M<sup>me</sup>Laouar Iman ; 2014-2015., Etude des interactions enzyme-ligand. cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase,
- [8] : Goldberg M., 2003 ., Regards sur la biochimie., une fonction majeure des proteines: la catalyses enzymatique
- [9] : Untori2.crihan.fr/unspf/2015\_bordeaux\_nuhrich.../ains\_a\_nuhrich\_2015.pdf
- [10] [12] : Simm *et al.* ,(2005) ., Bulgecin A: a Novel inhibitor of binuclear metallo- $\beta$ -lactamases" *biochem. J.* 387, 585 - 590
- [11] : Jamgoodman ., december 2018 .,Inhibiteur\_enzymatique

## 1. Introduction

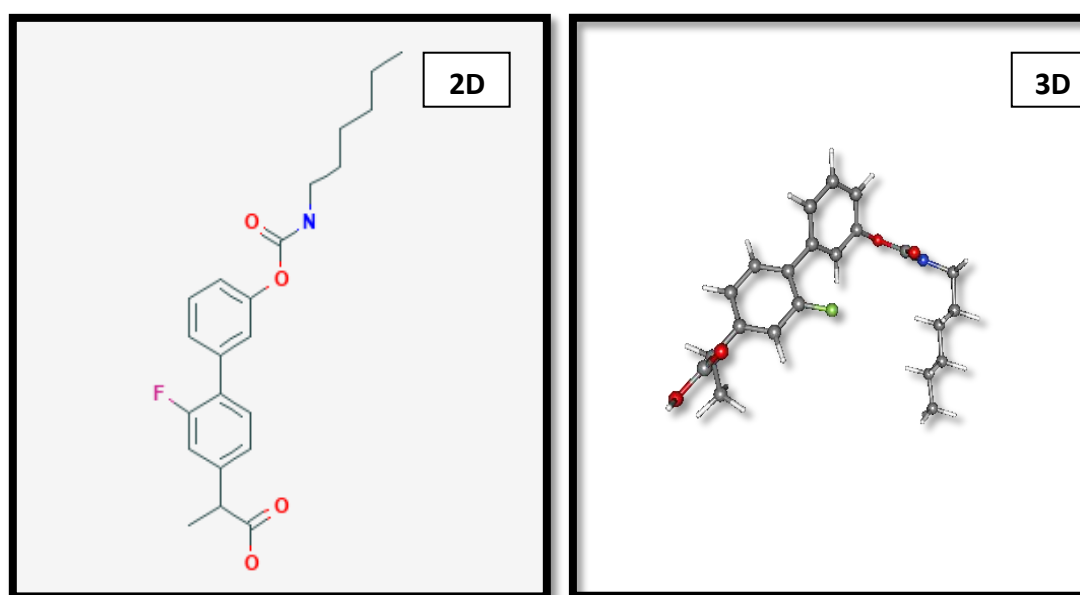
Dans ce chapitre nous allons présenter les résultats d'interactions d'un composé anti inflammatoire type AINS (ARN2508) avec les cyclooxygénases type1 (PDB : 1DIY), cyclooxygénase type 2 (PDB : 5W58, 3PGH et 5F19) et les enzymes Fatty Acide Amide Hydrolase 'FAAH' (PDB : 3LJ7, 1MT5) obtenus par docking moléculaire en utilisant l'Auto dock vina.

## 2. Présentation du ligand étudiée

### 2.1. ARN2508

L'ARN est une molécule fondamentale qui code la protéine et contrôle l'expression des gènes, jouant un rôle de régulation clé dans de nombreuses réponses cellulaires et processus vitaux, tels que le patrimoine génétique humain et les maladies [1].

l'ARN2508 (**figure III.1**) (**Acide 2- [3-fluoro-4- [3- (hexylcarbamoyloxy) phényl] phényl] propanoïque**) de formule semi développée ( $C_{22}H_{26}FNO_4$ ), un nouvel agent anti-inflammatoire qui inhibe à la fois cyclooxygénase (COX)et l'enzyme**Fatty Acid Amide Hydrolase** (FAAH) qui est une sérine hydrolase responsable de la désactivation de l'anandamide lipidique bioactif, principal neurotransmetteur endogène impliqué dans le contrôle de la douleur induit par les endocannabinoïdes [2]. (Figure.III.1)



**Figure III .1** : représentation de la structure 2D, 3D du ligand ARN2508 .

### 3. Les Banques de Données

#### 3.1. Protein Data Bank ( PDB)

Est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle (structure 3D) des macromolécules biologiques : protéines essentiellement, et acides nucléiques. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN [3].

#### 3.2. Pubchem

C'est une banque de données américaine des molécules chimiques gérée par NCBI (le National Center for Biotechnology Information). Elle contient actuellement plusieurs millions de composés dont la structure et les propriétés physico-chimiques sont gratuitement accessibles. Cette banque a été utilisée pour faire ressortir des similaires structuraux de notre ligand [4].

