

N° d'ordre : 21/2013-M/CH

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene
Faculté de CHIMIE



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

En CHIMIE

Spécialité : Chimie Physique et Théorique

Par : BOUKERCHE Oumessaad

Sujet

« Analyse par modélisation moléculaire des modes de reconnaissance d'une série d'anti-inflammatoires non stéroïdiens ».

Soutenu publiquement le 24 / 02 / 2013 devant la commission d'examen composée de :

M. C. CHELGHOUM	Professeur à l'USTHB	Président
Mme. S. KELLOU-TAIRI	Professeur à l'USTHB	Directrice de mémoire
M. M. MOUZALI	Professeur à l'USTHB	Examineur
Mme. B. DJERDJOURI	Professeur à l'USTHB	Examinatrice
M. H. MEGHEZZI	Professeur à l'USTHB	Examineur

Remerciements

*Ce travail a été effectué au Laboratoire de Physico-chimie Théorique et Chimie Informatique de la faculté de chimie de l'USTHB, sous la direction scientifique de Madame **Safia TAIRI-KELLOU**, Professeur à l'USTHB.*

*Je remercie Monsieur le Professeur **Boubekur MAOUCHE**, Directeur du laboratoire de Physico-chimie Théorique et Chimie Informatique, pour son accueil au sein du laboratoire et ses encouragements.*

*J'exprime ma sincère gratitude à Monsieur le Professeur **Chaabane CHELGHOUM**, Chef du département de chimie physique et théorique, pour ses encouragements et ses précieux conseils. Je le remercie infiniment pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury.*

*Je remercie chaleureusement Madame **Safia TAIRI-KELLOU** pour m'avoir permis d'intégrer son équipe de recherches. Je lui exprime ma reconnaissance pour m'avoir initiée à la recherche dans un cadre studieux, pour m'avoir proposé un sujet de recherche aussi passionnant et pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir la modélisation moléculaire. Son soutien constant, son esprit critique, la confiance qu'elle m'a accordée, ses conseils de tout ordre, sa disponibilité et sa rigueur scientifique ont été pour moi des catalyseurs pour faire avancer mes travaux de recherche, de manière rationnelle.*

*Je remercie profondément Monsieur **Mohamed MOUZALI**, professeur à la faculté de chimie de l'USTHB, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'apporter la critique d'organicien. Je suis particulièrement ravie par cet honneur.*

*J'exprime mes remerciements respectueux à Madame **Bahia DJERDJOURI**, Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger ce travail.*

*Mes vifs remerciements vont également à Monsieur **Hacène MEGHEZZI**, professeur à la faculté de chimie de l'USTHB, pour avoir accepté sans hésiter d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et mon profond respect.*

Que tous les membres du jury trouvent ici mes sincères remerciements pour tous les commentaires qu'ils ont à formuler.

Je tiens à remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire de Physico-chimie Théorique et Chimie Informatique et plus particulièrement, Samira, Djamila, Zohra, Souhila, Meryem, Mya, Ibtissem, Wassila et Soror pour leur sincère sympathie et leur soutien.

Je voudrais aussi remercier mes parents pour m'avoir donné les moyens de réussir, de m'avoir encouragée et avoir cru en moi, ma sœur Hadjer, mes frères et ma tante Wahiba source intarissable de réconfort et de joies. Mes beaux-parents et Nassim pour le soutien constant et l'affection qu'ils m'ont toujours témoignée. J'ai aussi une pensée émue pour ma tante Nawel qui m'a toujours encouragée et qui serait probablement fière de moi, à Samir et Younes. Merci aussi à mon époux Djallel pour ton soutien de tous les jours et ton aide dans les moments difficiles, pour ta gentillesse, ta patience et tellement plus

Je vous dédie à tous ce travail.

Sommaire

ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE

CHAPITRE I : L'INFLAMMATION, SES ACTEURS ET SES INHIBITEURS

- I- PROCESSUS INFLAMMATOIRE
- II- METABOLISME DES PROSTANOÏDES
 - 1 - Cascade de l'acide arachidonique
 - 2- Synthèse des prostanoïdes
 - 3- Rôles des prostanoïdes
- III- LA CYCLO-OXYGENASE : EXPRESSION ET LOCALISATION
 - 1-Les deux isoformes de la COX
 - 2- Site actif
- IV- LES INHIBITEURS DE LA COX
 - 1-Mode d'action
 - a- Les inhibiteurs compétitifs réversibles COX-1 et COX-2
 - b- Les inhibiteurs irréversibles COX-1 et COX-2
 - c- Les inhibiteurs compétitifs réversibles dont l'action est liée à la capture des radicaux libres
 - 2-Classification des AINS
 - a- Classification chimique
 - b- Classification sélective
 - b-1- Les inhibiteurs préférentiels de COX-1
 - b-2- Les inhibiteurs préférentiels de COX-2
 - b-3- Les inhibiteurs non sélectifs de COX-2
 - b-4- Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 :
 - 3- Effets secondaires
 - a- Inhibiteurs classiques ou non sélectifs COX-2
 - b- Inhibiteurs sélectifs COX-2 ou Coxibs
 - 4 -Structures et activités de quelques inhibiteurs potentiels
- V - CONCLUSION

CHAPITRE II : METHODES, MATERIEL ET METHODOLOGIE

I- INTRODUCTION

II- METHODES THEORIQUES

- 1- Mécanique Quantique
- 2- Mécanique Moléculaire
 - a- Principes
 - b- Fonction énergie potentielle ou champ de forces
 - c- Méthodes d'exploration de l'hypersurface d'un système moléculaire
 - c-1- Algorithmes de minimisation
 - c-2- Rotation des angles de torsion

III- TECHNIQUES DE DRUG DESIGN

- 1- Approche ligand-based
- 2- Approche receptor-based
- 3- Les différents types de docking
 - a- Le docking rigide
 - b- Le docking semi-flexible
 - c- Le docking flexible
- 4- Algorithme Génétique Lamarckien (AGL)

IV - MATERIAUX UTILISES

- 1- Molécules étudiées
- 2 - Cibles utilisées
- 3- Logiciels utilisés
 - a- ISIS Draw
 - b- ChemOffice
 - c- AutoDock

V – METHODOLOGIE UTILISEE

- 1- Préparation des fichiers
 - a- les protéines
 - b- Les ligands
 - c- Paramètres de calcul
 - c-1- Autogrid
 - c-2- Autodock

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I- INTRODUCTION

II- PROTOCOLE DE VALIDATION DE DOCKING

- 1- Structures des ligands et protéines étudiés
 - a- Protéines
 - b- Ligands
- 2- Sélection de la conformation dite bioactive ou viable
- 3- Validation des paramètres de docking
- 4- Les Sites actifs

III- MODE DE LIAISON DES COMPOSES ETUDIES

- 1- Mode de liaison des anti-inflammatoires préférentiels COX-1
 - a- Le Flurbiprofène
 - b- L'Ibuprofène
 - c- Le Kétoprofène
 - d- Le Piroxicam
 - e- Le Tenoxicom
 - f- Le Sulindac sulfide
- 2- Mode de liaison des anti-inflammatoires préférentiels COX-2
 - a- L-748
 - b- L-780
 - c- Le Diclofénac
- 3- Mode de liaison des anti-inflammatoires sélectifs COX-2
 - a- Le Célecoxib
 - b- L'Etoricoxib
 - c- Le Rofécoxib
 - d- Le Lumiracoxib
- 4- Docking de molécules naturelles
 - a- Curcumine
 - b- Pipérine
 - c- Berbérine

IV- CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Abréviations

AA : Acide Arachidonique
ADT : AutodockTools
AG : Algorithmes Génétiques
AGL : Algorithme Génétique Lamarckien
AINS : Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
CNDO: Complete Neglect of Differential Overlap
CoMFA: Comparative Molecular Field Approach
COX: Cyclooxygénase
COX-1: Cyclooxygénase-1
COX-2: Cyclooxygénase-2
DFT: Density Functional Theory
HF : Hartree-Fock
IC₅₀ : Concentration nécessaire à inhiber de 50% l'activité, dans un système *in vitro*
kDa : kilodalton
LGA : Algorithme Génétique Lamarckien
MM : Mécanique Moléculaire
PDB : Protein Data Bank
PGD₂ : Prostaglandine D2
PGE₂: Prostaglandine E2
PGF₂ : ProstaglandineF2
PGG₂ : ProstaglandineG2
PGH₂ : Prostaglandine H2
PGHS : Prostaglandine H Synthase.
PGI₂ : Prostacycline
PGs : Prostaglandines
PLA₂: Phospholipase A₂
P1: Poche 1
P2: Poche 2
P3: Poche 3
QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships
LOX: Lipoxygénase
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD: Root Mean Square Deviation
RX: Rayons X
TXA₂: Thromboxane A2
TXB₂: Thromboxane B2
μM : Micromole

INTRODUCTION GENERALE

Le contexte de la recherche en chimie théorique s'est beaucoup transformé au cours de cette dernière décennie. En effet, l'accroissement considérable de la puissance des moyens de calcul a permis l'avènement de «*Quantomètres*» standard mettant à portée de l'utilisateur les méthodes théoriques les plus avancées. Ces méthodes sont issues de la Mécanique Quantique des systèmes moléculaires (Hartree-Fock-Roothan tenant compte ou non de la corrélation électronique et effets relativistes, DFT, Méthodes semi-empiriques etc.) et de la Mécanique Classique Moléculaire offrant actuellement la possibilité de tenir compte de l'environnement. Par ailleurs, l'augmentation quasi exponentielle de la mémoire disponible, le développement des différents axes de la biologie et l'évolution des différentes techniques de résolution des structures de systèmes biologiques ont permis la constitution de banques de données (Protein Data Bank, RMN etc.) facilitant l'accès aux informations expérimentales.

La modélisation moléculaire regroupe l'ensemble des techniques de visualisation des molécules, de détermination des conformations de ces dernières ainsi que de la simulation de leur comportement. Les outils de ces techniques sont assez performants pour permettre l'étude au niveau atomique des interactions entre deux entités moléculaires.

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Par conséquent, comprendre le mode d'interaction impliqué dans le processus biologique et définir les résidus mis en jeu représentent une étape primordiale pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les entités moléculaires concernées. De nos jours, la découverte de nouvelles molécules inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'au moyen d'une prédiction de leur affinité mutuelle. C'est dans ce contexte que des techniques de modélisation moléculaire, regroupées sous le nom de "arrimage" ou "docking" moléculaire ont été développées.

Le docking moléculaire, qui est une technique *in silico*, vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire ligand/récepteur à partir des molécules isolées. Cette technique, pouvant être quelque fois difficile à mettre en œuvre pour un novice, peut cependant représenter un bon investissement pour un chercheur non théoricien, dans le sens où elle lui permet d'épargner le coût d'une expérimentation *in vitro* 'aveugle'.

Les logiciels de docking sont des outils très utiles en chimie, biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligand) qui interagissent avec une

cible biologique d'intérêt thérapeutique, pouvant être protéique, lipidique ou nucléique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme biologique dans lequel cette cible est impliquée.

Le mécanisme biologique auquel nous nous intéressons dans ce travail est **l'inflammation** qui représente une réponse de l'organisme à toute agression, endogène ou exogène, le menaçant.

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que des médiateurs cellulaires, appelés 'prostaglandines', sont produits dans les sites inflammés après dégradation d'un phospholipide membranaire : l'acide arachidonique (AA), par l'enzyme : cyclooxygénase (COX) [1,2]. Cette enzyme existe sous deux formes structurales, notées : COX-1 et COX-2. La première, essentiellement constitutive, est liée à l'homéostasie de l'organisme alors que la COX-2, essentiellement induite par des cytokines pro-inflammatoires, est liée aux désagréments de l'inflammation [3]. Ces enzymes sont inhibées par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) médicaments largement prescrits dans le monde en raison de leurs propriétés analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Les AINS sont généralement classés selon leur affinité pour l'une ou l'autre COX.

Les objectifs principaux des travaux, présentés dans ce manuscrit, consistent à apporter une contribution à une meilleure compréhension de la sélectivité COX-1 ou COX-2 de quelques AINS potentiels. Ainsi, nous avons entrepris une étude par docking moléculaire des modes de reconnaissance des sites actifs respectifs de la COX.

Dans un premier temps, nous avons analysé les modes d'interaction ligand/récepteur d'une série d'AINS dont les activités sur COX-1 et sur COX-2 sont quantitativement connues [4]. Ensuite, dans le but de discriminer trois molécules naturelles, dont l'activité anti-inflammatoire est qualitativement connue, par rapport à leur sélectivité sur l'une ou l'autre COX, nous avons effectué une étude de docking sur les deux cibles de la COX [5].

Après cette introduction générale positionnant le contexte de la problématique abordée et donnant le but du travail, ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres suivis d'une conclusion générale et 3 annexes.

Dans le premier chapitre, nous présentons les résultats de notre recherche bibliographique concernant l'état actuel des connaissances relatives au mécanisme catalytique et à l'inhibition de la pathologie considérée dans ce travail.

Nous décrivons brièvement dans le chapitre II, les deux types de méthodes de la chimie théorique ainsi que celles du drug design. Nous y avons également présenté les différents

logiciels que nous avons utilisés dans nos travaux de simulation, ainsi que les différents matériaux utilisés dans l'étude, à savoir les ligands et les cibles de l'inflammation.

Le chapitre III est consacré à la présentation et à la discussion des résultats obtenus.

La conclusion générale porte sur les principaux apports de nos travaux. En essayant ensuite de cerner les limites et les insuffisances des modèles obtenus, à l'issue du docking, nous dégageons quelques perspectives ouvertes par nos travaux. Nous terminons notre manuscrit par trois annexes apportant des éclaircissements à certains points abordés dans ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Williams TJ., Peck MJ. *Nature*; **1977**, 270 : 530 – 532.
- 2- Caughey GE., Cleland LG., Penglis PS., Gamble JR., James MJ. *Jimmunol*; **2001**, 167:2831- 8.
- 3- Meade EA., Smith WL., DeWitt DL. *The Journal Biological Chemistry*; **1993**, 268: 6610-6614.
- 4 - Oumessaad Boukerche, Safia Taïri-Kellou *Marseille, France*, 1 – 5 Juillet **2012**.
- 5-** Zohra Bouakouk, Samira Feddal, Oumessaad Boukerche, Safia Taïri-Kellou, **2^{ème} RIC2**, *Marrakech, Maroc*, 8 - 9 Octobre **2012**.

CHAPITRE I

*L'inflammation, ses acteurs et
ses inhibiteurs*

I- PROCESSUS INFLAMMATOIRE

L'inflammation est un terme générique désignant diverses réactions de défense à une agression tissulaire, d'origine interne ou externe, nuisant au bon fonctionnement de l'organisme.

Classiquement l'inflammation se manifeste par quatre signes principaux : rougeur, chaleur, tuméfaction et douleur. Elle peut révéler de nombreuses causes, pouvant être : infectieuses, immunologiques, tumorales, traumatisme physique, traumatisme chimique ou nécrose tissulaire. L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif et a pour but de réparer les effets de l'agression. La réparation et la cicatrisation en constitue le stade ultime. Il faut noter que dans ces cas l'inflammation est bénéfique.

Lorsque l'inflammation est trop importante, pour régresser spontanément, les conséquences peuvent être très dommageables ; ce qui nécessite son blocage.

Il est reconnu que le processus inflammatoire implique la production et la participation de médiateurs biologiques, appelés prostanoïdes [1]. Ces médiateurs sont générés suite à un mécanisme catalytique que nous décrivons ci-dessous.

II- METABOLISME DES PROSTANOÏDES

La première étape de la synthèse des prostanoïdes est la libération de l'acide arachidonique (AA) (Fig.1).



Figure 1 : Structure de l'acide arachidonique

1 - Cascade de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est un dérivé d'acide gras insaturé à 20 atomes de carbone. Il est sécrété à partir d'un phospholipide membranaire et sous l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂), une enzyme membranaire, suite à un *stimulus* physiologique ou pro-inflammatoire.

L'AA, libéré, peut être métabolisé principalement par deux voies enzymatiques [2] (Fig.2):

- ✓ La lipoxygénase (LOX) conduisant à la formation de leucotriènes et d'autres acides mono, di ou tri-hydroxylés.
- ✓ La cyclooxygénase (COX) conduisant à la formation de prostanoides constitués par : les prostaglandines, une thromboxane et une prostacycline [2].

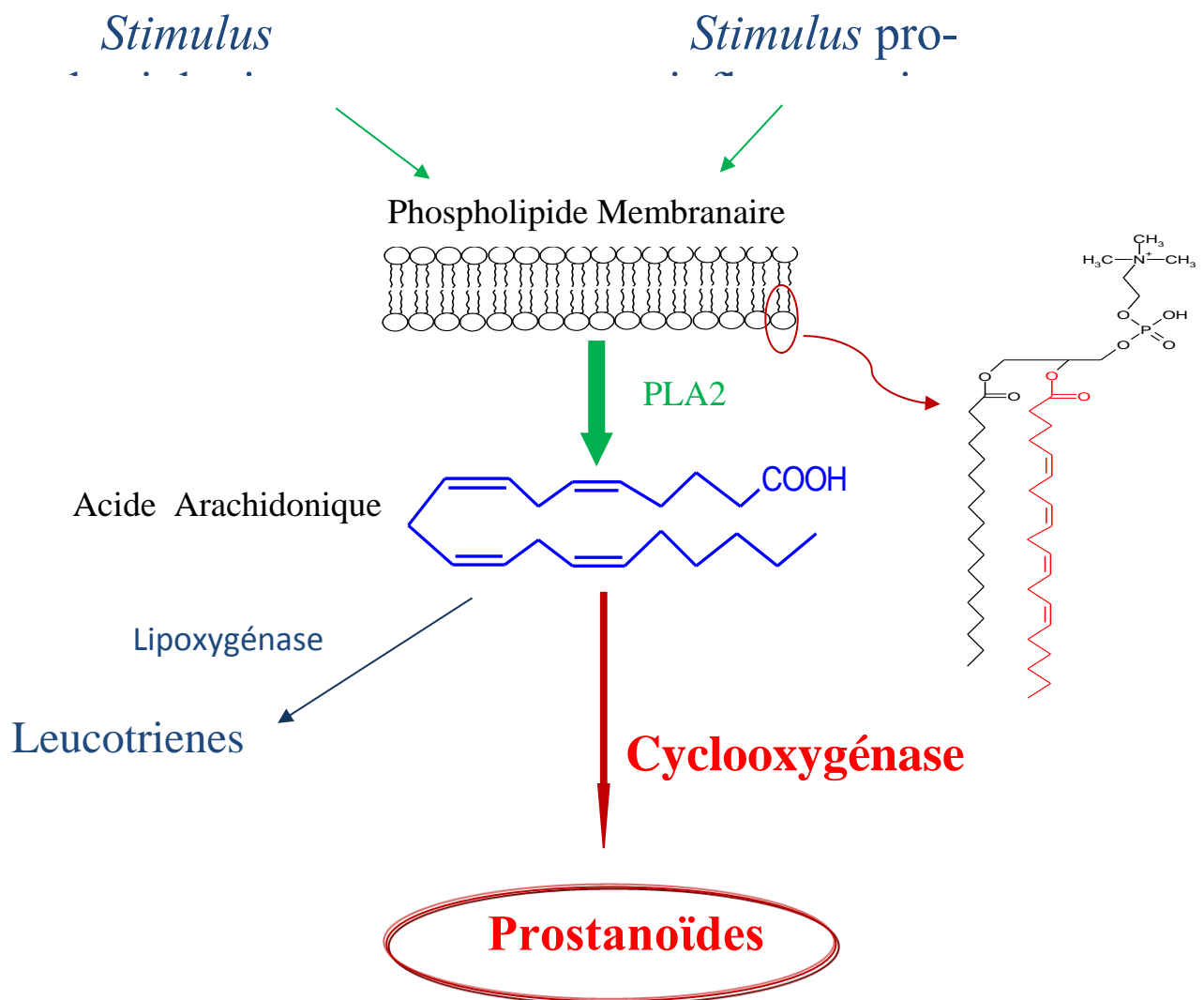


Figure 2 : Cascade catalytique de l'acide arachidonique

2- Synthèse des prostanoïdes

La prostaglandine endoperoxyde H synthétase (PGHS) est nommée cyclooxygénase, à cause de sa première fonction catalytique (Fig.3). La COX est une enzyme bifonctionnelle contenant un groupe 'hème' qui catalyse les deux premières étapes engagées dans la voie menant à la formation des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique. Ces 2 étapes consistent d'une part, en une addition de 2 molécules d'oxygène sur l'acide arachidonique et une cyclisation pour former l'hydroperoxyde cyclique PGG₂, dite *activité cyclooxygénase* et, d'autre part, en une réduction de la PGG₂ en PGH₂, dite *activité peroxydase* [3] (Fig.3).

La PGH₂ représente le précurseur de tous les prostanoïdes issus de la voie de la PGHS. Cette molécule va donner naissance à plusieurs médiateurs cellulaires et qui sont :

- ✓ les prostaglandines (PGD₂, PGF₂ et PGE₂) sous l'action de différentes isomérases.
- ✓ la prostacycline (PGI₂) sous l'action de la prostacycline synthétase.
- ✓ les thromboxanes (TXA₂, TXB₂) sous l'action de la thromboxane synthétase.

3- Rôles des prostanoïdes

Ces médiateurs cellulaires (Fig.3) sont impliqués dans des processus pathologiques comme l'inflammation, la fièvre, la douleur et la polyarthrite rhumatoïde. Ils ont également un rôle important dans la régulation de plusieurs processus physiologiques.

- ✓ La PGD₂ synthétase catalyse la formation de PGH₂ en PGD₂ qui est détectée dans plusieurs organes : le cerveau, les poumons, l'estomac, le foie, l'intestin et la peau. Elle a été purifiée à partir du cerveau chez le rat. Il faut noter qu'elle est présente à fortes concentrations dans le système nerveux central [4]; d'où sa capacité à induire le sommeil [5].
- ✓ La PGF₂ synthétase est caractérisée par sa bifonctionnalité : - Réduction de la PGH₂ en **PGF₂α** et – Transformation de la PGD₂ en **PGF₂α**, détectée dans le poumon, la rate et le rein.
- ✓ La PGE₂ synthétase a été partiellement purifiée à partir des vésicules séminales de bœuf [6]. Elle catalyse la formation de **PGE₂** à partir de la PGH₂. Il faut noter que la **PGE₂** constitue le produit majeur de la voie de la PGHS et est présente dans de nombreux tissus : estomac, rein, poumon, cerveau.
- ✓ La PGI₂ est un puissant vasodilatateur et également un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire [7].

- ✓ La TXA synthétase conduit à la formation du TXA₂. Cette dernière, étant très **instable**, évolue vers sa forme hydrolysée, stable mais **inactive** : la TXB₂. La TXA₂ régularise l'agrégation plaquettaire [8].

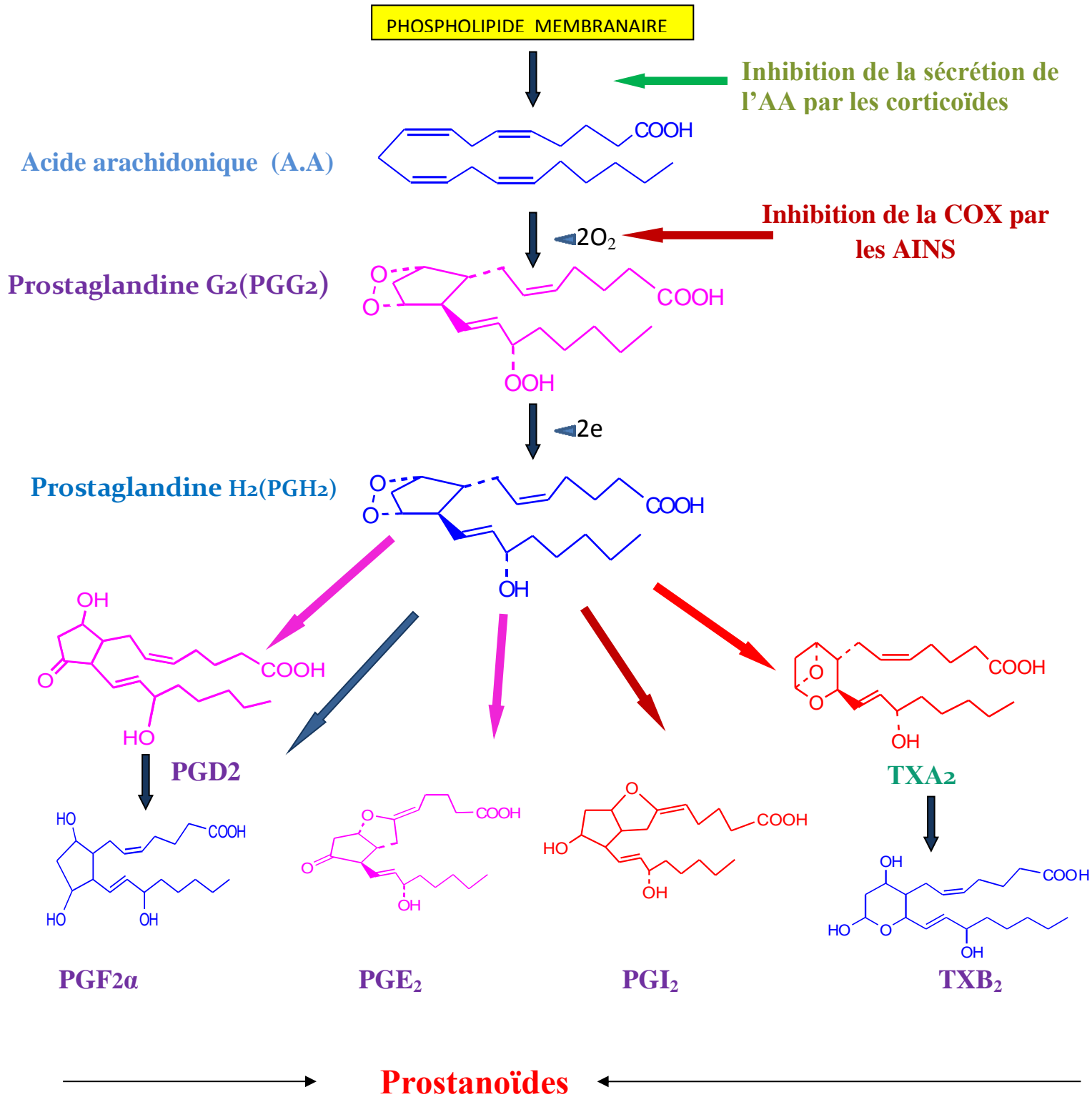


Figure 3 : Synthèse des prostanoïdes

III- LA CYCLO-OXYGENASE : EXPRESSION ET LOCALISATION

La cyclooxygénase appelée également COX est une hémoprotéine, composée approximativement de 600 acides aminés, se trouve enchâssée par dimère dans la couche lipidique interne de la membrane plasmique.

Sa structure tridimensionnelle montre qu'elle est constituée de deux sous-unités identiques possédant chacune trois domaines (Fig.4).

- ✓ Un domaine EGF like situé à l'extrémité N-terminale de la protéine.
- ✓ Un domaine de liaison membranaire qui forme une large surface hydrophobe permettant l'ancrage de la protéine à la membrane.
- ✓ Un domaine catalytique qui comporte deux sites adjacents mais distincts correspondant aux deux activités enzymatiques de la COX, un site dioxygénase et un site peroxydase.

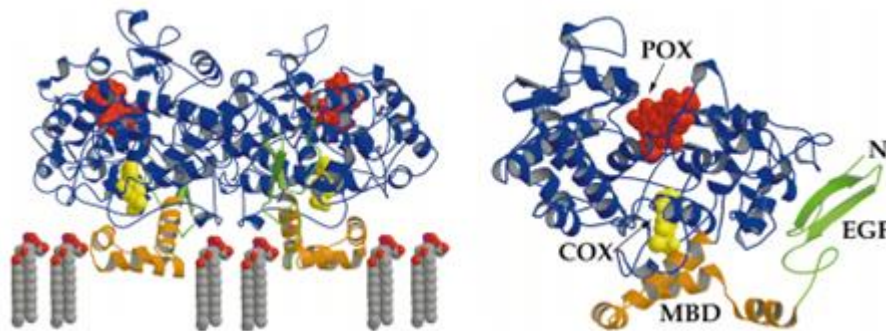


Figure 4 : Structure tridimensionnelle de la COX.

Il fut établi au début des années 1990 qu'il existait au moins deux isoformes de la COX, notées : COX-1 et COX-2. La première est constitutive et elle participe au bon fonctionnement de l'organisme. Quant à la COX-2, elle est induite essentiellement par les cytokines pro-inflammatoires [9]. Plus récemment, une troisième forme notée COX-3 (ou COX_{1b}) fut identifiée. Celle -ci est spécialement sensible au paracétamol [10]. Depuis cette découverte, la recherche dans ce domaine en est toujours à ses débuts et n'a pas vraiment justifié de la réelle existence de COX-3. Le rôle que peut jouer cette protéine reste incertain et controversé.

1- Les deux isoformes de la COX

La caractérisation structurale des COXs a montré qu'en dépit de leurs différences génétiques, elles possèdent des propriétés physiques et catalytiques proches. COX-1 et COX-2 ont des structures similaires. On note que chez l'homme les séquences en acides aminés sont identiques pour plus de 60%. Toutes les deux possèdent un site actif qui comporte les acides aminés essentiels à l'activité.

- ✓ La cyclooxygénase-1 a été découverte en 1976 dans les vésicules séminales du bélier [11]. Elle est constitutivement exprimée dans le système gastro-intestinal, les plaquettes sanguines et les reins. Ses principales fonctions sont la protection de la muqueuse gastrique et la régulation du flux rénal.

La COX-1 est une protéine de 71 kDa. Elle est codée par un gène du chromosome IX [12]. Le promoteur de ce gène ne contient pas de TATA box, impliquant que cette enzyme n'est pas régulée d'où son caractère constitutif [13].

- ✓ La cyclooxygénase-2 a été mise en évidence suite aux études qui ont prouvé que la quantité de protéines COXs augmentait dans les états inflammatoires, elle est indétectable dans la plupart des tissus, mais son expression peut être rapidement induite lors d'une inflammation [14]. Il faut noter que la COX-2 est aussi constitutive dans le cerveau [15], la prostate, les reins et les plaquettes nouvellement formées [16]. Elle est impliquée dans plusieurs fonctions pathologiques telles que la fièvre et l'inflammation ou physiologiques tels que l'ovulation et l'accouchement.

La COX-2 humaine est une protéine de 72 kDa [17]. Elle est codée par un gène du chromosome I.

2- Site actif

Dans les 2 isoformes, le site actif se présente comme un long canal hydrophobe qui s'étend du domaine de liaison membranaire au centre du domaine catalytique (Fig. 5).

Il est composé d'acides aminés essentiels. Au niveau structurel, ces isoformes présentent aussi bien des similitudes que des différences marquées. Il faut noter que les résidus composant le site actif sont tous conservés ; ce qui permet de les considérer comme biochimiquement identiques. Cependant, il a été montré théoriquement et expérimentalement

que le site actif de la COX-2 est très flexible [18-20]. Ces études ont montré que le site actif est sensible à la nature chimique et à la taille des substituants du ligand exogène c'est-à-dire le médicament.

Du fait que COX-2 présente une insertion de 18 acides aminés dans sa partie C-terminale, non utiles à l'activité catalytique, nous allons utiliser dans ce manuscrit la numérotation des résidus de COX-1 dans les 2 isoformes.

La littérature rapporte que 3 résidus sont essentiels à l'activité de la COX sur le ligand endogène et qui sont :

- ✓ **Arg120** qui permet une liaison ionique avec le carboxylate de l'acide arachidonique.
- ✓ **Tyr385** qui initie l'activité cyclooxygénase en provoquant l'arrachement stéréospécifique de l'atome H en C₁₃ de l'acide arachidonique.
- ✓ **Ser530** qui sert de site d'acétylation, obligeant l'AA à se courber d'une façon particulière, en forme « L » pour pouvoir être transformé.

Il faut noter que le site actif de la COX-2 est plus large et plus volumineux que celui de la COX-1. Cette différence est due aux changements structurels suivants :

- ✓ L'**Ile523** et l'**Ile434** de COX-1 sont remplacées par des **valines** dans COX-2 ; ce qui entraîne, après déplacement des résidus voisins, la formation d'une poche hydrophile latérale supplémentaire, par déplacement de **Phe518** donnant accès à **Arg513** ; ce qui permet la création d'une liaison hydrogène avec les ligands [21].
- ✓ Le remplacement de **Phe503** par une **leucine** permet le déplacement de la **Leu384** au sommet du canal de COX-2, engendrant la formation d'une cavité lipophile [22].

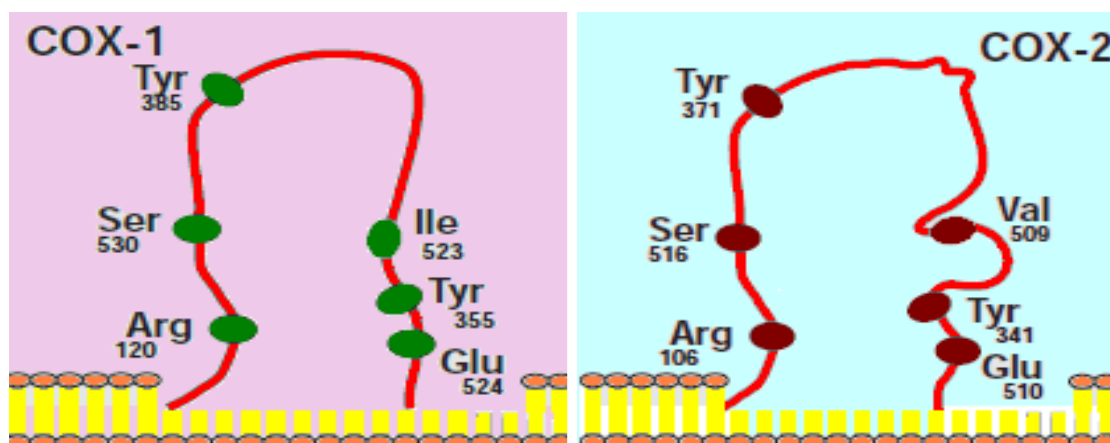


Figure 5 : Sites actifs COX-1 /COX-2

Il faut noter que ces différences ne conduisent pas à une modification de l'activité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat naturel qui est l'acide arachidonique. En revanche, sur le plan pharmacologique, ce type de modifications va permettre d'avoir une affinité différente pour les inhibiteurs de la COX et surtout un design efficace de nouvelles molécules plus sélectives de telle ou telle iso-enzyme.

Nous résumons dans le tableau suivant les principales caractéristiques et différences de ces deux cibles biologiques.

Tableau 1 : Caractéristiques et différences des iso-enzymes COX-1 et COX-2

Caractéristiques	COX-1	COX-2
Expression	Constitutive	Inductible
Localisation	Plaquettes sanguines Muqueuse gastrique Rein	Cerveau Prostate Rein
Fonctions	-Protection de la muqueuse gastrique -Equilibre de l'hémostase primaire -Préservation du flux sanguin rénal	-Pathologique: fièvre, douleur, inflammation -Physiologique: ovulation, accouchement, Cicatrisation

Homologie	inter-espèces	90%	90%
	intra-espèces	60%	
Volume du site actif		316 Å ³	393 Å ³
Expression a l'état basal		Constitutive	Très peu exprimée
Expression lors d'une inflammation		Constante	Très rapidement induite
Affinité vers l'AA		Très sélective	Peu sélective

IV- LES INHIBITEURS DE LA COX

Les produits pharmaceutiques inhibant la COX par excellence sont des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS).

Les AINS sont des composés dépourvus du noyau stérol. Ils ont une action à la fois analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire [23].

1- Mode d'action

Malgré leur hétérogénéité chimique, les AINS agissent en bloquant l'accès du canal hydrophobe de la COX à l'AA : ils inhibent ainsi son activité [23]. Sur le plan du mode d'action, on peut citer 3 familles de ces produits pharmaceutiques [24] :

a- Les inhibiteurs compétitifs réversibles COX-1 et COX-2

Ces composés se fixent sur le site actif de l'enzyme ; ce qui empêche ainsi la liaison de son substrat naturel. La majorité des AINS entrent dans cette catégorie.

b- Les inhibiteurs irréversibles COX-1 et COX-2

Ces composés produisent une inhibition enzymatique définitive. Une nouvelle synthèse de protéines est nécessaire pour que l'activité enzymatique réapparaisse. C'est le cas de l'aspirine, qui acétyle la **Ser530** empêchant ainsi l'AA de se loger dans la cavité de la COX.

On peut aussi citer l'indométacine, le flurbiprofène ou l'acide méclofénamique.

c- Les inhibiteurs compétitifs réversibles dont l'action est liée à la capture des radicaux libres (ou dépendants du temps)

Nous avons déjà mentionné que la cyclo-oxygénase est couplée à une peroxydase pour former un complexe enzymatique : la prostaglandine endoperoxyde synthétase. Ce complexe forme la PGH₂ qui est une plaque tournante de la synthèse des prostaglandines, du thromboxane et de la prostacycline. Cette réaction nécessite la présence de radicaux libres. Si ces derniers sont fixés par des capteurs de radicaux libres, comme les AINS dérivés phénoliques, la réaction enzymatique se trouve momentanément bloquée. Il est important de noter que ces inhibiteurs n'interagissent pas avec l'**Arg120**.

2-Classification des AINS

Il existe actuellement 2 types de classification

a- Classification chimique

La plus ancienne classification des AINS est celle qui les range par familles chimiques. Cette classification des AINS n'a pas de grande répercussion sur leur prescription même s'il existe quelques spécificités propres à chaque famille. Ces AINS dits de première génération, qu'on appelle AINS classiques, n'offre pas de caractère spécifique et inhibe aussi bien la COX-1 que la COX-2 [25]. Nous donnons, ci-après, les principales familles chimiques :

- ✓ *Les salicylés* ou les acétylants de la **Ser530**
- ✓ *Les pyrazolés* : la phénylbutazone est la seule molécule encore disponible. Le risque d'agranulocytose limite sa prescription dans la spondylarthrite ankylosante et pour des durées de prescription courte.
- ✓ *Les indoliques* : cette famille d'AINS est surtout marquée par la fréquence des effets indésirables neurosensoriels (céphalées, vertiges, étourdissements). Le chef de file étant l'indométacine,
- ✓ *Les arylcarboxyliques* : cette classe d'AINS regroupe de nombreuses

molécules dont les propioniques ou les profènes (Ibuprofène, Kétoprofène, Naproxène) et les acetates ou les fénacs (Kétorolac, Diclofénac, sulindac). Une de leurs caractéristiques est d'avoir un effet antalgique important à la fois périphérique et central.

- ✓ *Les oxicams* : ce sont les dérivés des carboxamides du benzothiazine dioxyde, caractérisés par une demi-vie plasmatique très longue. Le piroxicam, qui en est le chef de file, a vu ses indications se restreindre par l'Agence Européenne du Médicament de juin 2007, du fait de sa toxicité digestive et cutanée. Il est recommandé de ne l'utiliser que dans le traitement symptomatique de l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante, à la dose la plus faible possible.

Il faut noter que la plupart de ces composés présentent un groupement capable de créer une liaison ionique avec l'Arg120 [21].

Cette subdivision a l'avantage :

- d'individualiser la phénylbutazone, qui a des règles de prescription très strictes.
- d'éviter la prescription d'une molécule de la même famille, en cas d'intolérance vraie à l'une d'entre elles.

Il faut savoir que la structure d'un AINS ne préjuge ni de son efficacité, ni de sa tolérance et qu'il existe une sensibilité individuelle aux AINS qui explique le nombre de molécules disponibles.

b- Classification sélective

Les AINS peuvent aussi être classés selon leur affinité pour l'une ou l'autre COX. Conventionnellement, le pouvoir inhibiteur d'un AINS s'exprime par la concentration nécessaire à inhiber de 50% l'activité de la COX dans un système *in vitro*: «IC₅₀».

On distingue quatre catégories appartenant à la classification basée sur la sélectivité [24] :

b-1- Les inhibiteurs préférentiels de COX-1

Les anti-COX-1 préférentiels sont définis comme des inhibiteurs ayant une faible inhibition de COX-2 en comparaison avec l'inhibition de la COX-1. Ils sont caractérisés par un faible rapport de IC₅₀ (COX-1/COX-2).

b-2- Les inhibiteurs préférentiels de COX-2

Les anti-COX-2 préférentiels affectent peu COX-1 à faible posologie mais l'inhibent significativement aux posologies maximales. L'inhibition de la COX-2 est 2 à 100 fois plus grande que celle de la COX-1.

b-3- Les inhibiteurs non sélectifs de COX-2

Les anti-COX-2 non sélectifs sont des AINS qui inhibent significativement COX-1 aux différentes posologies utilisées.

b-4- Les inhibiteurs sélectifs de COX-2 :

Les anti-COX-2 sélectifs n'inhibent pas la COX-1 à dose thérapeutique (ratio COX-1/COX-2 très élevé). Ces inhibiteurs dits de deuxième génération sont appelés les COXIBS.