### 4. La démarche de docking

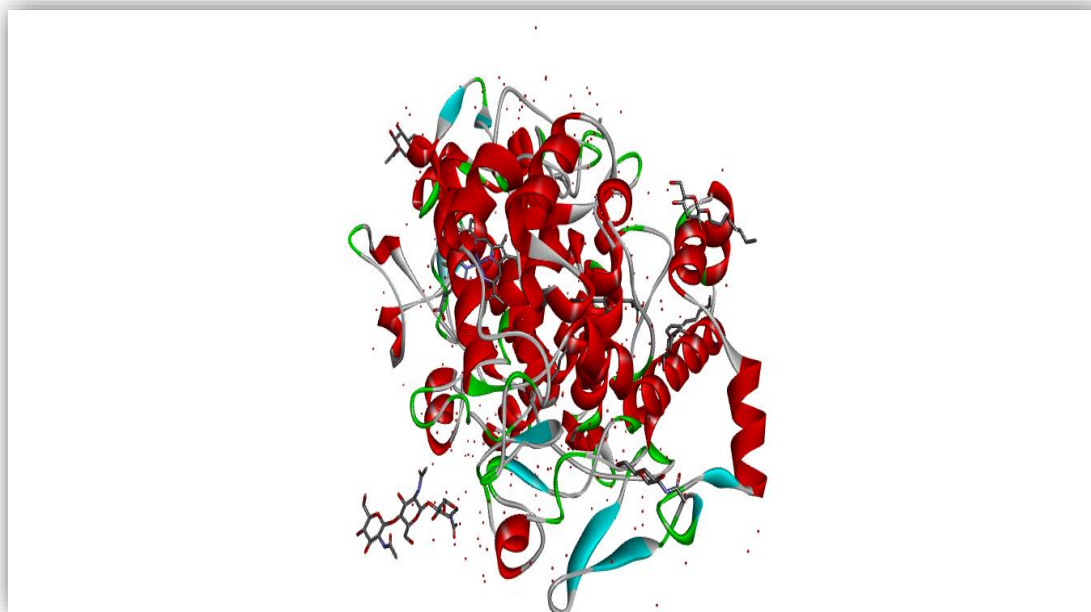
#### 4.1. Préparation des protéines

Les structures des protéines utilisées, ont été téléchargée sous forme PDB

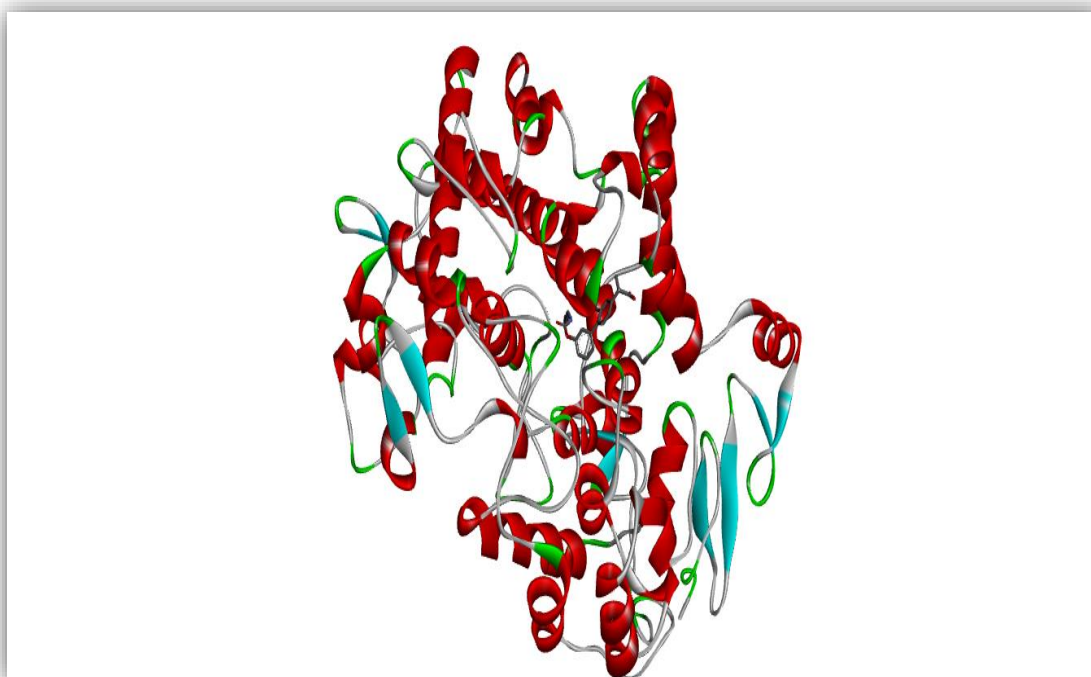
(**Figure III. 2**) à partir de la base de données Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

Leur préparation pour l'amarrage s'effectue comme suit :

- Elimination des molécules d'eau, des ligands de Co-cristallisation et des chaînes non favorables pour avoir un modèle simplifié de la protéine (**Figure III. 3**). Cette étape est réalisée par le logiciel Accelry Discovery Studio (version 4.0).
- Les atomes d'hydrogène sont rajoutés aux protéines et Les structures sont enregistrées en format PDBQT.



**Figure. III. 2 :** L'enzyme 5W58 non simplifié .



**Figure. III. 3 :** L'enzyme 5W58 simplifiée (une seule chaine) .

après, une boîte GRID (GRID BOX) a été créée afin de définir l'espace de recherche conformationnel du ligand à docké. les résultats sont mentionnés dans le (**Tableau III.1.**)

**Tableau III.1** : La boîte GRID BOX des enzymes

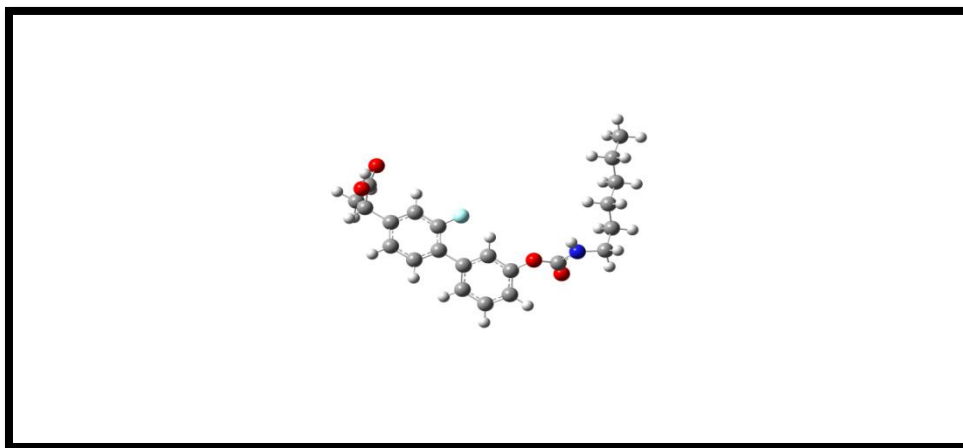
| Récepteur   | Centre X (Å°) | Centres Y (Å°) | Centre Z (Å°) | Dimensions (Å <sup>3</sup> ) |
|-------------|---------------|----------------|---------------|------------------------------|
| <b>5W58</b> | 5.028         | -21.556        | -72.361       | 28x28x28                     |
| <b>3PGH</b> | 26.859        | 23.16          | 15.580        | 20x20x20                     |
| <b>5IKV</b> | 165.098       | 185.097        | 192.066       | 24x24x24                     |
| <b>5F19</b> | -7.977        | 27.434         | 19.539        | 18x18x18                     |
| <b>1DIY</b> | 253.192       | 104.339        | -34.843       | 24x24x24                     |
| <b>3LJ7</b> | 12.994        | 42.578         | 5.846         | 18x18x18                     |
| <b>1MT5</b> | 75.685        | 26.366         | 2.945         | 28x28x28                     |

#### 4.2. Préparation du ligand

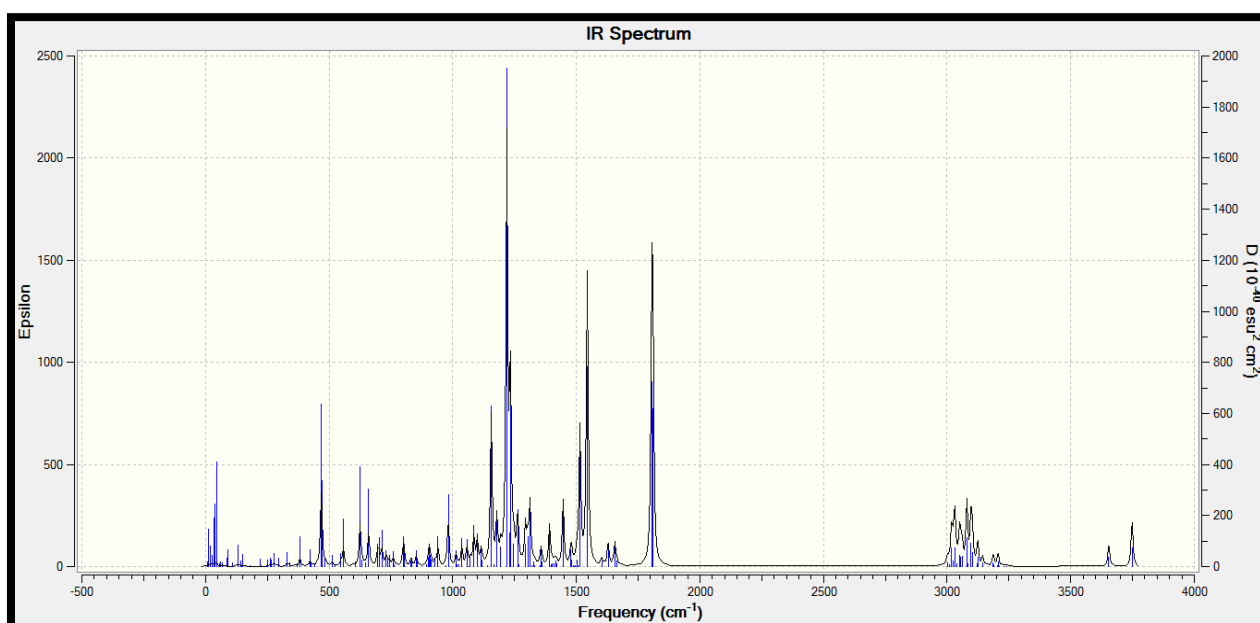
La structure de l'ARN2508 a été téléchargée via la chimiothèque Pubchem. Pour s'assurer des résultats fiables et reproductibles, l'optimisation de la géométrie du ligand est une étape essentielle avant le processus de docking. On a choisi la fonctionnelle d'échange-corrélation (B3LYP) (**B**ecke3-**L**ee-**Y**ang-**P**arr) implantée dans GAUSSIAN 09 avec des bases différentes [B3LYP/6-31++(d,p),B3LYP/6-31+ (d,p),B3LYP/6-31(d,p)]. D'après les résultats obtenus (**Tableau III. 2**), on constate que la meilleure géométrie optimisée est donnée par la base diffusée 6-31++ (d,p).