Il est important de noter que la dénomination coxib n'est pas une terminologie attribuée à une classe structurale de molécules mais plutôt à une catégorie pharmacologique. C'est en effet le cas du prexige (Lumiracoxib) dont la structure chimique est plus proche de celle d'un AINS préférentiel, le Diclofénac.

3 - Effets secondaires

L'ensemble des effets pharmacologiques des AINS sont donc la conséquence de l'inhibition de la production des prostaglandines et vont donc à l'inverse des actions de ces substances.

En dépit d'un mode d'action commun, certains AINS ont moins d'effets indésirables que d'autres. Ces différences pourraient s'expliquer par des différences d'affinité pour les deux isoformes de la COX.

a) – Inhibiteurs classiques ou non sélectifs COX-2

Nous avons mentionné précédemment que la COX-1 joue un rôle important dans les processus de régulation, particulièrement gastriques. Les AINS non sélectifs COX-2 entraînent donc des effets secondaires assez importants [25- 29] et qui sont :

- *Saignements et ulcérations gastriques* : PGE2 et PGI2 sont des PGs protectrices de la muqueuse gastrique. Leur diminution, consécutive à l'inhibition de l'activité de la COX, fragilise cette muqueuse et entraîne des saignements voire des ulcérations au

niveau de l'estomac. Pour cette raison, la prise d'AINS doit préférentiellement se faire au cours des repas.

- *Insuffisance rénale* : les prostaglandines sont également des modulateurs de la filtration glomérulaire. La diminution de leur production entraîne une augmentation de la rétention hydrosodée pouvant conduire à une insuffisance rénale.
- *Broncho-constriction* : PGE2 étant un bronchodilatateur assez puissant, sa diminution peut entraîner des crises d'asthme.
- *Ralentissement de l'agrégation plaquettaire* : le thromboxane TXA2 est le facteur d'agrégation plaquettaire. Lors de la prise d'AINS, le temps de formation d'un agrégat de plaquettes est augmenté ; ce qui allonge donc la durée de saignement. Il faut noter que l'aspirine présente un effet antiagrégant plaquettaire exacerbé : étant un inhibiteur irréversible, et les plaquettes ne pouvant synthétiser l'enzyme (dépourvue de noyau comme l'hématie), son effet est d'autant plus important. Cet effet secondaire est utilisé, à profit, dans la prévention des thromboses, par la prise quotidienne de faibles doses d'aspirine.

b) – Inhibiteurs sélectifs COX-2 ou Coxibs

Les deux représentants de cette classe étaient le rofécoxib VIOXX® et le célécoxib CELEBREX®. Le rofécoxib a été retiré du marché en septembre 2004 à cause d'une augmentation du risque d'accidents cardiovasculaires chez les patients à risque prenant ce traitement. La première question qui se pose face à cette description pharmacologique est celle de l'existence d'une réelle sélectivité vis-à-vis de ces deux isoformes enzymatiques. Celle-ci a été étudiée dans un travail portant sur le ratio du blocage COX 2/COX 1 dans des cellules contenant ces deux isoformes [30]. Nous donnons le résultat sur la figure suivante :

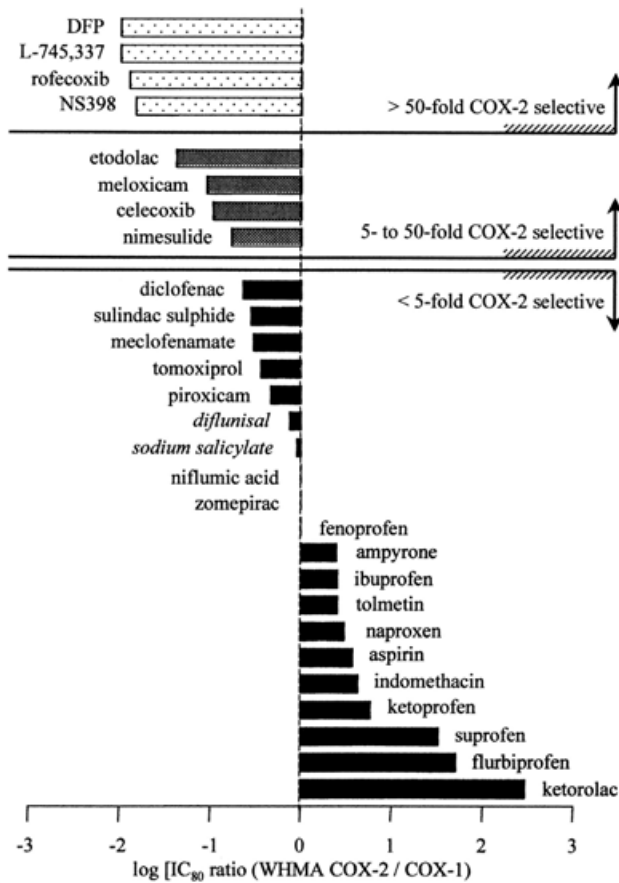


Figure 6 : Profil de sélectivité de quelques AINS [30]

Ce graphique montre que le rofécoxib est un produit plus sélectif vis à vis de COX 2 que le célécoxib qui présente un profil de sélectivité très voisin de celui de produits plus anciens comme l'étodolac LODINE®, le nimésulide NEXEN® ou le méloxicam MOBIC®. Il est d'ailleurs aussi intéressant de constater que l'ibuprofène (produit réputé très bien toléré) présenterait un profil de sélectivité voisin de celui de l'aspirine (produit réputé mal toléré sur le plan digestif). Cette différence pourrait résulter de l'utilisation de l'ibuprofène à des doses relativement basses (2 à 3 fois inférieures à la dose anti-inflammatoire quand on l'utilise comme antalgique ou comme antipyrétique).

Parmi les nombreuses études cliniques [31] qui ont été menées aucune n'a remis en cause le composé par des risques accrus d'accidents thrombotiques.

L'étude TARGET (*Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial*) [32, 33], visant à comparer le lumiracoxib avec le naproxène et l'ibuprofène, n'a également pas permis d'impliquer de manière significative le lumiracoxib avec des risques accrus d'accidents thrombotiques comparables à ceux décrits avec le rofécoxib. Ces résultats laissent

penser que c'est un métabolite spécifique du Vioxx qui serait à l'origine de ses effets délétères.

4 – Structures et activités de quelques inhibiteurs potentiels

Comme notre propos dans ce manuscrit consiste à étudier les modes de liaison de quelques inhibiteurs potentiellement actifs sur l'une ou l'autre des COXs, nous présentons ci-dessous les structures et les activités de quelques AINS bien connus. Dans le but de rationaliser les résultats de notre étude de modélisation par le docking moléculaire, nous en avons sélectionné judicieusement quelques uns. Nous signalons que le profil d'inhibition est estimé par l'IC₅₀ sur COX-1 et COX-2 dans le sang humain [34-36].

Tableau 2 : Quelques AINS appartenant à la famille des profènes

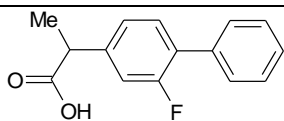
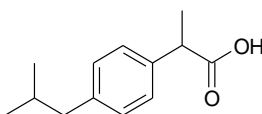
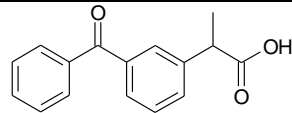
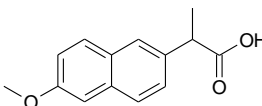
Structures en 2D	IC ₅₀ (μM)		Structure 2D	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 Flurbiprofène	0.29	2.56	 Ibuprofène	4.7	>30
 kétoprofène	0.02	1.08	 Naproxène	7.76	74

Tableau 3 : Quelques AINS appartenant à la famille des fénacs

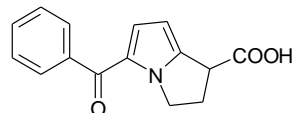
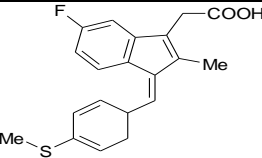
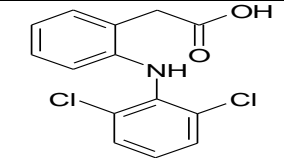
Structures en 2D	IC ₅₀ (μM)		Structure 2D	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 Kétorolac	0.33	0.86	 Sulindac sulfide	1.02	10.43
 Diclofènac	0.14	0.05			

Tableau 4 : Quelques AINS appartenant à la famille des oxicams

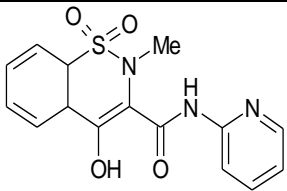
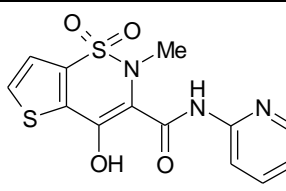
Structure 2D	IC_{50} (μM)		Structure 2D	IC_{50} (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 <p>Piroxicam</p>	0.76	8.99	 <p>Tenoxicam</p>	2.3	14

Tableau 5 : Quelques AINS appartenant à la famille des indoliques

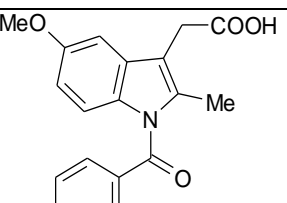
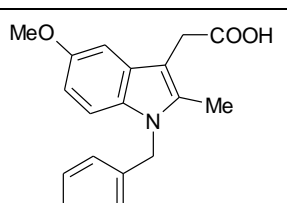
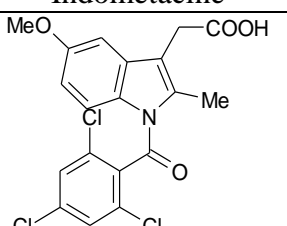
Structures 2D	IC_{50} (μM)		Structures 2D	IC_{50}	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 <p>Indométacine</p>	0.16	0.46	 <p>L-780</p>	>10	0.009
 <p>L-748</p>	>10	0.5			

Tableau 6 : Dérivé de l'indométacine portant une méthylsulfone

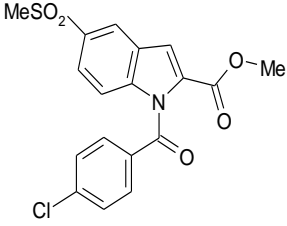
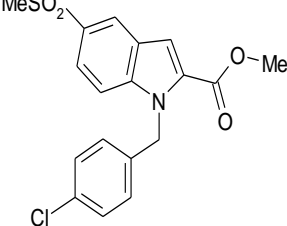
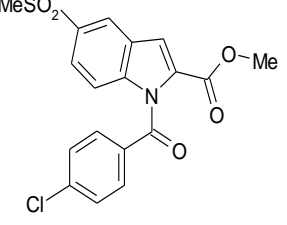
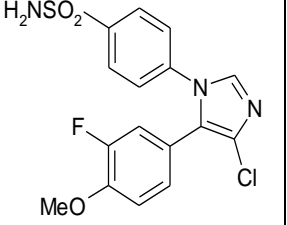
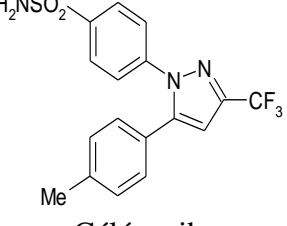
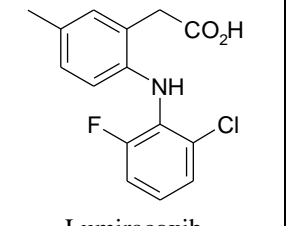
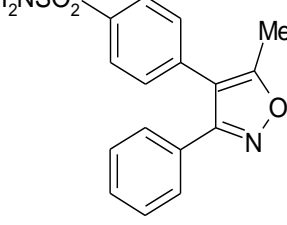
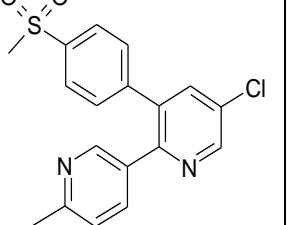
Structures 2D	IC ₅₀ (μM)		Structures 2D	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
	>10	0.5		>10	0.009

Tableau 7 : Quelques AINS appartenant à la famille des coxibs.

Structures 2D	IC ₅₀ (μM)		Structures 2D	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 Roféc Coxib	>10	0.645	 Cimicoxib	6	0.140
 Célécoxib	>10	0.069	 Lumiracoxib	67	0.13
 Valdécoxib	>10	0.005	 Etoricoxib	116	1.1

V - CONCLUSION

Cette revue bibliographique représente pour nous une étude approfondie, de la biologie structurale et de la biochimie, des enzymes impliquées dans la formation des médiateurs cellulaires physiologiques et ceux impliqués dans la pathologie inflammatoire.

La mise en évidence récente de l'expression des COXs, dans des sites pathologiques a révélé qu'au-delà des effets secondaires des inhibiteurs sélectifs COX-2, ils pourraient disposer d'un intérêt thérapeutique renouvelé. En effet, leur utilité dans d'autres pathologies, comme la maladie d'Alzheimer et notamment le cancer, est actuellement l'objet de beaucoup de réflexion [37].

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - Williams TJ., Peck MJ. *Nature*; **1977**, 270 : 530 – 532.
- 2 - Wu G., Kulmacz R.J., Tsai A. *Biochemistry*; **2003**, 42 : 13772-13777.
- 3 - Shimizu T., Mizuno N., Amano T., Hayaishi O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*; **1979**, 76:6231-6234.
- 4 - Shimizu T., Yamamoto S., Hayaishi O. *J. Biol. Chem*; **1979**, 254:5222-5228.
- 5 - Hayaishi O. *FASEB J*; **1991**, 5:2575-2581.
- 6 - Urade Y., Watanabe K., Eguchi N., Fujii Y., Hayaishi O. *J. Biol. Chem*; **1990**, 265:12029-12035.
- 7- Moncada S., Vane JR. *Pharmacol. Rev*; **1978**, 30:293-331.
- 8- Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B. *Proc Natl Acad Sci USA*; **1975**, 72:2994.
- 9- Hla T., Neilson K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*; **1992**, 89 : 7384-7388.
- 10 - Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S., Simmons D.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*; **2002**, 99 : 13926-13931.
- 11- Hemler M., Lands W. E. *J. Biol. Chem*; **1976** , 251, 5575-9.
- 12- Oshima T., Yoshimoto T., Yamamoto S., Kumegawa S., Yokoyama C., Tanabe T. *J. Biol. Chem*; **1991**, 266 :13621.
- 13- Picot D., Loll PJ., Garavito R.M. *Nature*; **1994**, 367: 243-249.
- 14- Raz A., Wyche A., Siegel N., Nedleman P. *J. Biol. Chem*; **1988**, 263 : 3022-3028.
- 15- Marnett LJ. *Curr Opin Chem Biol*; **2000**, 4: 545-552.
- 16 - Bazan NG., Colangelo V., Lukiw WJ. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*; **2002**, 69:197- 210.
- 17- Malaise M. *Rev Med Liège*; **1996**, 51: 123-125.
- 18- Soliva R., Almansa C., Kalko SG., Luque FJ., Orozco M. *J. Med. Chem*; **2003**, 46: 1372-1382.
- 19 - Malkowski MG., *et al. Science*; **2000**, 289: 1933.
- 20 - Smith T., McCracken J., Shin YK., DeWitt D. *The journal of biological chemistry*; **2000**, 275: 40407–40415.
- 21 - Nicolas Bezier. Thèse de doctorat en Sciences du Médicament ; **2008**, Lille 2
- 22 - Park C.H. Thèse de doctorat en pharmacochimie; **1999**, Lille 2
- 23 – Vane JR. *Nature*; **1971**, 231, 232-5.
- 24 - Kurumbail R G., Stevens A M., Gierse J K., McDonald J J., Stegeman R A., Pak., J Y., Gildehaus D., Miyashiro J M., Penning T D., Seibert K., Isakson P C.,

- Stallings W. C. *Nature*; **1996**, 384(6610), 644-8.
- 25 - Laneuville O., Breuer DK., Dewitt DL., Hla T., Funk CD., Smith WL. *J Pharmacol Exp Ther*; **1994**, 271: 927-934.
- 26 - Hawkey CJ. *Lancet*; **1999**, 353: 307-14.
- 27 - Thibault V., Terlain B., Gauldie J. *J Interferon Cytokine Res*; **1996**, 11:973-81.
- 28 - Dannhardt G., Ulbrich H. *Inflamm Res*; **2001**, 50:262-9.
- 29 - Carabaza A., Cabré F., Rotllan E., Gómez M., Gutiérrez M., García ML., Mauleón D., *J Clini Pharmacol*; **1996**, 36 :505-12.
- 30 - Warner TD et coll. *Proc Natl Acad Sci*; **1999**, 96 : 7563-7568
- 31 - Silverstein F.E., Faich G., Goldstein J.L., Simon L.S., Pincus T., Whelton A., Makuch R., Eisen G., Agrawal NM., Stenson WF., Burr AM., Zhao WW., Kent JD., Lefkowitz JB., Verburg KM., Geis GS. *JAMA*; **2000**, 284:1247-55.
- 32 - Schnitzer TJ., Burmester GR., Mysler E., et al. *Lancet* ; **2004**, 364:665–74.
- 33 - Farkouh ME., Kirshner H., Harrington RA., et al; *Lancet*; **2004**, 364:675–84.
- 34 - Dannhardt G., Kiefer W. *Eur. J. Med. Chem*; **2001**, 36 : 109-126.
- 35- Black W C., Bayly C., Belley M., Chan C C., Charleson S., Denis D., Gauthier J Y., Gordon R., Guay D., Kargman S., Lau C K., Leblanc Y., Mancini J., Ouellet M., Parcival D., Roy P., Skorey K., Tagari P., Vickers P., Wong E., Xu L., Prasit P. *Bioorg. Med. Chem. Lett*; **1996**, 6 : 725-730.
- 36- Palomer A., Cabre F., Pascual J., Campos J., Trujillo M.A., Entrena A., Gallo M A., Garcia L., Mauleon D., Espinosa A. *J. Med. Chem*; **2002** , 45 : 1402-1411.
- 37 – Bouaziz-Terrachet S., Thèse de Doctorat, « Etude Théorique du mécanisme catalytique et d'inhibition de la cyclo-oxygénase-2 », USTHB, **2010** N° d'ordre : 08/2011-D/CH

CHAPITRE II

Méthodes, Matériel et Méthodologie

I-INTRODUCTION

L'accroissement considérable de la puissance des moyens de calcul a permis le développement des méthodes les plus avancées de la chimie théorique.

Tous ces moyens permettent de modéliser, de comprendre, d'interpréter les phénomènes voire les processus se déroulant dans le domaine du vivant. On parle alors de *Modélisation Moléculaire* ou encore de *Chimie Informatique*.

L'élaboration de modèles moléculaires s'effectue actuellement au moyen de deux types d'approches théoriques à savoir la mécanique quantique et la mécanique moléculaire.

Dans ce chapitre, nous présentons dans un premier temps, ces deux mécaniques de base. Compte tenu du fait que les méthodes utilisées dans le cadre de ce travail ne sont pas de type quantique, nous nous limiterons à un bref exposé des méthodes quantiques permettant de les situer dans le cadre de la chimie théorique. Nous aborderons ensuite, les méthodes utilisées dans le domaine du *drug design*. Nous terminerons le chapitre par une présentation de la méthodologie que nous avons utilisée dans le cadre de ce travail.

II – METHODES THEORIQUES

1 – Mécanique Quantique

À l'origine, les méthodes de la chimie quantique, fondées sur les principes de la mécanique quantique, visent généralement la détermination de la fonction d'onde du système poly-électronique considéré, atome ou molécule, en résolvant l'équation de Schrödinger [1] correspondante. Pour un système donné, dans un état stationnaire, c'est-à-dire d'énergie constante, elle prend la forme de l'équation aux valeurs propres suivante :

$$H\Psi = E\Psi \quad (1)$$

Où H est l'opérateur hamiltonien, associé à l'énergie E du système, composé de n électrons et de N noyaux, et Ψ la fonction d'onde décrivant le mouvement des particules.