**Tableau III.2** : les valeurs d'énergie calculés .

| Méthode                   | Energie (u .a) |
|---------------------------|----------------|
| <b>B3LYP/6-31++ (d,p)</b> | -1309.63880188 |
| <b>B3LYP/6-31+ (d,p)</b>  | -1309.63825254 |
| <b>B3LYP/6-31(d,p)</b>    | -1309.58750541 |



**Figure III. 4** : la structure géométrique de ARN2508 optimisée par B3LYP\6-31++ (d, p) .



**Figure.III. 5** : Le spectre IR .

**Tableau III.3** : Interprétation du spectre IR .

| Liaison                           | C-O  | C-F  | C=C  | N-H  | C=O  | C-H  |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> ) | 1150 | 1200 | 1500 | 1600 | 1800 | 3100 |



## 5. Tests de fiabilité du programme de docking

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de diverses protéines par l'ARN2508, on a jugé utile d'évaluer tout d'abord la performance de l'Auto dock vina utilisé dans cette étude en faisant appel aux tests suivants :

- l'écart quadratique moyen ou le RMSD (*Root Mean Square Deviation*).
- L'analyse visuelle.

### 5.1. Test RMSD :

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 jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par le programme de docking. Un seuil maximal de 2Å est souvent utilisé pour discriminer une bonne d'une mauvaise position [3].

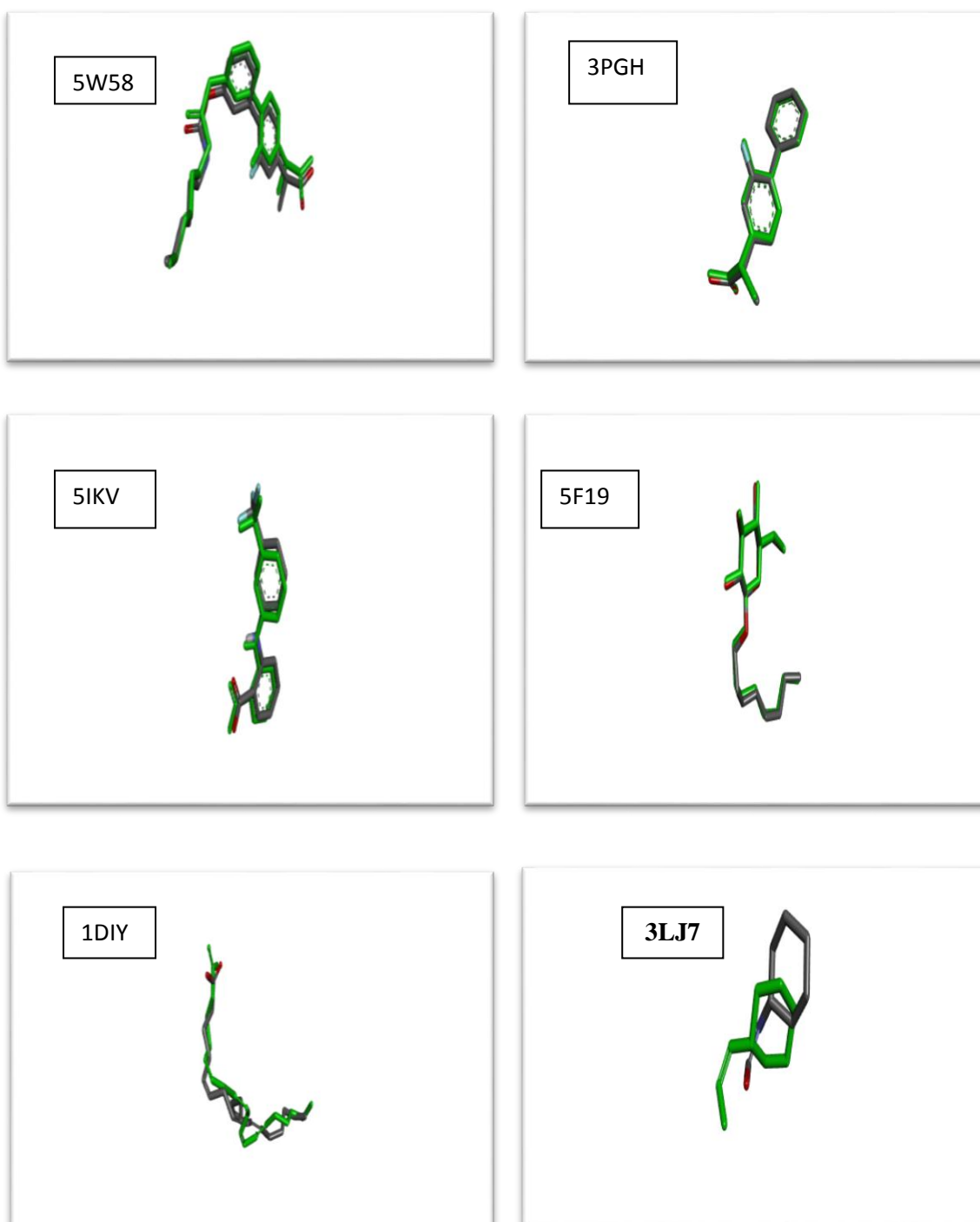
Dans notre cas, après avoir analysé dix poses pour chaque structure il en résulte que Vina a été capable de retrouver la pose cristallisée avec un bon RMSD voir **Tableau III.4**:

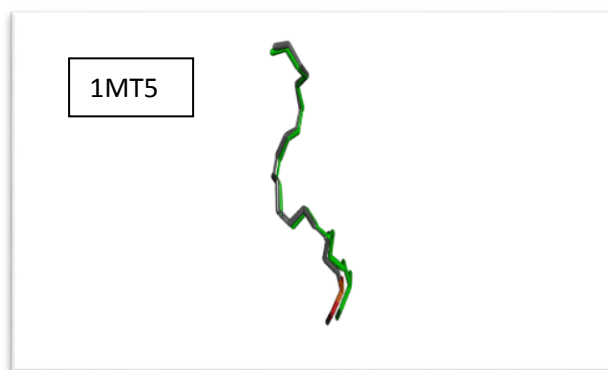
**Tableau III.4** : Calcul du RMSD .

| Code PDB | Code Ligands | RMSD (Å) |
|----------|--------------|----------|
| 5W58     | FF8          | 0.54     |
| 3PGH     | FLP          | 0.19     |
| 5IKV     | FLF          | 0.46     |
| 5F19     | BOG          | 0.23     |
| 1DIY     | ACD          | 1.15     |
| 3LJ7     | OHO          | 2.10     |
| 1MT5     | MAY          | 0.52     |

## 5.2. L'analyse visuelle

L'analyse visuelle est une étape essentielle pour confirmer les résultats du test par RMSD. Elle permet de montrer si la pose simulée d'un ligand se superpose avec celle de référence. Dans notre cas, la **Figure. III.6** montre qu'on a une bonne superposition des poses simulées par Vina (colorées par types d'atomes) et celles du ligand naturel (colorées en verts). Ce test conforte davantage la conclusion tirée suite au test de fiabilité par RMSD et confirme la performance du logiciel choisi.





**Figure. III.6 :** Superposition de la conformation des ligands naturels (Colorés en verts) et celle simulée par Vina (colorés par type d'atome) .

### 5.3. Docking de l'ARN2508

Le docking réalisée par Autodock vina nous a permis d'évaluer le score d'affinité entre l'ARN2508 et les divers protéines (**Tableau III.5**). Ce score s'évaluant d'une protéine à l'autre ce qui est significativement corrélé à son activité inhibitrice dont l'IC50 égal à 0.031  $\mu$ M, 0.01  $\mu$ M et 0.43  $\mu$ M pour FAAH, COX-2 et COX-1 respectivement.

En raison des résultats obtenus dans le (**Tableau III.5**) nous remarquons que l'ARN2508 inhibe les COXS-2 d'une manière différente par exemple :

- Dans les deux protéines **5W58**, **3PGH** de nature muscle souris avec une énergie de scoring considérable (-7.8 Kcal/mol, -9.0Kcal/mol), comme pour les protéines humaines **5IKV**, **5F19** l'énergie est moins para port a les autre protéines (-5.5Kcal/mol,-7.3Kcal/mol).
- Et avec une faible inhibition des COXS-1 **1DIY** (-5.0Kcal/mol).
- Enfin on rapporte la liaison d'ARN2508 à FAAH qui a renvoyé une énergie d'interaction favorable et un score d'amarrage favorable **3LJ7**, **1MT5** (-8.6Kcal/mol, -8.8Kcal/mol)

Les résultats obtenues montres que l'inhibiteur ARN2508 est plus sélective avec COX-2 et FAAH et qui est équivalentes avec les résultats expérimentale.

**Tableau III.5** : Résultats de docking moléculaire :

ARN2508-COXS .

| Composés | Score<br>(Kcal/mol) |
|----------|---------------------|
| 5W58     | -7.8                |
| 3PGH     | -9.0                |
| 5IKV     | -5.5                |
| 5F19     | -7.3                |
| 1DIY     | -5.0                |
| 3LJ7     | -8.6                |
| 1MT5     | -8.8                |

### 6-Interaction de ligand - protéines :

Le docking moléculaire permet l'analyse des liaisons non covalentes formées entre

Ligand – protéines. Les types d'interactions formées sont déduits de l'exploitation des données fournies par le logiciel Discovery : liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes et électrostatiques

Les résultats sont mentionnés dans le (**Tableau III.7**)

**Tableau III.6** : Les différentes interactions ARN2508-Protéines .

|                          | COX-1  | COX-2  |   |   |                                      | FAAH   |  |
|--------------------------|--|--|---|---|--------------------------------------|--|--|
| Code du PDB              | 1DIY   | 5W58   | 3PGH  | 5IKV  | 5F19                                 | 3LJ7   | 1MT5   |
| Résidus du site d'actifs |  |  |   |   |                                      |  |  |
| Liaison H                | HIS386<br>2.22 Å<br>2.38 Å<br>GLN203<br>2.95 Å | GLY526<br>1.85 Å<br>SER530<br>2.40 Å<br>ARG120<br>2.33 Å | GLY526<br>2.54 Å<br>3.03 Å<br>ARG120<br>2.05 Å  | GLY526<br>1.87 Å<br>3.01 Å<br>VAL523<br>2.69 Å                              | GLU484<br>3.08 Å                     | PHE388<br>2.98 Å<br>MET191<br>2.02 Å<br>ILE238<br>2.60 Å<br>SER241<br>2.92 Å | LEU372<br>2.14 Å<br>SER376<br>2.88 Å<br>2.78 Å<br>ALA377<br>3.05 Å<br>GLU239<br>2.53 Å<br>ILE238<br>2.81 Å |
| Liaison hydrophobe       | PHE210<br>HIS386<br>HIS388<br>HIS446<br>VAL447 | VAL349<br>VAL523<br>LEU352<br>LEU359                     | VAL116<br>VAL349<br>VAL523<br>LEU93<br>LEU352<br>LEU359<br>ALA527<br>PHE357<br>TYR355 | VAL116<br>VAL349<br>VAL523<br>PRO86<br>TYR355<br>ALA527<br>LEU352<br>LEU359 | ARG185<br>LYS186<br>LEU183<br>ARG185 | MET191<br>LEU278<br>LEU380<br>PHE192<br>VAL270<br>VAL491<br>ILE238           | ALA377<br>ALA431<br>LEU192<br>LEU380<br>ILE491   |
| Liaison électrostatique  | HIS386   | -  | -   | -   | -                                    | -  | -  |