En unités atomiques, l'hamiltonien s'écrit :

$$H = \sum_i^n -\frac{1}{2}\Delta_i + \sum_A^N \frac{1}{2M_A}\Delta_A - \sum_i^n \sum_A^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} + \sum_i^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{|r_j - r_i|} + \sum_A^N \sum_{B>A}^N \frac{Z_A \cdot Z_B}{|R_B - R_A|} \quad (2)$$

Où,

- ✓ Δ_i et Δ_A sont respectivement les opérateurs laplaciens associés des coordonnées de l'électron i et du noyau A .
- ✓ R_A et r_i représentent les vecteurs positions du noyau A et de l'électron i .
- ✓ Les deux premiers termes représentent respectivement les opérateurs associés à l'énergie cinétique des électrons et des noyaux.
- ✓ Z_A est la charge du noyau A et M_A sa masse. Le 3^{ème} terme décrit l'interaction entre noyaux et électrons. Les deux derniers termes correspondent à l'interaction électron-électron et noyau-noyau, respectivement.

Il faut noter que la fonction d'onde à déterminer décrit le système de la manière la plus complète possible. Cependant, l'équation (1) ne peut être résolue analytiquement (exactement) que dans le cas de systèmes mono-électroniques et ce, à cause du terme de répulsions électroniques. Dans le cas général, on doit donc se contenter de solutions approchées, lesquelles doivent cependant être suffisamment précises pour être applicables et permettre l'interprétation des phénomènes étudiés [2-4].

Actuellement, on dispose de plusieurs méthodes quantiques issues de résolutions approchées de l'équation de Schrödinger. Cependant, elles sont toutes basées sur une approximation inévitable et qui est celle de traiter indépendamment le mouvement des électrons de celui des noyaux.

En effet, la masse des noyaux étant beaucoup plus importante que celle des électrons, on considère que, pour chaque déplacement des noyaux, les électrons peuvent se repositionner très rapidement. Cette approximation, dite de Born-Oppenheimer [5], est tout à fait justifiée lorsque les noyaux de la molécule considérée sont proches de leurs positions d'équilibre. L'équation (1) se sépare en deux équations, l'une décrivant les électrons et l'autre les noyaux. Il faut noter que si le système étudié ne comporte pas d'atomes lourds, on peut négliger la variation de la masse des électrons due à la vitesse, les couplages spin-orbite et spin-spin (modèle non relativiste).

Compte tenu de ces approximations, l'équation électronique s'écrit comme suit :

$$H_{ele} \Psi_{ele} = E_{ele} \Psi_{ele} \quad (3)$$

Avec,

$$H_{ele} = - \sum_i^n \frac{1}{2} \Delta_i - \sum_i^n \sum_A^N \frac{Z_A}{|R_A - r_i|} + \sum_i^n \sum_{j>i}^n \frac{1}{|r_j - r_i|} \quad (4)$$

Le 3^{ème} terme de l'expression (4), qui est associée à l'énergie de répulsion inter-électronique, fait généralement l'objet d'approximations, et, selon la forme adoptée, on parlera de méthodes *ab initio*, semi-empiriques ou empiriques. Le fait que ce terme ne puisse se décomposer en une somme de contributions mono-électroniques implique qu'on ne peut définir en toute rigueur de fonctions mono-électroniques dans un système poly-électronique. La résolution de l'équation électronique (3) conduit à l'énergie et à la fonction d'onde du système pour une configuration nucléaire donnée. Elle s'effectue soit dans le cadre dit de la théorie de Hartree-Fock (HF) basé sur un modèle à particules indépendantes (6-9), soit de manière plus précise en tenant compte de la corrélation instantanée existant entre les mouvements des électrons.

Ces méthodes quantiques conduisent à des résultats dont la fiabilité est en rapport avec les approximations introduites, la prise en compte de la corrélation électronique étant indispensable pour l'obtention de valeurs précises. Dans ce cadre, on se heurte souvent à des problèmes d'ordre technique, tels que le temps de calcul pouvant être prohibitif et l'espace mémoire.

Les théoriciens préfèrent, de plus en plus, se tourner vers des méthodes moins lourdes et donc moins onéreuses telles que celles issues de la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) [10-12].

La principale différence entre les techniques basées sur la DFT et celles plus traditionnelles *ab initio* de type post-HF qui tiennent compte de la corrélation électronique, réside dans les objectifs visés par les deux méthodes. Les méthodes DFT recherchent la densité électronique la plus exacte possible, alors que les méthodes *ab initio* se contentent plutôt d'une fonction d'onde approchée.

Même si ces deux types de méthodes peuvent conduire à la détermination des structures et des propriétés moléculaires, il reste que l'utilisation de la DFT n'est pas encore généralisée à l'étude de toutes les propriétés, ni à l'étude de tous les systèmes d'intérêt chimique.

2- Mécanique Moléculaire

a- Principes

La mécanique moléculaire (MM), apparue en 1930 [13], désigne actuellement une méthode de calcul qui permet, d'obtenir des résultats de géométrie et d'énergie moléculaire en se basant sur la mécanique classique.

La MM ne tient pas compte explicitement des électrons. Elle permet le calcul de l'énergie potentielle d'un système en fonction des positions des noyaux, en négligeant le mouvement des électrons. Dans le cadre de cette mécanique, les atomes sont assimilés à des particules sphériques et les liaisons chimiques sont considérées comme des ressorts, avec une distance d'équilibre calculée soit par des méthodes quantiques, soit déterminée par des méthodes expérimentales (rayons X, Infrarouge, RMN, etc.). Les atomes non liés peuvent interagir essentiellement via des interactions électrostatiques et de van der Waals. Ces simplifications permettent d'exprimer l'énergie potentielle en fonction de paramètres géométriques, atomiques, de liaison et d'angle de valence du système moléculaire. L'expression mathématique de cette énergie incluant l'ensemble des paramètres est appelée : *Champ de forces* [14-18].

b- Fonction énergie potentielle ou champ de forces

L'énergie potentielle ou stérique de la molécule peut être s'exprimée par la formule condensée suivante :

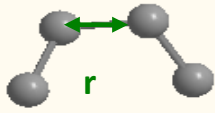
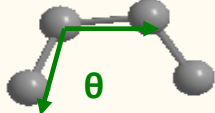
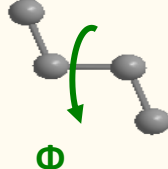
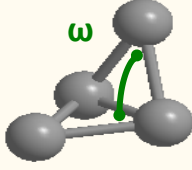
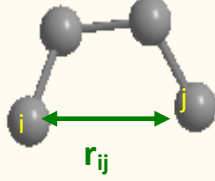
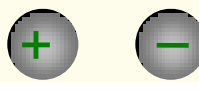
$$E_S = \underbrace{\sum E_{liaisons} + \sum E_{angles} + \sum E_{dièdres} + \sum E_{dièdresimpropres}}_{E_{cov\ valent}} + \underbrace{\sum E_{vdW} + \sum E_{électrostatique}}_{E_{noncov\ valent}} \quad (5)$$

Cette énergie est exprimée sous la forme d'une somme de contributions associées aux écarts de la structure par rapport à des paramètres structuraux de référence. En d'autres termes, c'est une représentation empirique des aspects dynamiques et énergétiques des systèmes moléculaires limités à une classe de molécules ayant des ressemblances structurales et fonctionnelles.

Les variables de calcul sont les coordonnées internes du système : longueurs de liaison, angle de valence, angles dièdres, angles dièdres impropres et les distances entre les atomes non liés.

Nous donnons dans le tableau suivant les termes essentiels et fréquents constituant le champ de forces ou l'équation (5).

Tableau 1 : Expression générale et représentation schématique d'un champ de forces

	Equations	Illustration de l'interaction
$E_{\text{covalente}}$	$E_{\text{liaisons}} = \sum_{\text{liaisons}} \frac{1}{2} K_0 (r - r_0)^2$	
	$E_{\text{angles}} = \sum_{\text{angles}} \frac{1}{2} K_{\theta} (\theta - \theta_0)^2$	
	$E_{\text{dièdres}} = \sum_{\text{dièdres}} \sum_n K_{\phi} (1 + \cos(n(\phi - \phi_0)))$	
	$E_{\text{dièdresimpropres}} = \frac{1}{2} K_{\omega} \omega^2$	
$E_{\text{noncovalente}}$	$E_{\text{vdW}} = \sum_{\substack{ij, \text{atomes} \\ \text{non-liés}}} 4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]$ « Lennard-Jones »	
	$E_{\text{vdW}} = A'_{ij} e^{-B'_{ij} R_{ij}} - \frac{C_{ij}}{R_{ij}^6}$ « Buckingham »	
	$E_{\text{électrostatique}} = \sum_{\substack{ij, \text{atomes} \\ \text{non-liés}}} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 \epsilon_r r_{ij}}$	

Notons que certains champs de force incluent, dans l'expression de l'énergie non covalente de la molécule, un terme décrivant les liaisons hydrogènes de type Lennard-Jones

$$E_{HB} = \sum_{\text{paires } ij} \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^{10}} \quad (6)$$

Certains contiennent également des termes dus au couplage entre les variations de différentes coordonnées internes. Il faut noter que le choix du champ de forces est à faire sur la base des résultats déjà obtenus dans la littérature concernant son application aux systèmes moléculaires analogues au système étudié.

Il existe un nombre conséquent de champ de forces différant par l'expression mathématique des divers termes et donc par leur domaine d'application [19- 26]. Parmi eux, nous pouvons citer le champ de forces MM2, utilisé dans le cadre de nos travaux et qui a été développé pour la modélisation des petites molécules organiques [22].

c- Méthodes d'exploration de l'hypersurface d'un système moléculaire

L'étape qui suit le choix du champ de force approprié au système étudié est la recherche de la géométrie la plus stable de ce dernier. Le but essentiel de la minimisation est de relaxer la structure initiale de la molécule afin d'éliminer les mauvais contacts interatomiques. Cette prospection consiste à déterminer les valeurs des variables géométriques pour lesquelles la valeur de la fonction d'énergie potentielle ou stérique est minimale. Le nombre important du degré de liberté de la molécule, fait que la molécule fluctue autour d'un ensemble de conformations stables correspondant à différents *minima*. Parmi ces *minima* un seul est global, et correspond à la plus basse valeur de l'énergie potentielle, tous les autres sont des *minima* locaux.

c-1- Algorithmes de minimisation

Les algorithmes de minimisation mesurent l'énergie le long de l'hypersurface énergétique d'un système de façon incrémentale, dans le but de déterminer des directions qui mènent à un minimum. Ces algorithmes sont basés sur le calcul des dérivées de la fonction d'énergie et utilisent des processus itératifs. En d'autres termes, à partir de l'énergie potentielle et du gradient d'un jeu de coordonnées atomiques $\left(g_i = -\frac{\partial E}{\partial x_i} \right)$, ces outils de minimisation engendrent un nouveau jeu de positions atomiques correspondant à une énergie potentielle plus basse. Cependant, ces algorithmes diffèrent tous dans la manière de descendre le long de l'hypersurface. Nous résumons ci-dessous les différents algorithmes les plus fréquemment utilisés :

✓ **Technique du gradient simple ou de la pente abrupte (« steepest descent »)**

La recherche de l'énergie minimale pour une première position atomique passe par la détermination du scalaire α , donné par la relation itérative suivante :

$$x_{i+1} = x_i - \alpha g_i \quad (7)$$

La recherche du minimum en un point s'effectue dans la direction opposée au gradient de la fonction énergie, dans le sens de la plus grande pente.

Cette technique s'avère efficace lorsque la conformation de départ est loin du *minimum*, cependant elle converge lentement et adopte un comportement oscillatoire près du *minimum*. C'est pour cela qu'elle est utilisée en première étape dans un processus de minimisation et ensuite poursuivie par l'algorithme utilisant le gradient conjugué décrit ci-dessous.

✓ **Technique du gradient conjugué (« Conjugate Gradient »)**

Tout comme la technique précédente, la recherche du minimum se fait dans le sens contraire au gradient, mais en tenant compte des gradients calculés dans les étapes précédentes; ce qui rend les calculs plus précis. La nouvelle direction est obtenue par l'équation suivante :

$$h_{i+1} = g_{i+1} + \gamma_i h_i \quad (8)$$

Avec
$$\gamma_i = \frac{g_{i+1} \times g_{i+1}}{g_i \times g_i}$$

h_{i+1} : Vecteur représentant la nouvelle direction

g_{i+1} : Gradient calculé pour le nouveau point

La technique du gradient conjugué converge mieux que celle de la plus grande pente. Elle présente l'intérêt d'échapper aux comportements oscillatoires autour du minimum tout en accélérant la convergence, mais elle n'est pas adaptée aux structures présentant de mauvais contacts ou pas très bien relaxées. Pour palier à cela, il est conseillé d'utiliser les deux algorithmes de minimisation l'un après l'autre.

✓ Technique de Newton-Raphson

Contrairement aux deux techniques précédentes qui n'utilisent comme information que la pente, la technique de Newton-Raphson utilise la dérivée seconde de l'énergie. Elle permet donc la prédiction de la courbure locale de l'hypersurface énergétique par le calcul du Hessien (matrice des dérivées secondes). Leur inconvénient réside dans le fait qu'elle nécessite un espace mémoire important et qu'elle ne peut pas être appliquée aux gros systèmes.

Nous indiquons dans la figure suivante que les algorithmes de minimisation ne conduisent pas toujours vers le minimum global mais plutôt vers le minimum le plus proche ; ils dépendent tous de la conformation de départ.

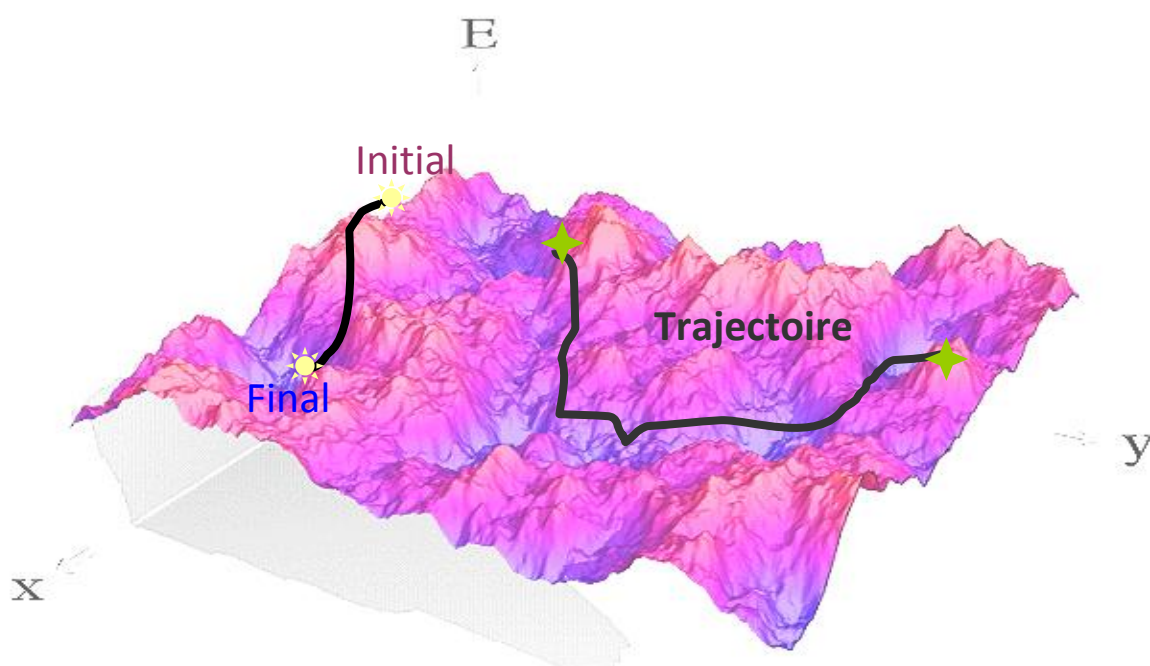


Figure 1 : Représentation d'une portion de l'hypersurface d'énergie potentielle

Afin d'éviter à la structure d'être piégée dans le minimum le plus proche, il est fortement conseillé de faire un échantillonnage de l'espace conformationnel de la molécule. Il existe, pour cela, plusieurs techniques permettant d'explorer l'espace conformationnel d'une

molécule. Cependant, cette exploration se fait de manière non exhaustive, à cause du grand nombre de degrés de libertés associé au système étudié.

c-2 - Rotation des angles de torsion

Les différences structurales existant entre deux conformères concernent d'abord les angles dièdres, puis les angles de valence et les longueurs de liaison. Par conséquent, une des méthodes efficaces pour explorer l'espace conformationnel de la molécule consiste à faire varier chacun de ses angles dièdres par petits incréments en fixant les angles de valence et les liaisons. Pour cela, le nombre de conformères théoriques est donné par P^i .

Avec **P**: le nombre d'états possibles par torsion pour chaque angle dièdre

i: le nombre d'angles dièdres contenus dans la molécule

Par exemple, pour une molécule possédant 2 angles dièdres et si une torsion de 20° est effectuée, 324 conformères seront alors générés ($P = 360/20 = 18 \rightarrow 18^2 = 324$). Ainsi, une molécule ayant 3 angles de torsion générerait 5832 conformères...etc. On note que cette technique est trop longue et onéreuse pour les systèmes ayant plus de 4 angles dièdres. Pour remédier à ce problème d'autres techniques, dites méthodes statistiques, ont été développées pour l'échantillonnage de l'espace conformationnel de composés. Parmi ces méthodes, nous citons la dynamique moléculaire, le recuit simulé et la méthode de Monté Carlo. Ces méthodes non utilisées ici sont présentées dans des travaux antérieurs [27, 28].

III- Techniques de Drug Design

La conception de composés actifs et bénéfiques pour l'homme est favorisée par plusieurs évolutions : informatique, biologie structurale et pharmaco-chimie. En effet, durant des années déjà, la recherche tente de développer les techniques de *drug design* et les premières tentatives, fautes de moyens, se sont soldées par des corrélations statistiques entre les descripteurs structuraux et les activités biologiques des systèmes étudiés. L'essor du domaine informatique durant ces vingt dernières années a banalisé l'utilisation des processeurs à grande vitesse et les stations de travail ; ce qui a engendré l'évolution de ce qui est actuellement appelé « conception de médicament assistée par ordinateur » ou encore « Computer Assisted Drug Design » (CADD). Ainsi, le *drug design* peut être défini comme étant une approche visant à rechercher des candidats médicaments par conception *in silico* sur la base des informations expérimentales accessibles.

En se basant sur la disponibilité de l'information, deux approches principales sont connues dans le domaine du *drug design* : l'approche du « **ligand-based** » et celle du « **receptor-based** ».

1- Approche ligand-based

Cette technique, utilisée au sein de notre équipe [29-31], est appliquée quand des séries de composés présentent des activités intéressantes sur une cible thérapeutique dont la structure n'est pas disponible ou impossible à connaître. Celle-ci utilise des outils tels que le QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) et CoMFA (Comparative Molecular Field Approach) dans le but de développer des modèles permettant de prédire l'activité d'une molécule non testée ou non encore synthétisée.

2- Approche receptor-based

Cette technique est appliquée lorsqu'un modèle 3D fiable du récepteur est disponible par diffraction aux rayons-X, études RMN ou modélisation par homologie. Les informations relatives au récepteur serviront de base pour la conception d'une tête de série.

En effet, dans le cas où la structure 3D de la protéine d'intérêt est connue, il est important de tenir compte des informations qu'elle apporte, en termes de propriétés moléculaires du site actif. Ces informations permettent de mieux définir un pharmacophore très utile au criblage des chimiothèques ou bien d'utiliser une méthode d'assemblage ligand-protéine ou encore le docking moléculaire qui consiste à positionner la molécule au sein du récepteur.

Le docking moléculaire qui veut dire "chargement moléculaire" ou encore "arrimage moléculaire" est l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation de complexes moléculaires.

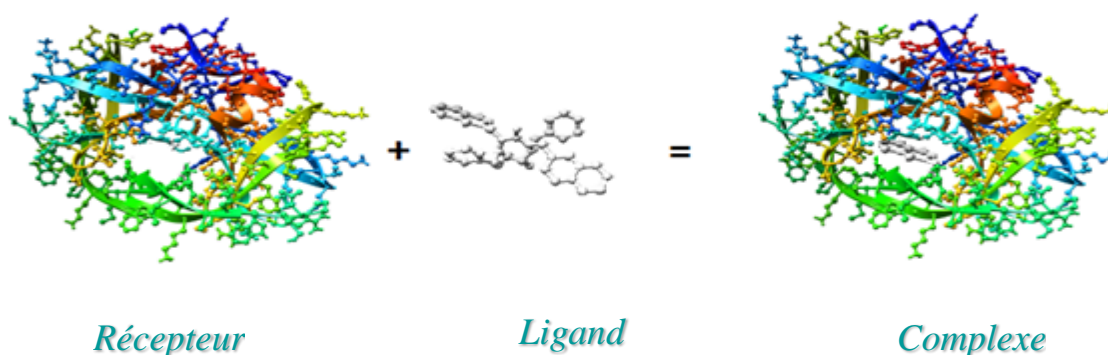


Figure 2 : Illustration schématique du processus de docking.