**Tableau III.7** : Les différentes interactions ligand naturel-Protéines .

|                          | COX-1  | COX-2  |        |        |               | FAAH   |        |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| Code du PDB              | 1DIY   | 5W58   | 3PGH   | 5IKV   | 5F19          | 3LJ7   | 1MT5   |
| Résidus du site d'actifs |        |        |        |        |               |        |        |
| Liaison H                | ARG120 | TYR355 | TYR355 | TYR385 | GLU490        | SER193 | ILE238 |
|                          | 2.36 Å | 2.57 Å | 3.09 Å | 1.87 Å | 3.36 Å        | 3.09 Å | 2.38 Å |
|                          | TYR355 | SER530 | 2.96 Å | SER530 | ARG438        | GLY239 | SER217 |
|                          | 3.09 Å | 2.62 Å | ARG120 | 1.92 Å | 2.95 Å        | 2.89 Å | 2.97 Å |
|                          |        | 3.54 Å | 3.06 Å | ARG185 | GLY240        |        | GLY239 |
|                          |        | ARG120 | 3.11 Å | 2.63 Å | 3.26 Å        |        | 2.77 Å |
|                          |        | 3.25 Å |        | 2.92 Å | ILE238 3.15 Å |        |        |
| Liaison hydrophobe       | PHE381 | VAL349 | VAL116 | VAL116 | ARG185        | PHE192 | ILE238 |
|                          | LEU377 | VAL523 | VAL349 | VAL349 |               |        | MET191 |
|                          | PHE209 | PHE209 | ALA527 | VAL523 |               |        | TYR531 |
|                          | ARG120 | ILE352 | LEU359 | LEU531 |               |        | PHE432 |
|                          |        | ILE377 | LEU352 | LEU352 |               |        |        |
|                          |        | ILE359 | LEU531 | LEU359 |               |        |        |
|                          |        | TYR355 |        | ALA527 |               |        |        |
| Liaison électrostatique  | ARG120 | ARG120 | -      | -      | -             | -      | -      |

D'après les (**Tableau III.6**, **Tableau III.7**), on fait une comparaison entre les résidus qui sont en commun avec le ligand naturel et le ligand synthétisée ont obtient :

- **5W58** : (ARG120, SER530, VAL349, VAL523)
- **3PGH** : (ARG120, VAL116, VAL349, LEU352, LEU359, LEU531)
- **5IKV** : (VAL116, VAL349, VAL523, LEU352, LEU359, ALA527)

- **5F19** : (ARG185)
- **3LJ7** : (ILE238, PHE192)
- **1MT5** : (ILE238, GLU239)

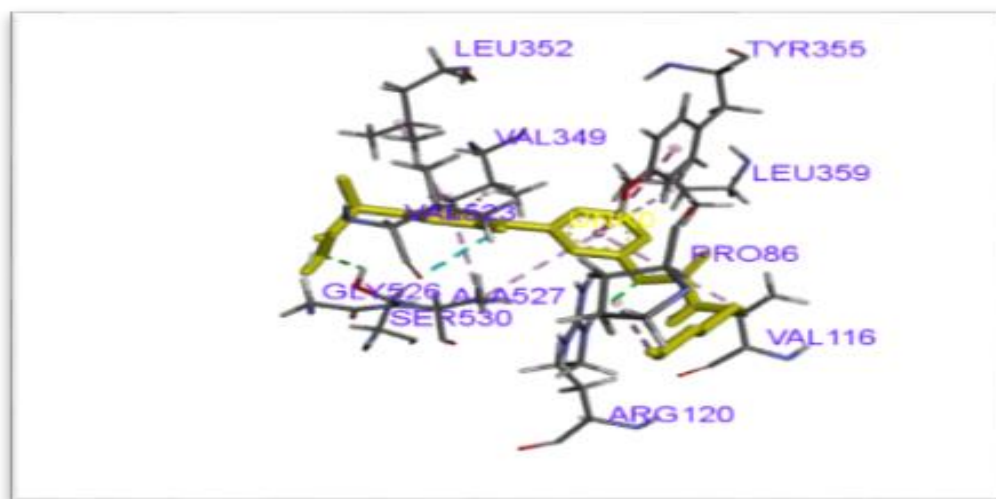
Après la comparaison on trouve que la majorité des protéines possèdent des résidus communs entre le ligand naturel et nos inhibiteurs qui montrent que l'inhibiteur ARN2508 pénètrent entièrement dans le site actif.

### 6.1. Analyse visuelle :

Pour confirmer nos résultats nous avons représenté dans les figures suivantes les différentes interactions entre les protéines du site actif de l'inhibiteur. Les liaisons hydrogènes en ligne discontinues de couleur verte, les interactions hydrophobiques en violet, les interactions électrostatiques en marron.

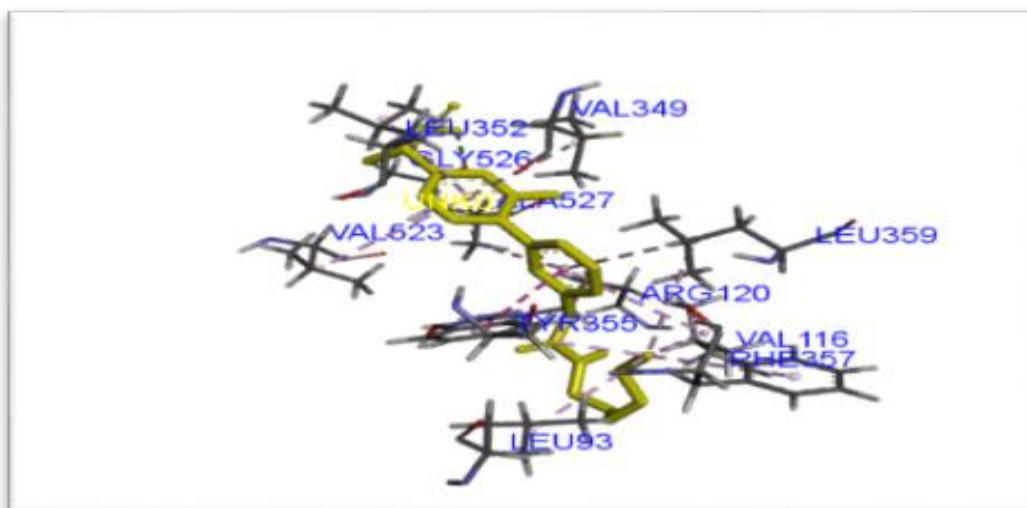
Ces résultats s'expriment visuellement montres des interactions entre l'enzyme et l'inhibiteur (principalement de nature hydrophobe et hydrogène).

On observe quelque protéines qui fait des meilleures interactions sont :



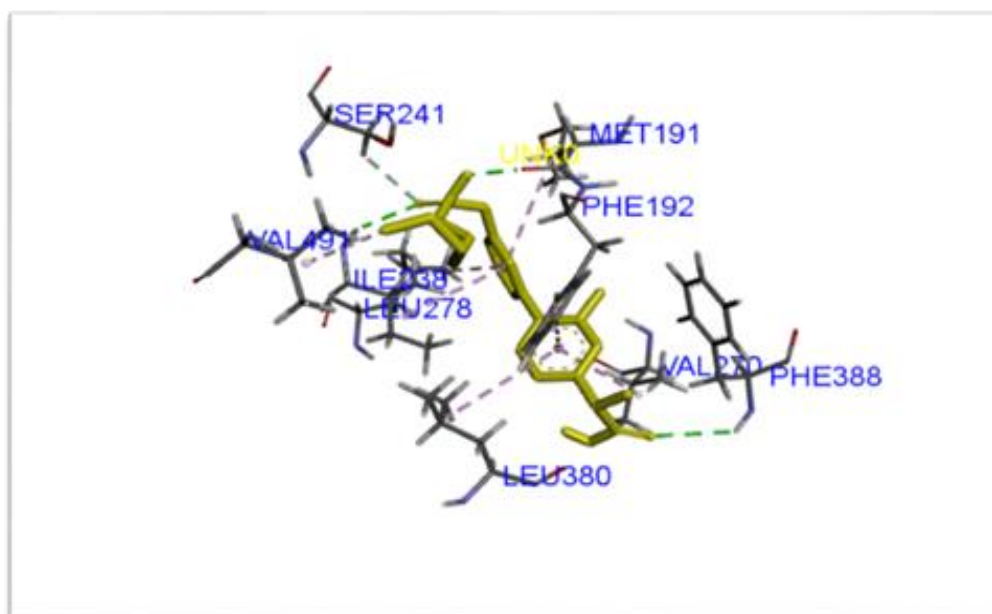
**Figure. III.7** : Les différentes interactions ARN2508-5W58 .

Le composé **5W58** : présentes trois interactions de liaisons hydrogène avec GLY526 de distance 1.85 Å, SER530 (d=2.40 Å) ARG120 (d=2.33 Å), et des interactions hydrophobes VAL349, VAL523, LEU352, LEU359.



**Figure III.8 :** Les différentes interactions ARN2508-3PGH .

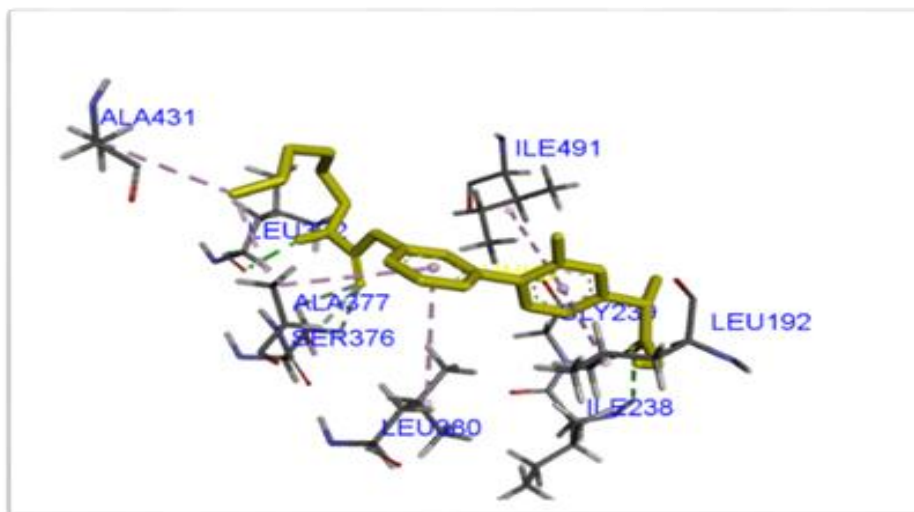
- Le composé **3PGH** : interactions de liaisons hydrogène GLY526 (  $d=3.03 \text{ \AA}$  et  $2.54 \text{ \AA}$ ), ARG120(  $d=2.05 \text{ \AA}$ ), et des interactions hydrophobes VAL116, VAL349, VAL523, LEU93, LEU352, LEU359, ALA527, PHE357, TYR355.