Les programmes de docking moléculaire, disponibles actuellement, sont basés sur l'hypothèse que les ligands formant des interactions favorables avec le récepteur doivent avoir une affinité de liaison élevée [32]. Ils reposent sur l'exploration systématique de l'espace des configurations pour générer et évaluer un grand nombre de liaisons potentielles. Cependant, les ordinateurs ne possèdent pas l'expérience, l'intuition et l'expertise des scientifiques à analyser les liaisons établies pour générer des solutions robustes et fiables. Les techniques de docking moléculaire actuelles nécessitent donc un utilisateur bien averti dans ce domaine et sachant bien exploiter ses résultats ainsi que son intuition.

Les principaux défis dans ce domaine sont [33, 34]:

- La prédiction de l'assemblage des molécules.
- L'identification des facteurs qui déterminent la spécificité de l'interaction.
- L'analyse visuelle des interactions ligand-récepteur permettant une interprétation intuitive et la compréhension du processus de liaison.
- L'identification de nouveaux ligands avec différents modes de liaisons.

Le chercheur utilisant la technique de docking peut être comparé à un serrurier qui essaye successivement les clés d'un trousseau sur une serrure inconnue, la serrure étant la cible moléculaire et le trousseau de clés la chimiothèque contenant les ligands. Les logiciels de docking calculent donc l'énergie d'interaction entre ce ligand potentiel et la macromolécule cible. Les molécules qui présentent des interactions favorables seront ensuite étudiées expérimentalement. Cette technique utilisée en criblage virtuel permet de "tester" quelques dizaines de milliers de molécules par jour sur un ordinateur standard actuel.

3-Les différents types de docking

Au début des années 80, une approche de modélisation moléculaire par docking a été, pour la première fois, étudiée par Kuntz et ses collaborateurs [35]. Ils ont proposé la stratégie du 'tout rigide' dans laquelle l'exploration de l'espace des positions (discrétisé par l'emploi d'une grille) se limite au positionnement du ligand. Ensuite, l'essor des moyens de calcul a permis de considérer le système d'étude comme semi-flexible voire flexible.

Ainsi, selon les protocoles propres à chaque logiciel, nous pouvons avoir trois types de docking :

a- ***Le docking rigide :***

Le ligand est rigide et la recherche de la pose optimale se limite au positionnement. On parle du concept clé-serrure, ne considérant que des corps rigides capables d'interagir lorsqu'ils présentent une compatibilité géométrique parfaite. Cette notion a été introduite par Emile Fisher en 1894 [36].

b- ***Le docking semi-flexible :***

Le ligand est flexible afin d'explorer toutes ses conformations possibles, alors que la cible est maintenue rigide durant l'assemblage. Ce type de docking présente, certes, l'avantage de nécessiter un temps de calcul relativement court mais il ne tient pas compte des changements conformationnels, requis par la cible. De nombreuses études utilisant cette stratégie semi-flexible ont conduit à des résultats concluants [37, 38]. Cependant les protéines demeurent en mouvement permanent et l'enjeu majeur est donc aujourd'hui d'introduire les déformations du récepteur (protéine).

c- ***Le docking flexible :***

Le ligand est totalement flexible, alors que la cible l'est partiellement. En fait, seuls les résidus dits pertinents car jouant un rôle dans l'interaction avec le ligand sont concernés par cette flexibilité. Ceci représente un véritable challenge pour le docking à cause de la flexibilité des ligands présentant plusieurs rotations libres. Ce type de docking a la qualité de mieux simuler la réalité mais nécessite des temps de calcul importants.

Le développement d'un programme de docking prenant en compte explicitement la flexibilité de la protéine, est toutefois une tâche délicate car le nombre de degrés de liberté associé à une telle représentation peut s'avérer très important (≈ 15000).

Actuellement, il existe de nombreux outils de docking qui se répartissent en deux grandes catégories selon la méthode utilisée : l'ajustement de fragments (*matching*) ou la simulation de trajectoires.

Le modèle de l'ajustement de fragment commence par construire un modèle « en négatif » du site actif. Il est constitué par le volume accessible du site et les points d'interaction tels que les sites de liaison hydrogène, les charges ou les sites lipophiles. Les ligands sont décomposés en fragments puis reconstruits dans le modèle négatif du site, en essayant de faire correspondre les géométries ainsi que les fonctions chimiques. Des logiciels tels que DOCK [39, 40] ou

SURFLEX [41] qui utilisent cette approche permettent notamment un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés.

La seconde approche, dite par trajectoire, est plus précise. En effet, à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand explore le site étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Les mouvements sont effectués par des opérations de translation et de rotation.

L'énergie d'interaction est calculée par une fonction énergétique. Les mouvements du cycle à venir sont guidés par les variations d'énergie induites par les mouvements des cycles précédents. L'algorithme s'arrête lorsqu'il a trouvé la position idéale du ligand dans le récepteur. Ces techniques sont plus lentes que celles par *matching* mais prennent mieux en compte la flexibilité du complexe ligand-récepteur et permettent ainsi l'exploration de régions plus vastes.

Le logiciel AutoDock [42,43] que nous avons utilisé permet d'explorer l'espace conformationnel moyennant plusieurs méthodes de recherche parmi lesquelles on peut citer : algorithme génétique Darwinien (AG), algorithme génétique Lamarckien (AGL) et la technique Monte-Carlo appliquée avec recuit simulé (RSMC)[44].

La version 4 d'Autodock, utilisée dans ce travail, recherche les poses au sein du site actif au moyen de l'algorithme génétique Lamarckien, que nous présentons ci-dessous :

4- Algorithme Génétique Lamarckien (AGL)

La plupart des algorithmes génétiques, reproduisent le comportement de l'évolution darwinienne, en appliquant le principe de la génétique de Mendel, c'est-à-dire le transfert à sens unique des informations du génotype vers le phénotype. Ce comportement est illustré par la partie droite de la Figure 3.

Par contre, dans le cas où il existe un mécanisme de transcription inverse, un génotype peut être induit par un phénotype. Il est alors possible, pour un individu, d'acquérir de nouveaux caractères génétiques en fonction de son environnement. Les enfants pourront hériter, à leur tour, de ces caractères acquis durant la vie de leur parent.

Dans le cadre de l'interaction ligand-récepteur, on peut ainsi effectuer une optimisation locale du ligand par rapport au récepteur et remonter les informations du phénotype optimisé vers le génotype de l'individu. Ce comportement est illustré par la partie gauche de la Figure 3. C'est ce qu'on appelle un algorithme génétique lamarckien, par analogie avec la théorie,

aujourd'hui discréditée, de Jean Baptiste de Lamarck selon laquelle les caractéristiques acquises par un individu durant sa vie pouvaient devenir héréditaires [45].

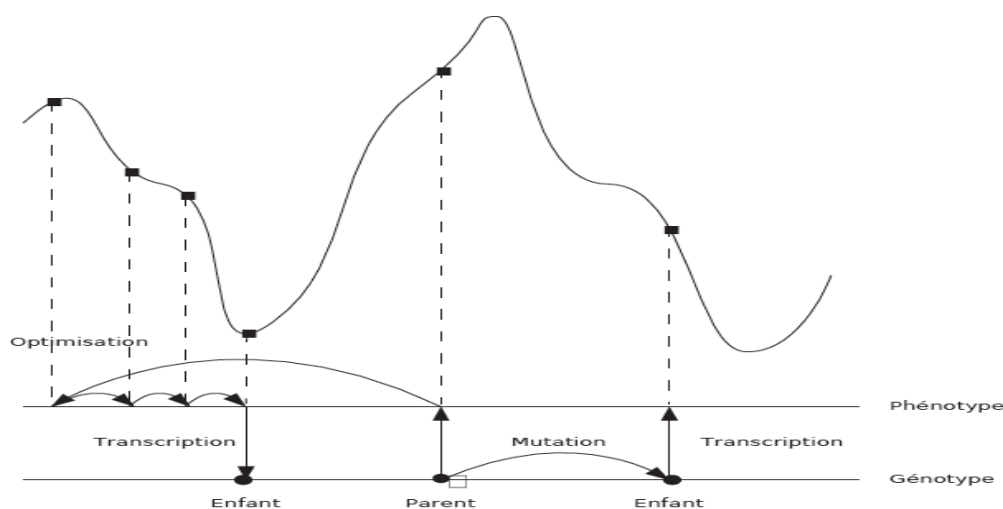


Figure 3 : Comportement des algorithmes génétiques, principes de Darwin (à droite) et de Lamarck (à gauche).

AutoDock dispose d'un AGL dont la phase d'optimisation locale est particulière. En effet, toutes les adaptations environnementales du ligand acquises pendant l'optimisation locale seront transmises aux conformations éventuellement générées. Cette optimisation locale est une variante de Solis – Wets [46] dans laquelle la taille du pas est différente pour chaque type de gène : une variation de 1 Å dans un gène de position aura beaucoup plus d'impact qu'une variation de 1° dans un gène d'orientation ou de torsion.

Aussi la taille du pas pour un gène de position est paramétrée par défaut à 1,0 Å alors que la taille du pas pour un gène d'orientation ou de torsion est par défaut de 50°. A chaque génération, il est possible de faire une optimisation locale sur une fraction de la population. L'efficacité du docking est sensiblement améliorée avec une fréquence d'optimisation locale de seulement 6 % alors que le gain supplémentaire pour une fréquence de 100 % est très faible.

Il existe actuellement plusieurs logiciels qui se distinguent par leurs forces et leurs faiblesses [47]. Nous citons les plus utilisés [48] dans le tableau ci-dessous.

Tableau 2: Principaux programmes de docking moléculaire

<i>Nom</i>	<i>Editeur</i>	<i>Site Internet</i>
AutoDock	Scripps	http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/
Gold	CCDC	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/
FlexX	BioSolveIT	http://www.biosolveit.de/FlexX/
Fred	OpenEyes	http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html
Glide	Schrodinger	http://www.schrodinger.com/Products/glide.html
Dock	UCSF	http://dock.compbio.ucsf.edu/
ICM	Molsoft	http://www.molsoft.com/products.html
LigandFit	Accelrys	http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html
Surflex	Biopharmics	http://www.biopharmics.com/products.html

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le docking a pour objectif d'estimer la viabilité du complexe moléculaire formé. Cette évaluation ou estimation se fait en analysant sur un écran avec une bonne performance graphique, les différentes interactions entre le ligand et le récepteur. Pour cela, il est nécessaire au modélisateur d'avoir quelques connaissances sur ce type d'interactions intermoléculaires qui peuvent se manifester sous plusieurs aspects et différant, en particulier, par leur intensité et leur distance.

◆ Interactions intermoléculaires [49]

Il est important de noter que la structure tridimensionnelle de la protéine est aussi bien stabilisée par des interactions faibles et non covalentes (effets électrostatiques, van der Waals et hydrophobes) que par des liaisons covalentes (ponts disulfure). Ces interactions que nous détaillons ci-dessous se maintiennent quand la protéine se lie avec une molécule, dite son ligand.

Interactions hydrophobes :

L'effet hydrophobe est induit par les composés apolaires. Ces derniers sont dépourvus de groupements chargés ou d'atomes aptes à former des liaisons hydrogène et sont prédisposés à s'associer avec des composés également apolaires. Ils ont tendance à fuir le milieu aqueux environnant ; ce qui permet aux éléments hydrophobes de se regrouper au coeur de la

structure de la protéine et donc de réduire leur surface de contact avec le solvant. Il faut noter que ce type d'interaction est fondamental pour le repliement des protéines et limite la surface de contact avec l'eau.

Dans les protéines, les résidus qui s'avèrent hydrophobes sont : **I, L, A, V, M, W** et **F**.

Interactions de van der Waals :

Ce type d'interactions se manifeste entre tous les atomes constituant le système étudié. Elles sont répulsives à courte distance (inférieure à la somme des rayons de van der Waals) et attractives à longue distance.

Interactions électrostatiques :

Ces interactions s'exercent entre atomes ou molécules polarisés. L'énergie de cette interaction est de l'ordre de quelques kJ/mol, mais pour les gros systèmes (macromolécules), elle devient importante à cause du nombre élevé d'atomes impliqués ; ce qui leur confère un rôle important dans la stabilisation des systèmes protéiniques.

Interactions ioniques ou ponts salins:

Les interactions ioniques se manifestent entre les atomes de charges opposées (mais relativement fortes) et sont appelées : ponts salins. Ces ponts peuvent concerner les résidus chargés positivement (**R, K, H** et l'extrémité **C-terminale**) et ceux chargés négativement (**D, E** et l'extrémité **N-terminale**).

Liaisons hydrogène :

Les liaisons hydrogènes résultent de l'interaction entre un atome électronégatif, tel que l'atome d'oxygène ou l'azote et un atome d'hydrogène, porté par un atome électronégatif.

Les acides aminés polaires ont la possibilité de former des liaisons hydrogène entre eux ou avec des molécules d'eau ; ce qui leur donne une caractéristique hydrophile.

La liaison hydrogène est utilisée en biologie comme un vecteur des interactions intermoléculaires et elle contribue à la reconnaissance moléculaire.

Pont disulfure ou cystéine :

La liaison covalente S-S, appelée généralement pont disulfure, est la seule liaison covalente entre 2 cystéines distantes dans la séquence primaire mais proches dans la structure tertiaire.

Chimiquement, cette interaction est le résultat de l'oxydation entre deux groupements thiol (-SH) appartenant à deux cystéines (C) distantes de 2.2 Å au niveau de la structure tertiaire. Les

ponts disulfures sont donc des points importants à considérer dans un processus de prédiction du repliement et ne concernent jamais la liaison du ligand au récepteur.

Le pont disulfure impose une forte contrainte topologique à la chaîne polypeptidique due à son énergie de liaison estimée à 60 kcal/mol.

Nous récapitulons ces différentes interactions moléculaires ainsi que les énergies mises en jeu, dans la figure 5 et dans le tableau 4, respectivement :

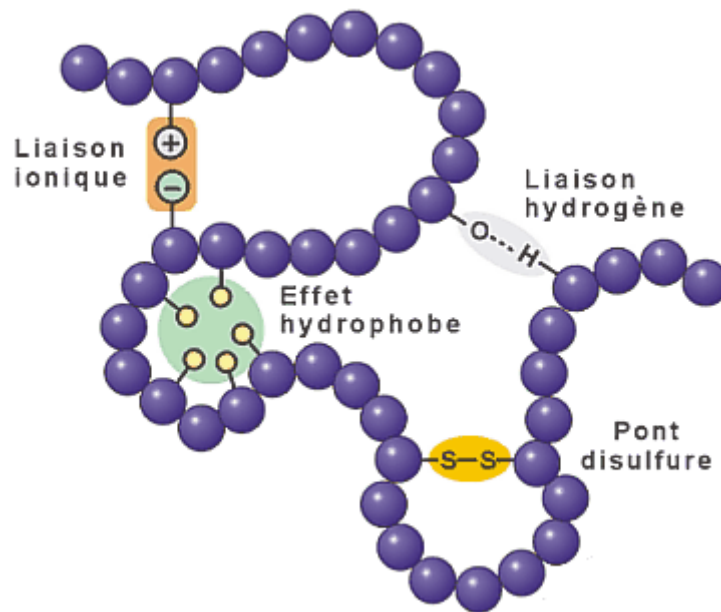


Figure 4 : Représentation des principales interactions dans les protéines.

Tableau 3 : Comparaison des énergies relatives aux différents types d'interactions

Types d'interactions	Energie (kcal/mol)
van der Waals	0,24 - 1
Hydrophobes	0,5 – 2
Hydrogène	1-10
Electrostatique	0,5 - 10
Ionique	40-200
Pont disulfure	60
Covalente	100-500

IV – MATERIAUX UTILISES

1- Molécules étudiées

Les AINS que nous avons étudiés, en premier lieu, dans ce travail ont été tirés de la littérature et correspondent aux 3 principales classes d'inhibiteurs, présentés dans le chapitre I [50, 51]. Nous les donnons dans le tableau suivant avec leur IC_{50} sur les 2 COX.

Tableau 4 : AINS préférentiels COX-1

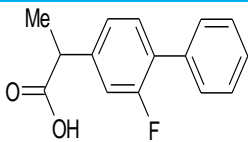
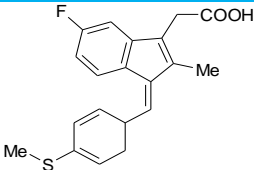
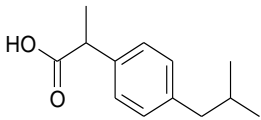
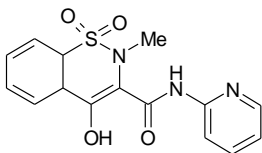
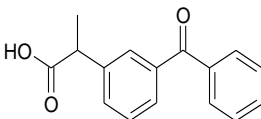
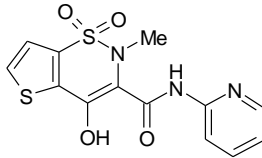
Structure 2D	IC_{50} (μM)		Structure 2D	IC_{50} (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 Flurbiprofène	0.29	2.56	 Sulindac sulfide	1.02	10.43
 Ibuprofène	4.7	>30	 Piroxicam	0.76	8.99
 Kétoprofène	0.02	1.08	 Tenoxicam	7.76	74

Tableau 5 : AINS sélectifs COX-2 (Coxibs)

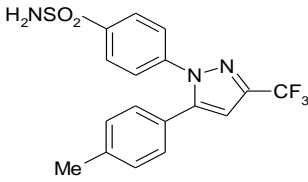
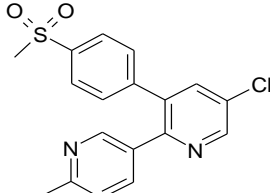
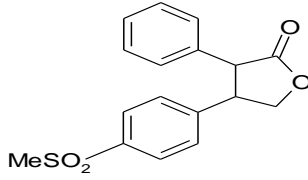
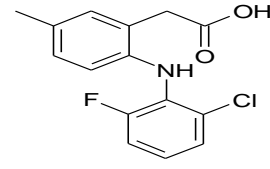
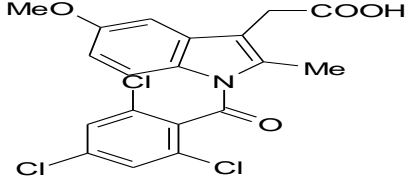
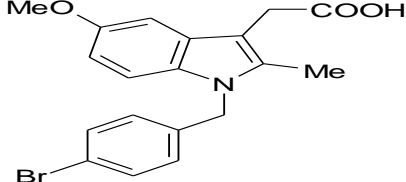
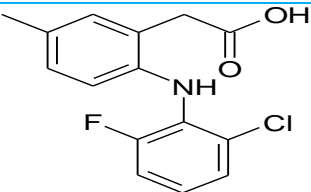
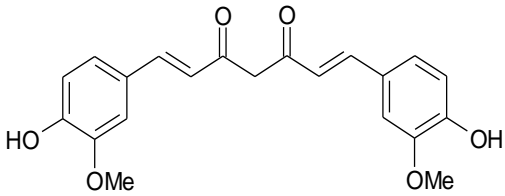
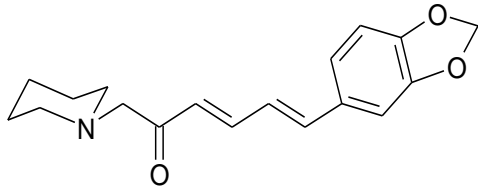
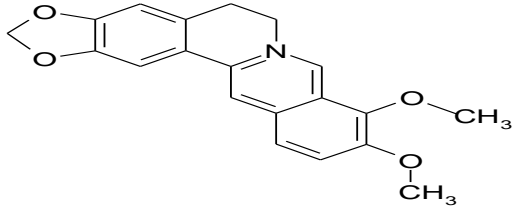
Structure 2D	IC ₅₀ (μM)		Structure 2D	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2		COX-1	COX-2
 <p>célécoxib</p>	>10	0.069	 <p>etoricoxib</p>	116	1.1
 <p>rofécoxib</p>	>10	0.645	 <p>lumiracoxib</p>	67	0.13

Tableau 6 : AINS préférentiels COX-2

Structure 2D	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2
 <p>L-748</p>	>10 μM	0.5
 <p>L-780</p>	>10μM	0.009
 <p>Diclofénac</p>	0.14	0.05

Dans une deuxième partie de nos travaux, nous avons réalisé une étude aussi par docking moléculaire de trois molécules d'origine naturelle, que nous présentons dans le tableau suivant, et pour lesquelles nous ne disposons que de leurs divers profils pharmacologiques dont l'anti-inflammatoire. Cette étude a pour seul but de déterminer le profil sélectif de chacune d'elles.