**Figure III.9 :** Les différentes interactions ARN2508-3LJ7 .

- Le composé **3LJ7** : interactions de liaisons hydrogène PHE388 (  $d=2.98 \text{ \AA}$ ), MET191 (  $d=2.02 \text{ \AA}$ ), ILE238 (  $d=2.60 \text{ \AA}$ ), SER241 (  $d=2.92 \text{ \AA}$ ) et des interactions hydrophobes MET191, LEU278, LEU380, PHE192, VAL270, VAL491, ILE238.





**Figure III.10** : Les différentes interactions ARN2508-1MT5 .

- Le composé **1MT5** : interactions de liaisons hydrogène LEU372 ( $d=2.14 \text{ \AA}$ ), SER376 ( $d=2.88 \text{ \AA}$  et  $2.78 \text{ \AA}$ ), ALA377 ( $d=3.05 \text{ \AA}$ ), GLU239 ( $d=2.53 \text{ \AA}$ ), ILE238 ( $d=2.81 \text{ \AA}$ ) et des interactions hydrophobes ALA377, ALA431, LEU192, LEU380, ILE491.

Les interactions de chaque composé avec les résidus fonctionnels d'ARN2508 ont démontré que le ligand interagit avec la plupart des résidus dans la poche de liaison comme le montre dans les Figure précédant.

## Référence bibliographique :

[1] : Proc. Natl. Acad Sci. usa., 2018 ., Fonction et dynamique des arn non codants

[2] : J Pharmacol Exp Ther. ,2011., Fatty acid amide hydrolase (faah) inhibition reduces L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced hyperactivity in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned non-human primate model of parkinson's disease.

[3] : Protein data bank (pdb) ., 25-04-2018., Biological macromolecular resource. [En ligne] <http://www.pdb.org/pdb/home>. consulté.

[4] : Centre national de la recherche scientifique. pubchem. [en ligne]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. 02-05-2018.

## Conclusion générale

La découverte des deux isoenzyme de la cyclooxygénase constitue une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes d'action des AINS. L'inhibition de la cyclooxygénase-1, forme constitutive est plutôt responsable de leurs effets indésirables gastriques alors que leurs propriétés anti-inflammatoires et analgésiques sont obtenues grâce à l'inhibition de la cyclooxygénase-2, forme inducible. Cette notion de sélectivité pour les isoenzymes de la cyclooxygénase-2 conduit au développement des inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase-2. l'ARN2508, une nouvelle classe d'agents à activité systémique qui inhibent simultanément les FAAH, COX-1 et COX-2 avec une puissance et une sélectivité élevées.

Nous avons utilisé le docking moléculaire pour déchiffrer le mécanisme de liaison de l'ARN2508 au niveau de la cible du FAAH, COX-1 et COX-2 pour cela nous avons utilisé le logiciel Aoutodock-vina, un logiciel d'amarrage moléculaire très répandu et connu par sa fiabilité et son performance.

Au préalable, nous avons testé la performance du programme utilisé dans cette étude au moyen de deux critères différents. Le premier test consiste à calculer le RMSD entre la meilleure conformation du ligand à docker et celle déterminée expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB. Les calculs ont donné un RMSD parfaitement dans les normes (inférieur à 2 Å).

L'analyse visuelle faisant suite au test par RMSD confirme davantage la fiabilité du programme en montrant de bonnes superpositions des modèles des ligands simulés et expérimentaux.

Les résultats du docking moléculaire montrent que les enzymes : 5W58, 3PGH, 3LJ7, 1MT5 dont le score égal à -7.8Kcal/mol, -9.0Kcal/mol, -8.6Kcal/mol, -8.8Kcal/mol, respectivement, sont les plus sélectives envers l'ARN2508.

La visualisation des interactions des complexes ARN2508@enzymes montre un bon positionnement et une meilleure sélectivité au sein de la cavité des COX-2 et de FAAH, ce qui est en bon accord avec les résultats expérimentaux. Les liaisons sont de nature hydrophobe, hydrogène et électrostatique.



## Annexe

| <b>Code Ligands</b> | <b>Structure semi-développée</b> | <b>nomenclature</b>  |
|---------------------|----------------------------------|--|
| <b>FF8</b>          | $C_{22}H_{26}FNO_4$              | (Acide 2- [3-fluoro-4- [3- (hexyl carbamoyloxy) phényl] phényl] propanoïque) |
| <b>FLP</b>          | $C_8H_{15}NO_6$                  | ACIDE AMINOCARBOXYLIQUE<br>CYCLOHEXANE                                       |
| <b>FLF</b>          | $C_{14}H_{10}F_3NO_2$            | ACIDE 2 - [[3- (TRIFLUOROMÉTHYL)<br>PHÉNYL] AMINO] BENZOÏQUE                 |
| <b>BOG</b>          | $C_{14}H_{28}O_6$                | B-OCTYLGLUCOSIDE   |
| <b>ACD</b>          | $C_{20}H_{32}O_2$                | Acide arachidonique  |
| <b>OHO</b>          | $C_7H_{13}NO_2$                  | ACIDE AMINOCARBOXYLIQUE<br>CYCLOHEXANE                                       |
| <b>MAY</b>          | $C_{21}H_{36}FO_2P$              | FLUOROPHOSPHONATE DE<br>METHYLARACHIDONYLE                                   |