Tableau 7 : Structures et profils pharmacologiques des molécules naturelles étudiées

Nom	Structure	Vertus Thérapeutiques
Curcumine		<ul style="list-style-type: none"> - Antioxydant plus puissant que la vitamine E - Antiseptique et Antibactérien - Anti-inflammatoire non toxique
Piperine		<ul style="list-style-type: none"> - Antidépresseur en augmentant le taux de la sérotonine - Stimulant des mélanocytes inactifs (traitement du vitiligo) - Anti-inflammatoire et Anti-douleur
Berberine		<ul style="list-style-type: none"> - Antibactérien et Antifongique - Réduit le taux du LDL-cholestérol - Anti-Alzheimer - Anti-inflammatoire sélectif

2 - Cibles utilisées :

Les structures de la COX proviennent de la banque de données PDB « *Protein Data Bank* », la plus grande archive de données structurales de macromolécules biologiques. Ces données sont principalement obtenues par cristallographie, aux rayons X et résonance magnétique nucléaire (RMN).

De nombreuses informations associées à chaque structure, sont accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique, par un serveur internet (<http://www.rcsb.org/pdb/>). On peut y trouver la séquence correspondante, ses coordonnées atomiques, les conditions expérimentales ainsi que les conditions de cristallisation et les images 3D [52].

a - Choix de la structure cristallographique :

Dans le but de choisir de manière rationnelle la structure cible des ligands à étudier, nous avons dû, dans une première étape, extraire un certain nombre de structures cristallographiques de la PDB. Nous présentons dans les tableaux suivants le ligand co-cristallisé ainsi que son profil et les caractéristiques du complexe [53].

Tableau 8 : Structures cristallographiques du complexe de la COX-1.

<i>Code</i>	<i>Ligand</i>	<i>Rx</i>	<i>R</i>	<i>Année</i>
2ALY	Flurbiprofène	2	0.237	2006
3N8Y	Diclofénac	2.61	0.223	2010
1EQG	Ibuprofène	2.61	0.223	2011
2OYU	Indometacine	2.7	0.241	2007

Tableau 9 : Structures cristallographiques du complexe de la COX-2.

<i>Code</i>	<i>Ligand</i>	<i>Rx</i>	<i>R</i>	<i>Année</i>
3LN0	5c-s	2.2	0.212	2010
3LN1	Celecoxib	2.4	0.235	2010
3NT1	Naproxéne	1.73	0.168	2010
6COX	Sc-558	2.8	0.220	2011

Notre choix de cible (en code pdb) est issu de la combinaison des facteurs R et de la résolution que nous définissons ci-dessous :

➤ ***Le facteur R:***

Le facteur R est une grandeur indicatrice de l'écart entre les facteurs de structures observés et ceux calculés. Sa valeur est comprise entre 0 et 1 (plus elle est proche de 0, plus la prédiction est juste).

➤ *La résolution Rx*

La résolution de la protéine est une des données reflétant la qualité des structures ayant permis de construire le modèle cristallographique. Généralement, une résolution proche de 1 Å permet de distinguer tous les atomes y compris les hydrogènes. Une résolution de l'ordre de 6 Å permet seulement de distinguer les structures de types «hélice α » ou «feuille β » par exemple.

Selon la littérature, une structure cristallographique, assez précise et bien définie, est une structure dont la valeur du facteur **R** avoisine 0.2 et qui est d'une résolution inférieure ou égale à 2 Å [54].

Moyennant ces critères et aussi les résultats de certaines simulations notre choix s'est fixé sur la **1EQG.pdb** pour la COX-1 et la **3NT1.pdb** pour la COX-2.

3 - Logiciels utilisés :

a - ISIS Draw

ISIS Draw [55] est l'outil que nous avons utilisé pour le dessin en 2D des structures des ligands. Ce logiciel possède une banque d'atomes sous différents états d'hybridation permettant de construire tous les groupements chimiques éventuels. Son interface est très simple ce qui facilite l'utilisation de ses menus. Les principaux avantages de ce logiciel sont :

- ✓ présentation claire et simple des options,
- ✓ menus complets pour la modification des structures,
- ✓ Templates: orbitales atomiques, acides aminés,...
- ✓ Add-in AutoNom pour générer les noms des molécules en suivant les lois IUPAC,
- ✓ Interface avec RasMol, permettant la visualisation en 3D
- ✓ sauvegarde des structures
- ✓ exportation possible vers d'autres logiciels (traitement de texte par exemple).

b- ChemOffice :

ChemOffice [56] est une suite de logiciels allant du dessin à la modélisation et à la collecte des informations de type quantique ou classique. Il nous a permis d'optimiser la structure des molécules en utilisant le champ de force MM2.

Chem3D est le logiciel de modélisation moléculaire, doté d'une interface graphique, et une puissante base de données chimiques, permettant d'élaborer un système d'organisation, ou d'accéder à des bases de données commerciales.

Chem3D doté d'une interface graphique et une puissante base de données chimiques, permettant d'élaborer un système d'organisation, ou d'accéder à des bases de données commerciales, présente plusieurs avantages :

- ✓ Créer des graphiques de qualité professionnelle pour la représentation des éléments chimiques et biologiques.
- ✓ Créer des macromolécules biologiques à l'aide d'outils de séquençage des acides aminés et de l'ADN.
- ✓ Simuler le spectre RMN du proton avec fractionnement.
- ✓ Convertir les noms chimiques en structures et vice-versa.
- ✓ Visualiser les structures des protéines et autres structures 3D grâce à des graphiques Open GL de pointe.
- ✓ Réaliser des calculs de mécanique moléculaire et semi-empirique
- ✓ Interfacé avec Gaussian, permettant les calculs quantiques assez précis

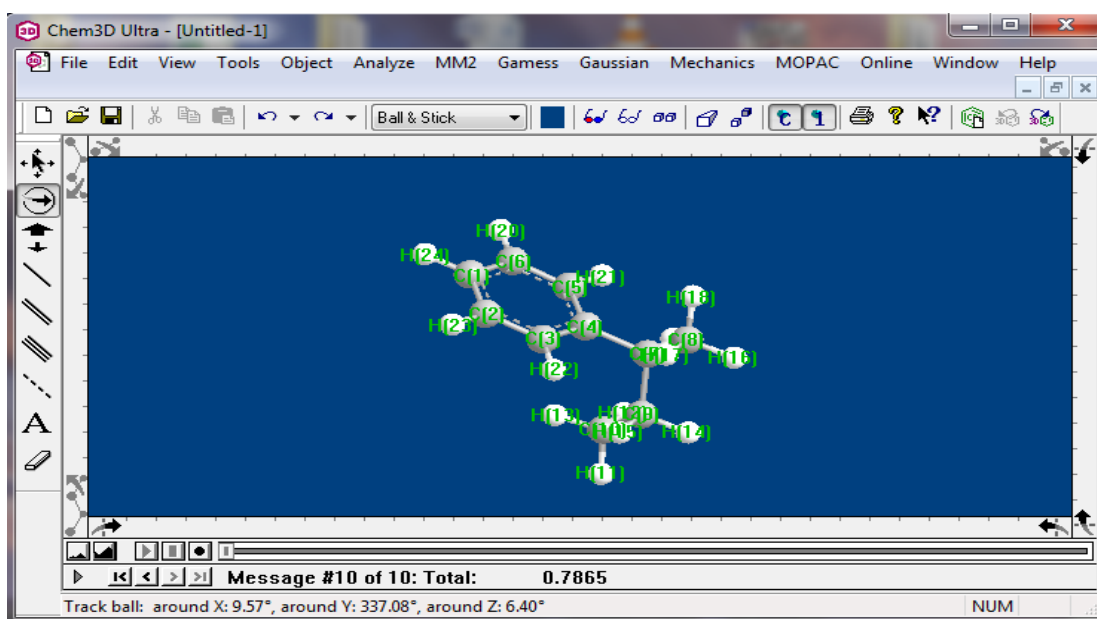


Figure 5 : interface graphique de Chem3D

c - AutoDock

AUTODOCK4 est la dernière version d'AutoDock constitué d'un ensemble de programmes et d'utilitaires pouvant s'exécuter sous environnement Unix, Linux ou Windows. Ce logiciel est destiné à simuler un docking flexible. La flexibilité concerne le ligand et les chaînes latérales des résidus constituant le site actif. Cette version d'AutoDock est constituée essentiellement de 2 programmes : AutoGrid4 et AutoDock4, et est dotée d'une interface graphique AutoDockTools (ADT) (figure 6) permettant la préparation des fichiers de données, la mise en œuvre de la simulation puis la visualisation et l'exploitation des résultats pré-analysés.

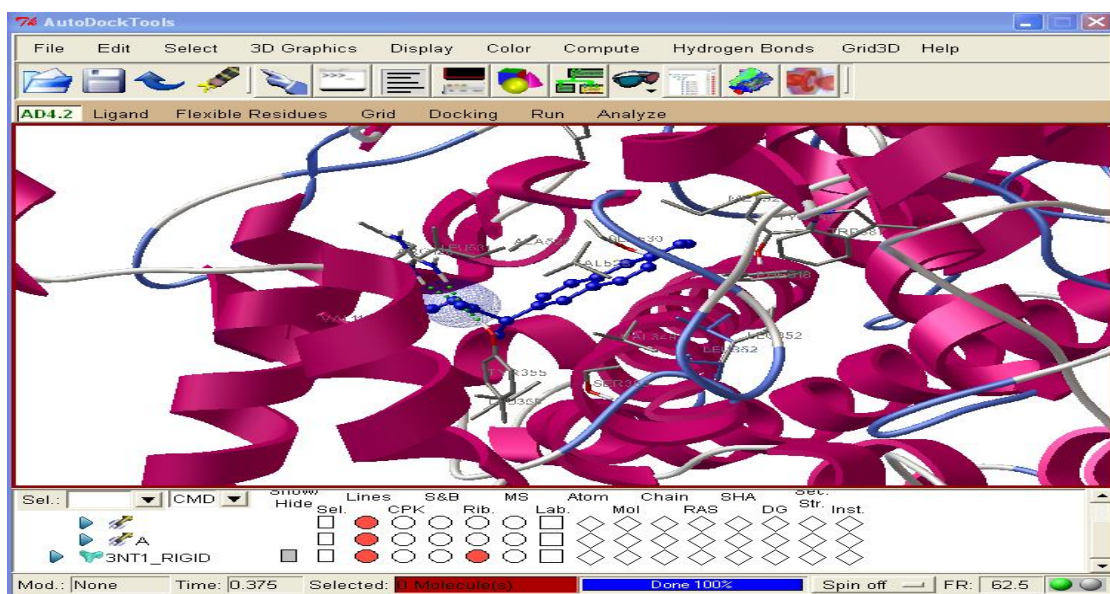


Figure 6 : Interface graphique d'AutoDock4

Les étapes à exécuter, lors d'un docking par AUTODOCK4, sont les suivantes :

➤ *Préparation des fichiers de coordonnées atomiques et de la flexibilité*

La protéine doit être représentée avec ses hydrogènes polaires ainsi que les charges partielles de tous ses atomes. Les charges disponibles dans AutoDock sont celles de Gasteiger et de Kollman.

Les résidus du site actif à considérer flexibles doivent être sélectionnés. La protéine ainsi préparée est enregistrée dans deux fichiers distincts : l'un regroupant les résidus flexibles du site actif et l'autre, la partie rigide de la protéine. Les deux fichiers doivent être en format *pdbqt* qui reprend le format *pdb* (*Protein Data Bank*) avec deux colonnes supplémentaires pour les charges et les types d'atomes.

Quant au ligand, il doit comporter tous ses hydrogènes et toutes ses charges partielles. La flexibilité du ligand est simulée par la rotation des groupements autour des liaisons non rigides. Les degrés de liberté qui correspondent aux libres rotations des groupements autour des liaisons simples sont détectés et affichés grâce à ADT. Le fichier de coordonnées atomiques du ligand est aussi enregistré en format *pdbqt*. Lors de l'étape de docking, AutoDock fait varier les différents degrés de liberté du ligand (axes de translation, de rotation et angles dièdres) à l'intérieur de la grille que nous définissons ci-dessous.

➤ *Calcul de la grille de potentiel d'interaction*

Une grille de potentiels d'interaction est une boîte à définir dans la protéine et dans laquelle des solutions (ou conformations) de docking pour un ligand donné sont recherchées. C'est une matrice tridimensionnelle, évaluée par Autogrid4, englobant l'intégralité ou une région intéressante du site actif du récepteur étudié (**Figure 7**). Son intérêt est de faciliter le positionnement du ligand dans la macromolécule et d'augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie d'interaction ligand/récepteur. Pour chaque atome du ligand, AutoGrid4 calcule l'énergie d'interaction entre un atome sonde placé en un point de la boîte et l'ensemble de la macromolécule. L'espacement entre les points peut aller de 0,2 Å à 1,0 Å. Si le ligand est constitué d'un certain nombre d'atomes différents, il y aura une matrice pour chacun de ces atomes. Deux matrices ou cartes supplémentaires sont calculées pour les potentiels d'interaction électrostatique et de désolvatation. La grille doit englober le site actif dont la connaissance est pertinente mais le temps de calcul pour l'explorer sera fonction de ses dimensions. Le volume explorable est donc limité par le temps et la puissance de moyens de calcul dont on dispose.

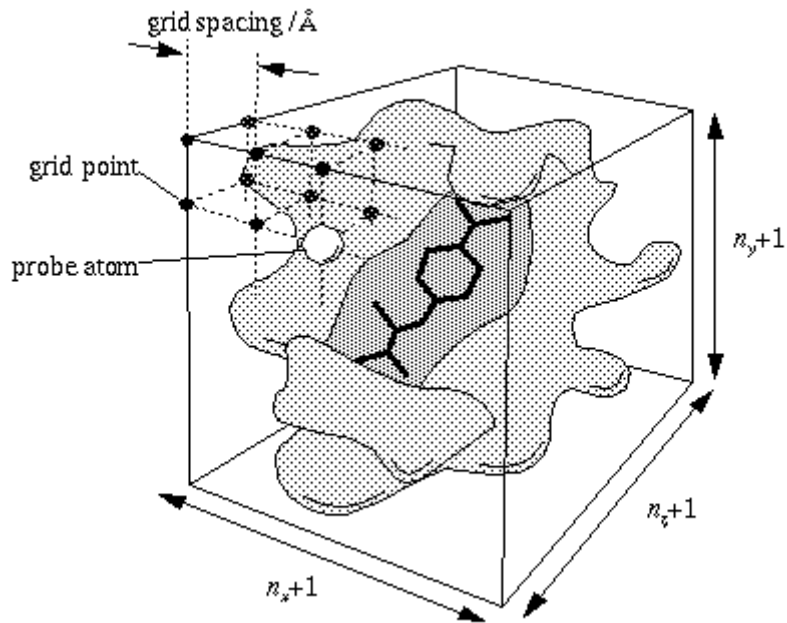


Figure 7: Schéma d'une grille de potentiel englobant le site actif d'une macromolécule.

Les grilles de potentiels sont calculées par le programme AutoGrid4 selon les instructions du fichier de données fourni par le modélisateur. Ce fichier texte dont l'extension est *gpf* (*Grid Parameters File*), doit contenir les paramètres suivants :

- les noms des fichiers du ligand et de la macromolécule, aux formats *pdbqt*.
- la position et les dimensions de la boîte ainsi que l'espacement entre les points de la grille.

➤ *Recherche des solutions de docking*

AutoDock4 fait une recherche de solutions de docking en fonction des paramètres qu'on lui transmet par l'intermédiaire du fichier *dpf* (*Dock Parameters File*). Cette recherche nécessite :

- les fichiers contenant le ligand, le récepteur et les grilles de potentiel à utiliser
- l'état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précisée)
- la méthode de recherche conformationnelle à utiliser (RSMC, AG ou AGL) avec les paramètres correspondants.

Les paramètres de l'algorithme génétique, à fixer par le modélisateur, sont :

- Le nombre de cycles à exécuter (*Number GA Runs*) c'est le nombre de solutions souhaitées.
- La taille de la population (*Population Size*). La valeur standard est de 150 mais peut être modifiée en fonction du nombre de degrés de liberté et de l'étendue de la boîte à explorer.
- Le nombre maximum d'évaluations d'énergie (*Maximum Number of evals*). C'est un paramètre d'arrêt du docking utile lorsque le processus met trop de temps, ou ne parvient pas, à converger.
- Le nombre maximum de générations qui est un autre paramètre d'arrêt (*Maximum Number of generations*).
 - Ces deux paramètres sont à adapter conjointement en fonction de la taille de la population, du nombre de degrés de liberté, de l'étendue de la boîte à explorer et du degré de convergence à atteindre.
- Le niveau de sélection élitiste (*Maximum Number of top individu that automatically survive*) : le nombre des meilleurs individus qui survivent automatiquement à la génération suivante. C'est un paramètre défini par l'utilisateur, il indique combien des meilleurs individus survivent automatiquement à la génération suivante. Par défaut, cette valeur est 1 : le meilleur uniquement.
- Le taux de mutations (*Rate of gene Mutation*). Cet opérateur joue un rôle d'optimiseur local pour les AGs purs (darwinien) en opérant des variations de faible amplitude sur les gènes, chose que le croisement fait très difficilement. La valeur standard est 0,02.
- Le taux de croisements (*Rate of Crossover*). Le croisement est l'opérateur d'exploration globale, sa probabilité doit être élevée pour que l'AG ait ce caractère global. La valeur standard est 0,8.
- Les valeurs assimilables à la moyenne et la variance de la distribution de Cauchy pour la mutation des gènes (*Mean of Cauchy and Variance of Cauchy distributions for gene mutation*). Les valeurs standard sont 0 et 1 respectivement.
- Le nombre de générations précédentes N dans lesquelles on recherche l'individu le plus mal adapté pour calculer le facteur de sélection proportionnelle. La valeur optimale est de 10 générations.

- A la fin de chaque cycle d'exploration, AutoDock4 enregistre la meilleure solution de docking du cycle. Le fichier de résultats contiendra donc autant de solutions que de cycles exécutés et se présente en fichier textuel portant l'extension *dlg*.

➤ *Analyse et évaluation des résultats*

AutoDock4 fait une première analyse des résultats en regroupant les solutions en familles (clusters) en fonction de la valeur du RMSD (*Root Mean Square Deviation*) et des énergies de liaison ligand/récepteur calculées. Si le RMSD entre deux conformations est inférieure à une valeur dite seuil, ces deux solutions seront dans la même classe. Ce seuil appelé « tolérance de classe » est pris par défaut par AutoDock4, égal à 2 Å. Le résultat de la pré-analyse s'affiche comme suit, sous forme d'histogramme représentant les clusters de différente taille qui est fonction de la population.

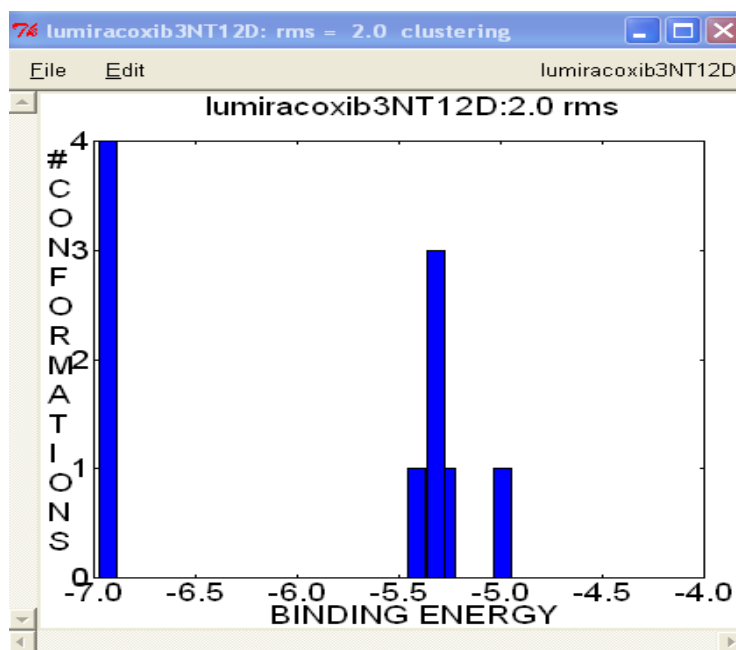


Figure 8 : Histogramme représentant les clusters.

Un ligand peut adopter différents modes de liaison avec le récepteur et le modèle de l'énergie n'est pas parfait. Il est donc intéressant d'obtenir plusieurs classes sur une gamme d'une dizaine de kcal.mol⁻¹. Elles peuvent révéler ces différents modes de liaison. Le nombre de classes obtenu dépend du degré de convergence de la recherche et c'est en jouant sur le nombre d'évaluations de l'énergie et le nombre de générations qu'on module le nombre de classes obtenues.

V – METHODOLOGIE UTILISEE

Il faut noter que nous avons adopté le même protocole de simulation avec les 2 cibles inflammatoires : COX-1 et COX-2

1- PREPARATION DES FICHIERS

a- les protéines :

Une seule chaîne des structures **1EQG** et **3NT1**, dépourvue des molécules d'eau, des autres composés et du ligand co-cristallisé, est sélectionnée pour la préparation de la structure de la cible.

La macromolécule doit être représentée avec ses hydrogènes polaires ainsi que les charges partielles de tous ses atomes, il ne faut ajouter que les hydrogènes dits polaires et assigner les charges. La protéine ainsi préparée est enregistrée dans un fichier au format PDBQT.

✓ *Détermination du site actif :*

Une étape fondamentale dans la stratégie du docking, est l'identification des résidus pouvant intervenir dans le processus de reconnaissance du ligand. Un ligand cristallisé avec le récepteur est susceptible de renseigner sur la position du site actif.

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I, la COX possède un site actif, de nature majoritairement hydrophobe. Nous avons déterminé le site actif, en termes de résidus englobant l'inhibiteur, en considérant tous les acides aminés, qui se trouvent à 8Å du centre du ligand co-cristallisé avec la cible. Nous donnons les résultats dans le tableau suivant :

Tableau 10 : Résidus constituant le site actif de 1EQG et de 3NT1

1EQG	3NT1
VAL116, ARG120, VAL349, GLN350 , LEU352, SER353, TYR355, LEU359, TYR385, TRP387, MET522, PHE518, ILE523, GLU524, MET525, GLT526, ALA527, PRO528, PHE529, SER530, LEU531, LEU534	VAL116, ARG120, VAL349, GLN350 , LEU352, SER353, TYR355, LEU359, TYR385, TRP387, MET522, PHE518, VAL523, GLU524, LEU525, GLT526, ALA527, PRO528, PHE529, SER530, LEU531.

✓ **Partie flexible de la protéine :**

Comme nous l'avons déjà mentionné, Autodock4 permet d'effectuer un docking flexible ; nous avons donc appliqué la flexibilité au ligand et au site actif. Il faut noter qu'il ne permet pas plus de 32 rotules entre le ligand et la protéine ; ce qui nous a contraint à fixer certains résidus, pour n'en garder et enregistrer comme partie flexible que ceux listés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 11 : Résidus considérés flexibles dans la 1EQG/3NT1

1EQG	3NT1
ARG120, VAL349, LEU352, SER353, TYR355, LEU359, TYR385, TRP387, MET522, PHE518, ILE523, ALA527, PHE529, SER530, LEU531.	ARG120, VAL349, LEU352, SER353, TYR355, LEU359, TYR385, TRP387, MET522, PHE518, VAL523, ALA527, PHE529, SER530, LEU531.

b- Les ligands :

Nous avons optimisé les structures, dessinées sous isis Draw, dans le champ de forces MM2 [22].

En utilisant l'interface graphique AutodockTools (ADT), nous avons assigné les charges partielles de Gasteiger aux atomes. Un "centre de masse" pour les mouvements rigides externes, ainsi que les rotules permettant les déformations internes du ligand, ont été définis. Le fichier contenant l'ensemble de ces informations, ainsi que les coordonnées atomiques, charges et types atomiques de chaque ligand est enregistré en format *pdbqt*.

c- Paramètres de calcul :

c-1- Autogrid

Les grilles de potentiels sont calculées selon les instructions du fichier de paramétrage qu'on lui fournit. Le fichier de paramétrage est un fichier texte dont l'extension est *gpf* (*Grid Parameters File*) (fig.10). Les paramètres, codés par des mots clé, indiquent :

- ✓ les noms des fichiers du ligand et du récepteur, aux formats *pdbqt* respectivement.
- ✓ la position et les dimensions de la boîte ainsi que l'espacement entre les points de la grille.
- ✓ les noms des types d'atomes présents dans le ligand et pour lesquels il faut calculer une grille.
- ✓ Chaque grille calculée est enregistrée 'automatiquement' dans un fichier dont l'extension est *map*.

La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de ce ligand. Par conséquent, il est nécessaire d'éditer ce fichier pour modifier les paramètres de position et de dimension de la boîte, afin de l'ajuster au mieux à la région du récepteur que l'on étudie.

Nous présentons la grille que nous avons choisie :

➤ **Pour la COX-1**

Elle présente un volume égal à : $(58 \times 46 \times 68) \text{ \AA}^3$. L'espacement entre chaque point de la grille est de 0.375 \AA . Cette valeur, prise par défaut par AutoDock, correspond au quart de la longueur d'une simple liaison C-C. Il faut noter que ce paramètre peut varier de 0.2 à 1.0 \AA , suivant la précision désirée de la grille.

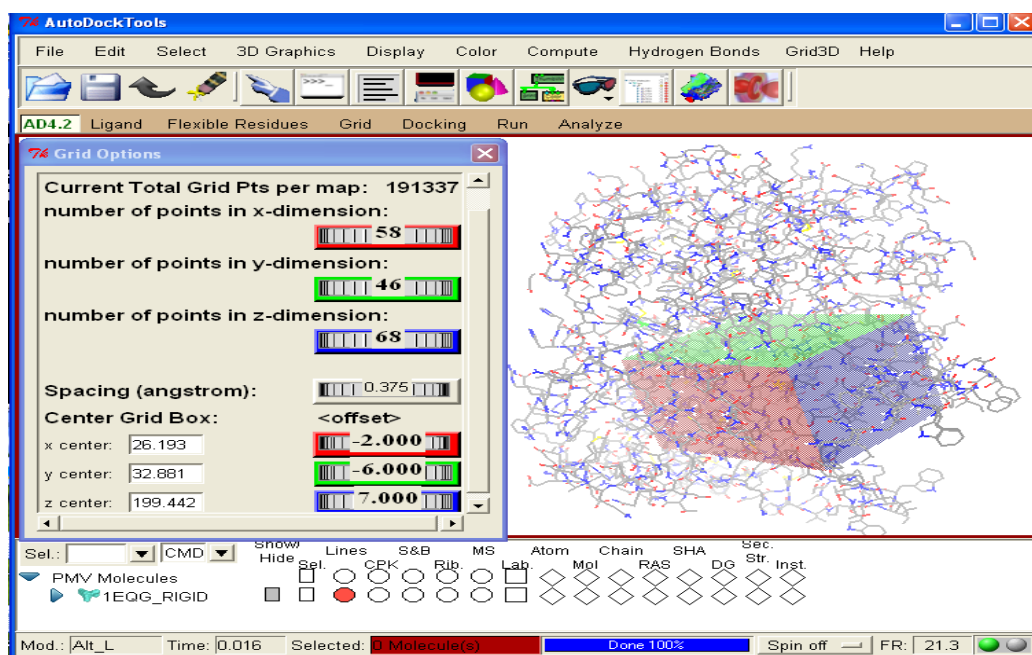


Figure 9 : Présentation de la grille potentielle de la 1EQG (COX-1).

Ci-dessous nous donnons le fichier textuel (format *gpf*) permettant le calcul des grilles de potentiel

```

npts 58 46 68 # num.grid points in xyz
gridfld 1EQG-RIGID2r.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C Fe HD N OA SA # receptor atom types
ligand_types A C HD OA F N # ligand atom types
receptor 1EQG-RIGID2r.pdbqt # macromolecule
gridcenter 26.148 32.839 199.509 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map 1EQG-RIGID2r.A.map # atom-specific affinity map
map 1EQG-RIGID2r.C.map # atom-specific affinity map
map 1EQG-RIGID2r.HD.map # atom-specific affinity map
map 1EQG-RIGID2r.OA.map # atom-specific affinity map
map 1EQG-RIGID2r.F.map # atom-specific affinity map
map 1EQG-RIGID2r.N.map # atom-specific affinity map
elecmap 1EQG-RIGID2r.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap 1EQG-RIGID2r.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant

```

Figure 10 : Présentation d'une grille de potentiel de la 1EQG au format *gpf*.

➤ *Pour la COX-2*

Comme le site actif est plus volumineux que celui de la COX-1, la taille de la grille présente un volume égal à : 249984 \AA^3 ($56 \times 72 \times 62$). L'espacement entre chaque point de la grille est de 0.375 \AA .

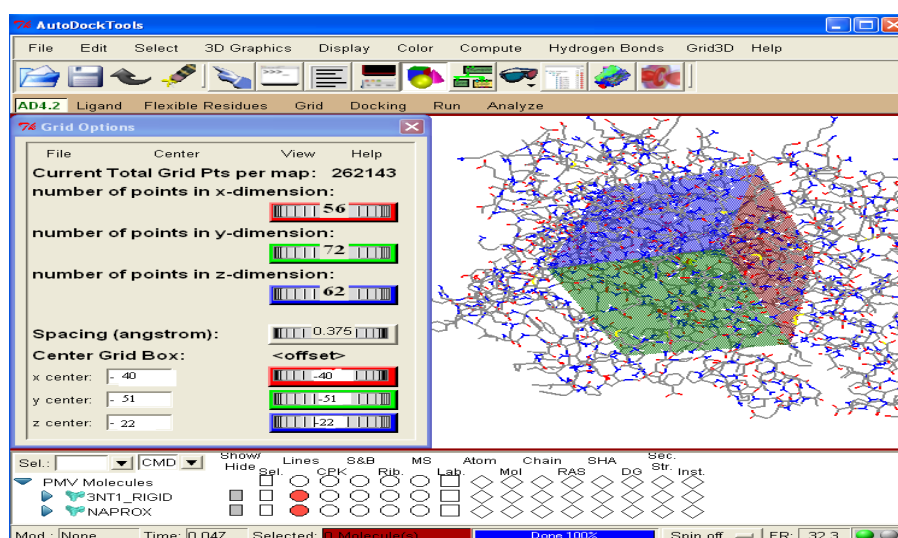


Figure 11 : Présentation de la grille potentielle de la 3NT1 (COX-2).

Nous donnons ci-dessous, le fichier textuel (en format *gpf*) permettant le calcul des grilles dans la COX-2

```
npts 56 72 62 # num.grid points in xyz
gridfld 3NT1_RIGID.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C Fe HD N NA OA SA # receptor atom types
ligand_types A C HD OA N NA SA # ligand atom types
receptor 3NT1_RIGID.pdbqt # macromolecule
gridcenter -40.0 -51.0 -22.0 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map 3NT1_RIGID.A.map # atom-specific affinity map
map 3NT1_RIGID.C.map # atom-specific affinity map
map 3NT1_RIGID.HD.map # atom-specific affinity map
map 3NT1_RIGID.OA.map # atom-specific affinity map
map 3NT1_RIGID.N.map # atom-specific affinity map
map 3NT1_RIGID.NA.map # atom-specific affinity map
map 3NT1_RIGID.SA.map # atom-specific affinity map
elecmap 3NT1_RIGID.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap 3NT1_RIGID.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0, constant
```

Figure 12 : Présentation d'une grille de potentiel de la 3NT1 au format *gpf*.

c-2- Autodock

Dans ce travail, le docking moléculaire se déroule en deux étapes principales. Dans la première étape, chaque ligand, est docké dans le site actif de la COX en utilisant les paramètres par défaut d'AutoDock4 sauf pour le nombre de cycles à exécuter, c'est-à-dire le nombre de solutions souhaitées, lequel a été repoussé à 100.

Dans la deuxième étape, la conformation ayant la plus petite énergie obtenue dans la première étape, pour chaque composé, a été utilisée comme point de départ.

AutoDock réalisera cette recherche en fonction des paramètres fournis préalablement par l'intermédiaire d'un fichier *dpr* (*Dock Parameters File*) (fig.13).

Nous donnons ci-dessous le fichier contenant les paramètres de calcul AGL en format *dpr* :

```

autodock_parameter_version 4.2      # used by autodock to validate parameter set
outlev 1                             # diagnostic output level
intelec                             # calculate internal electrostatics
seed pid time                        # seeds for random generator
ligand_types A C OA HD F N          # atoms types in ligand
fld 1EQG_RIGID.maps.fld             # grid_data_file
map 1EQG_RIGID.A.map                # atom-specific affinity map
map 1EQG_RIGID.C.map                # atom-specific affinity map
map 1EQG_RIGID.OA.map               # atom-specific affinity map
map 1EQG_RIGID.HD.map               # atom-specific affinity map
map 1EQG_RIGID.F.map                # atom-specific affinity map
map 1EQG_RIGID.N.map                # atom-specific affinity map
elecmap 1EQG_RIGID.e.map            # electrostatics map
desolvmap 1EQG_RIGID.d.map          # desolvation map
move FLURBI.pdbqt                   # small molecule
flexres 1EQG_FLEX.pdbqt             # file containing flexible residues
about -0.7896 -0.0829 0.6995        # small molecule center
tran0 random                         # initial coordinates/A or random
axisangle0 random                   # initial orientation
dihe0 random                         # initial dihedrals (relative) or random
tstep 2.0                            # translation step/A
qstep 50.0                           # quaternion step/deg
dstep 50.0                            # torsion step/deg
torsdof 4                            # torsional degrees of freedom
rmstol 2.0                           # cluster_tolerance/A
extnrg 1000.0                        # external grid energy
e0max 0.0 10000                      # max initial energy; max number of retries
ga_pop_size 150                       # number of individuals in population
ga_num_evals 2500000                  # maximum number of energy evaluations
ga_num_generations 27000              # maximum number of generations
ga_elitism 1                          # number of top individuals to survive to next generation
ga_mutation_rate 0.02                 # rate of gene mutation
ga_crossover_rate 0.8                 # rate of crossover
ga_window_size 10                     #
ga_cauchy_alpha 0.0                   # Alpha parameter of Cauchy distribution
ga_cauchy_beta 1.0                   # Beta parameter Cauchy distribution
set_ga                                # set the above parameters for GA or LGA
sw_max_its 300                        # iterations of Solis & Wets local search
sw_max_succ 4                         # consecutive successes before changing rho
sw_max_fail 4                         # consecutive failures before changing rho
sw_rho 1.0                            # size of local search space to sample
sw_lb_rho 0.01                       # lower bound on rho
ls_search_freq 0.06                   # probability of performing local search on individual
set_psw1                              # set the above pseudo-Solis & Wets parameters
unbound_model bound                   # state of unbound ligand
ga_run 50                             # do this many hybrid GA-LS runs
analysis                              # perform a ranked cluster analysis

```

Figure 13 : Paramètres de calcul AGL au format dpf

Ci dessous, l'interface graphique (ADT) présentant la préparation des paramètres pour un calcul AGL

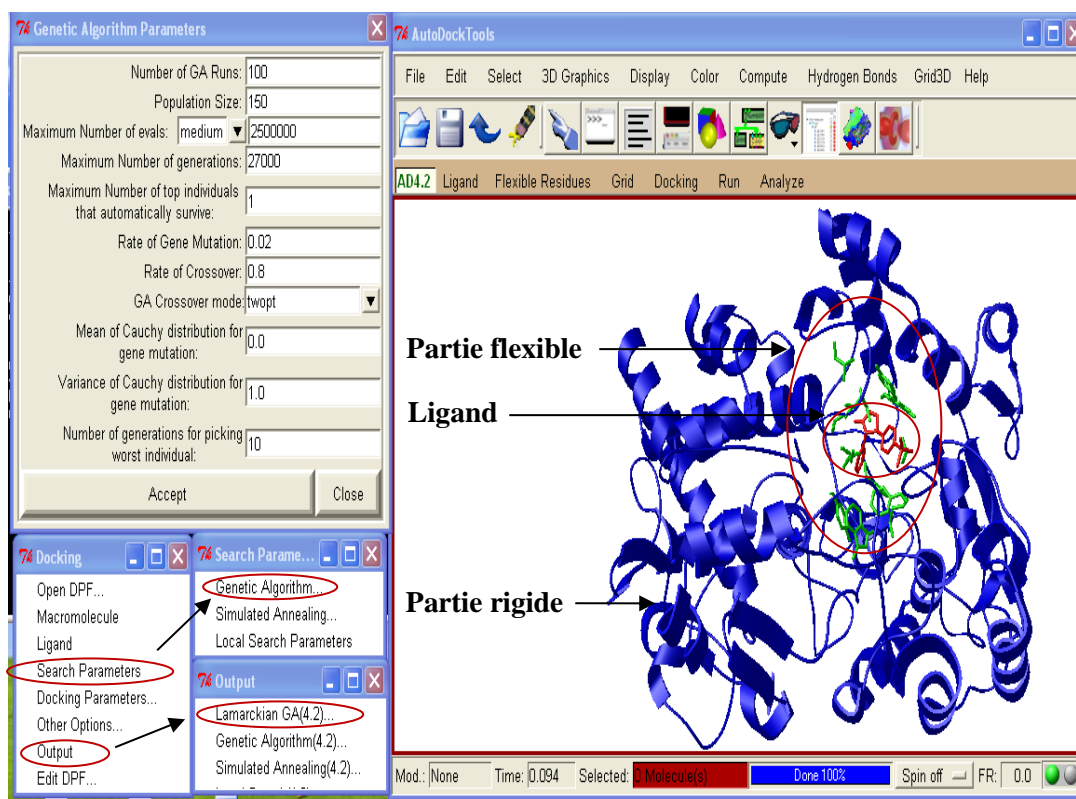


Figure 14 : Interface ADT indiquant les paramètres de calcul AGL

A la fin de chaque cycle d'exploration, AutoDock enregistre la meilleure solution du cycle c'est à dire le phénotype de 'l'individu', ici conformère, de la dernière génération ayant la meilleure interaction avec le ligand. Le fichier de résultats contiendra donc autant de solutions que de cycles exécutés. Ce fichier textuel porte l'extension *dlg* (*Dock LoG*).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-(a) Schrödinger E. *Ann Phys*; **1926**, 79: 361. (b) Schrödinger E. *Ann Phys*; **1926**, 79: 489.
- 2-Doucet JP., Weber J. *Academic Press, London*; **1996**, 266.
- 3-Rivail JL., *Inter-Editions / CNRS Editions*; **1994**.
- 4-Levine IN. *Quantum Chemistry*; 5th edition, **1999**, 455.
- 5- Born and M., Oppenheimer J. R. *Ann. Physik*; **1927**, 84, 457.
- 6- Pauli W. *Jr. Z. Physik*; **1925**, 31, 765.
- 7- Slater J. C. *Phys. Rev*; **1929**, 29, 1293.
- 8- Hartree D. R. *Proc. Cambridge Phil. Soc*; **1928**, 34, 89.
- 9- Fock V. *Z. Physik*; **1930**, 61, 126.
- 10- Sousa SF., Fernandes PA., Ramos MJ. *J Phys Chem A*; **2007**, 111:10439-52.
- 11 - Hohenberg P., Kohn W. *Phys Rev B*; **1964**, 136: B864.
- 12 - Kohn W., Sham LJ. *Phys Rev*; **1965**, 140: 1133.
- 13 - Andrews D H. *Physical Review*, **1930**. 36(3): 544.
- 14 - Higuchi M., Yasuhara H. *Journal of the Korean Physical Society*, 5; **2001**, 38: 599-601.
- 15-Vosko SH., Wilk L., Nusair M. *Can J Phys*; **1980**, 58: 1200-1211.
- 16- Becke AD. *Phys Rev A*; **1988**, 38: 3098-3100.
- 17- Goodman J. *Royal society of Chemistry, Cambridge*; UK, **1998**.
- 18- Comba P., Hambley T W., *VCH, New York*; **1995**.
- 19- Altarsha M., Castro B., Monard G. *Bioorganic Chemistry*; **2009**, 37:111–125.
- 20- Weiner P.K., Kollman P. A. *J. comput Chem*; **1981**, 2, 287.
- 21- Karplus M. *J. comput Chem*; **1983**, 4, 187.
- 22- Allinger N. L. *J. Am. Chem. Soc*; **1977**, 99, 8127.
- 23- Allinger N. L., Yuh Y. H., Lii J-H. *J. comput Chem*; **1989**, 111, 8522.
- 24- Allinger N. L., Chen, K., Lii, J-H. *J. comput Chem*; **1996**, 17, 642.
- 25- Momany F. A., Crruthers L. M., McGuire, R. F., Scheraga H. A. *J.Phys. Chem*; **1974**.
- 26- Ermer O. *struct.Bonding Berlin*; **1976**, 27, 161.
- 27 - Taïri-Kellou S., Thèse de Doctorat d'état, Alger, USTHB, N° d'ordre :04/2002-E/CH.
- 28 - Asses Y., Magister, Alger, USTHB, N° d'ordre: 13/2006-M/CH.
- 29 -Bouaziz–Terrachet S., Magister, Alger, USTHB, **2006** N° d'ordre : 14/2006-M/CH.
- 30 -Taïri-Kellou S., Bouaziz–Terrachet S., Maouche B. et Moreau G. *Internet Electron. J. Mol. Des*; **2008**, 7, 161-185.
- 31 - Souhila Bouaziz-Terrachet., Redouane Terrachet., Safia Taïri-Kellou. *Medicinal Chemistry Research*; (12 July 2012), pp. 1-9, doi:10.1007/s00044-012-0174-z.
- 32 - Tress M., De Juan D., Grana O., Gomez M. J., Gomez-Puertas P., Gonzalez J. M., Lopez G., Valencia A. **2005**, 60, 275-280.
- 33 - Duhovny D., Nussinov R., Wolfson H. J. *Springer*; **2002**, 2452, 185-200.
- 34 - Bindewald E., Skolnick J. *J. Comput. Chem*; **2005**, 26, 374-383.
- 35 - Kuntz I.D et al. *Journal of Molecular Biology*; **1982**, 161(2): p. 269-288.
- 36 - Fischer E. *Einfluss. Ber*; **1894**, 27, 2985–2993.

- 37 - Alvarez J.C. *Curr Opin Chem Biol*; **2004**, 8(4): p. 365-370.
- 38- Ghosh S., et al. *Current Opinion in Chemical Biology*; **2006**, 10(3): p. 194-202.
- 39- Kuntz I.D., Blaney J.M., Oatley S.J., Langridge R and Ferrin T.E. *Journal of Molecular Biology*; **1982**,161: p. 269-88.
- 40-Shoichet B.K and I.D. Kuntz. *Protein Engineering*; **1993**,6: p. 723-32.
- 41- Jain A.N. *Journal of Medicinal Chemistry*; **2003**, 46: p. 499-511.
- 42-Morris G.M., Goodsell D.S., Huey R and Olson A.J. *Journal of Computer-Aided . Molecular Design*; **1996**, 10: p. 293-304.
- 43-Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K and A.J. Olson., *Journal of Computational Chemistry*, **1998**. 19: p.1639-1662
- 44 -Hart TN., Read RJ. *Proteins*; **1992**, 13 : 206 -222
- 45 - Cho S.J and Tropsha A. *Journal of Medicinal Chemistry*; **1995**, 38(7): p. 1060-6.
- 46 - Wold S. and Eriksson L. *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*; **1995**, 2: p. 309-18.
- 47 - Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P et Rognan D. *Structure, Function, and Bioinformatics*; **2004**,57, 225-242,.
- 48 - Kurumbail R.G., Stevens A.M., Gierse J.K., McDonald J.J., Stegeman R.A., Pak J.Y., Gildehaus D., Miyashiro J.M., Penning T.D., Seibert K., Isakson P.C., Stallings W.C., **1996** : 384 ; 644-648.
- 49 - Gerschel A., *Liaisons intermoléculaires et les forces en jeu dans la matière condensée*. Paris, EDP Sciences /CNRS Editions, **1995**.
- 50 - Kurumbail R.G., Stevens A.M., Gierse J.K., McDonald J.J., Stegeman R.A., Pak J.Y., Gildehaus D., Miyashiro J.M., Penning T.D., Seibert K., Isakson P.C., Stallings W.C., **1996**, 384 ; 644-648.
- 51 - Llorens O.,Perez J.J., Palomer A.,Mauleon D., *J. Mol. Graph. Model* ; **2002**. 20 ; 359-371.
- 52 - Berman H. M. The Protein Data Bank: *Acta Cryst.* **2008**. A64:88-95.
- 53 - Protein Data Bank (PDB). Biological Macromolecular Resource. [En ligne]. <http://www.pdb.org/pdb/home>.
- 54 - Arrault A. Thèse de doctorat. Orléans : Université d'Orléans. France. **2007**. 176p.
- 55 – MDL Information Systems (**2002**) ISIS/Draw 2.5. MDL Information Systems, San Leandro.
- 56 – Cambridge Scientific Computing (**2003**) ChemOffice Ultra. Cambridge Scientific Computing, Cambridge.

CHAPITRE III

Résultats et Discussions

I - INTRODUCTION

Dans ce chapitre, représentant ma contribution à la thématique développée au sein de notre équipe de recherches, nous nous proposons d'étudier les modes de reconnaissance, d'une part, de quelques AINS synthétiques caractérisés par leur activité quantitative sur les deux isoformes de la COX et, d'autre part, de trois molécules naturelles connues pour leur profil anti-inflammatoire. Pour cela, nous avons exploité toute information expérimentale disponible dans la littérature susceptible de guider de manière rationnelle notre démarche. Cette étude, réalisée à l'aide de la technique de drug design basée sur la cible, en l'occurrence le docking moléculaire, a pour objectif d'expliquer, au niveau atomique, l'activité anti-inflammatoire de ces molécules. Nous avons développé une stratégie de docking effectué à l'aide de la suite de programmes d'AutoDock4 [1].

II - PROTOCOLE DE VALIDATION DE DOCKING

1- Structures des protéines et ligands étudiés

a- Protéines

Compte tenu des critères donnés dans le chapitre 2, nous avons extrait de la *protein data bank* les structures, en format pdb, suivantes:

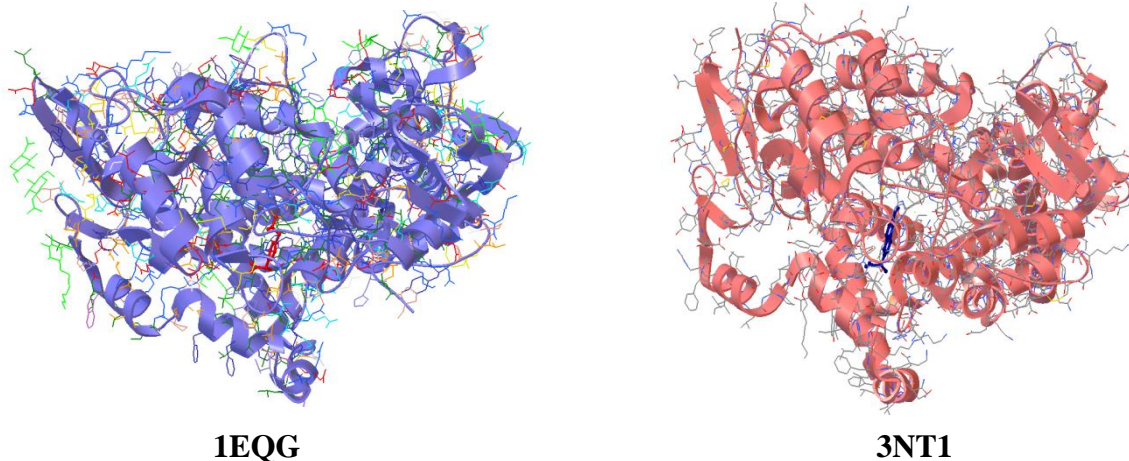
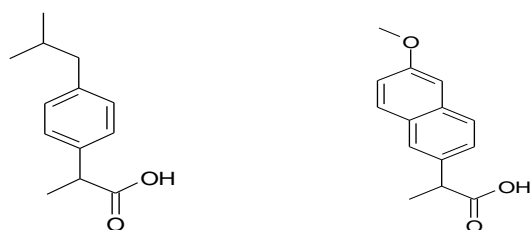


Figure 1 : Représentation 3D des protéines extraites de la pdb et utilisées dans notre étude

- ✓ **1EQG :** correspond à la COX-1. Elle est résolue à 2.61 Å, et est co-cristallisée avec l'Ibuprofène dont la structure est donnée dans la figure 2.
- ✓ **3NT1 :** correspond à la COX-2. Elle est résolue à 1.73 Å et est co-cristallisée avec le Naproxène dont la structure est donnée aussi dans la figure 2.

Il faut noter que les 2 structures PDB sont constituées de 2 chaînes A et B, caractérisant le dimère, et contiennent un certain nombre de ligands, autres que l'AINS, que nous avons retiré pour notre étude. Nous avons aussi considéré qu'une seule chaîne de la protéine.



Ibuprofène

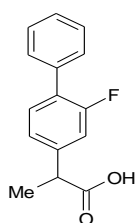
Naproxène

Figure 2 : Structures chimiques de l'ibuprofène et du naproxène

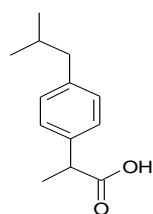
b- Ligands

✓ molécules synthétiques

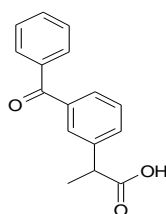
Nous présentons ci-dessous les structures 2D des AINS sélectionnés pour notre étude :



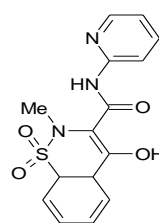
Flurbiprofène



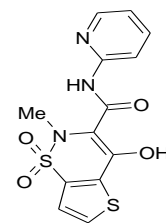
Ibuprofène



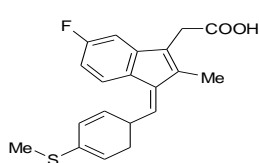
Kétoprofène



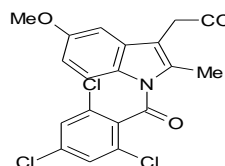
Piroxicam



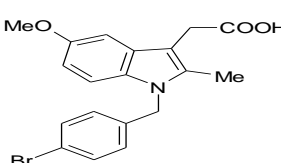
Tenoxicam



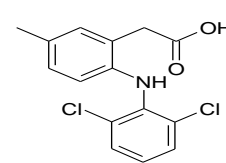
Sulindac sulfide



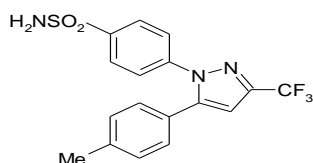
L-748



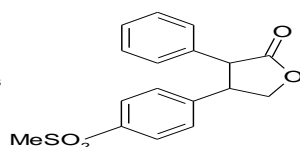
L-780



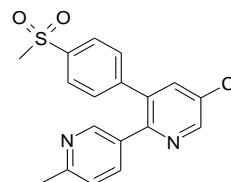
Diclofénac



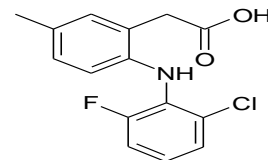
Célecoxib



Rofécoxib

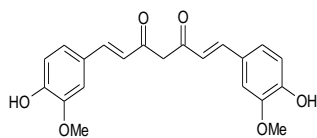


Etoricoxib

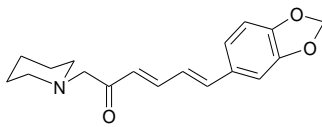


Lumiracoxib

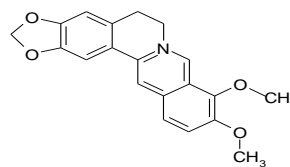
✓ molécules naturelles



Curcumine



Pipérine



Berbérine

Mis à part le Piroxicam et le Tenoxicam, les molécules inhibitrices de la COX-1, que nous avons sélectionnées dans la littérature, présentent un centre d'asymétrie portant une fonction acide.

Les coxibs ou molécules sélectives anti-COX-2 sélectionnées se caractérisent chimiquement par [2]:

- ✓ l'absence de fonction acide carboxylique.
- ✓ une structure volumineuse comprenant 2 grands cycles aromatiques reliés à un hétérocycle central
- ✓ la présence de groupements fonctionnels méthylsulfone pour le rofécoxib [3] ou sulfonamide pour le célécoxib [4].

La plupart des coxibs ont des structures proches, comprenant la structure tricyclique et les groupements fonctionnels méthylsulfones [5]. Leur principale différence est la nature chimique de l'hétérocycle central : pyridinyl pour l'étoricoxib, le furanone pour le rofécoxib et pyrazole pour le célécoxib. Il faut noter que le lumiracoxib qui est aussi un coxib [6] a une structure proche du diclofénac, ayant un squelette d'acide phénylacétique mais dépourvu de groupements sulfonés.

2- Sélection de la conformation dite bioactive ou viable

Pour chaque ligand, l'opération de docking a généré plusieurs complexes regroupés en familles (clusters) contenant des conformations se superposant avec un RMSD inférieur à 2 Å. Les meilleures poses sont sélectionnées en cliquant sur les familles les plus peuplées. A titre d'illustration, nous donnons, dans la figure 3, les résultats de la pré-analyse à l'issue du docking du lumiracoxib, où le cluster le plus peuplé apparaît en rouge. Comme le montre l'illustration, on peut accéder à l'affichage des paramètres quantitatifs concernant le modèle de docking considéré. La sélection de la conformation bioactive ou viable est faite selon les

critères suivants : maximum de liaisons hydrogène, maximum d'interactions hydrophobes et une importante énergie de liaison.

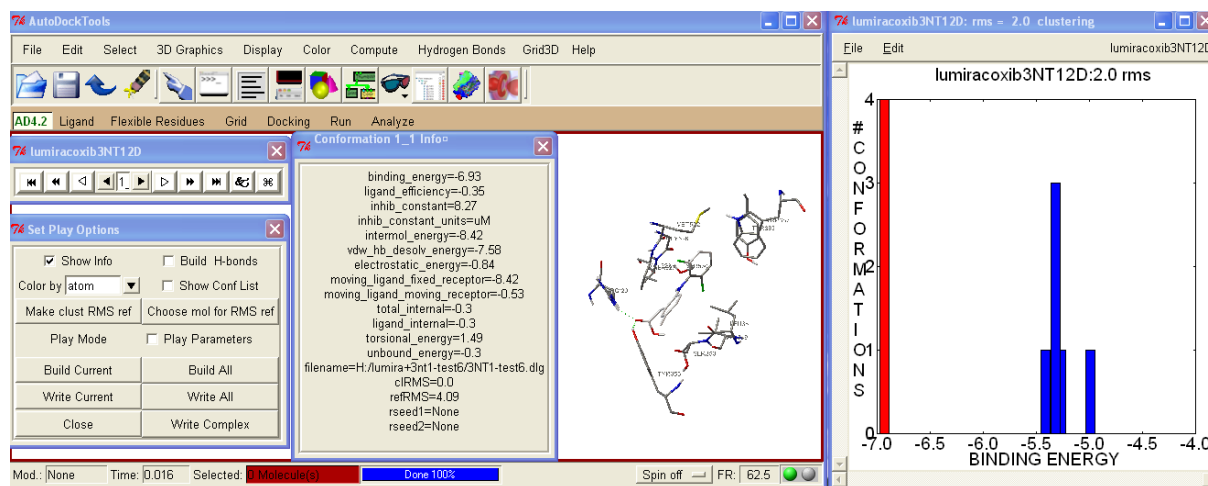


Figure 3 : Résultats de la pré-analyse donnés à l'issue du docking du lumiracoxib, dans la COX-2.

3- Validation des paramètres de docking

Il est important de noter que le protocole de docking doit être validé avant d'envisager le test d'un plus grand nombre de molécules [7-9]. Pour cela, nous avons comparé respectivement les structures des ligands co-cristallisés issues des complexes pdb : 1EQG et 3NT1, à celles issues du docking.

Les figures 4 et 5 montrent que les conformations se superposent avec un RMSD (*Root Mean Square Deviation*) de 0.85 Å pour l'ibuprofène et 0.74 Å pour le naproxène ; ce qui valide l'adoption du protocole à utiliser, largement détaillé dans le chapitre 2.

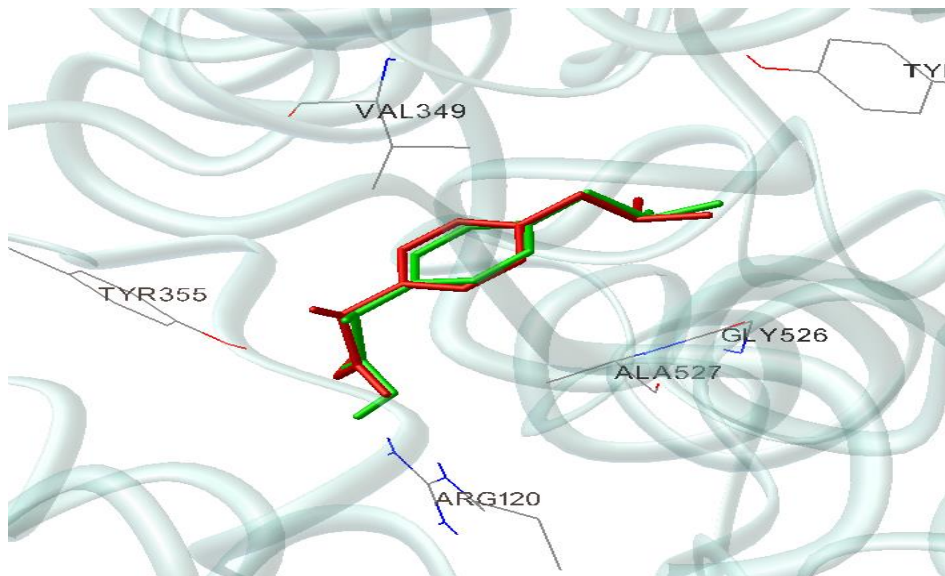


Figure 4 : Superposition de l'Ibuprofène dans la COX-1 : conformation issue du docking (en vert) et conformation RX (en rouge). La trace est en bleu.

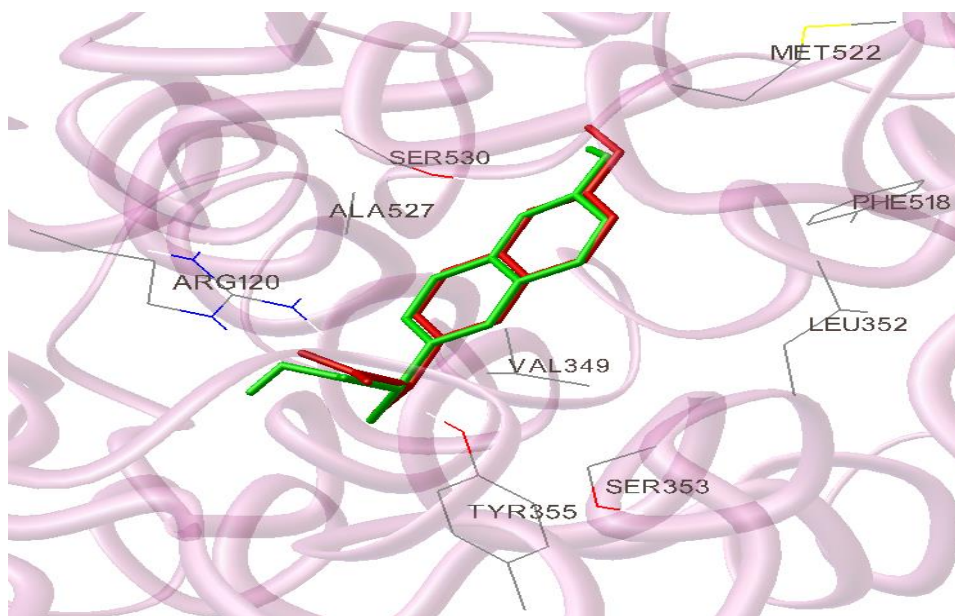


Figure 5 : Superposition du Naproxène dans la COX-2 : conformation issue du docking (en vert) et conformation RX (en rouge). La trace est en mauve.

4- Les sites actifs

Dans le but de mener notre discussion des résultats concernant le positionnement des ligands étudiés au sein de chacun des 2 sites actifs, nous avons calculé le potentiel électrostatique de la 1EQG et de la 3NT1. Ainsi, les zones hydrophobes et hydrophiles dans chacune des cavités de la COX peuvent être bien visualisées. Nos donnons ci-dessous les illustrations obtenues au moyen d'ADT.

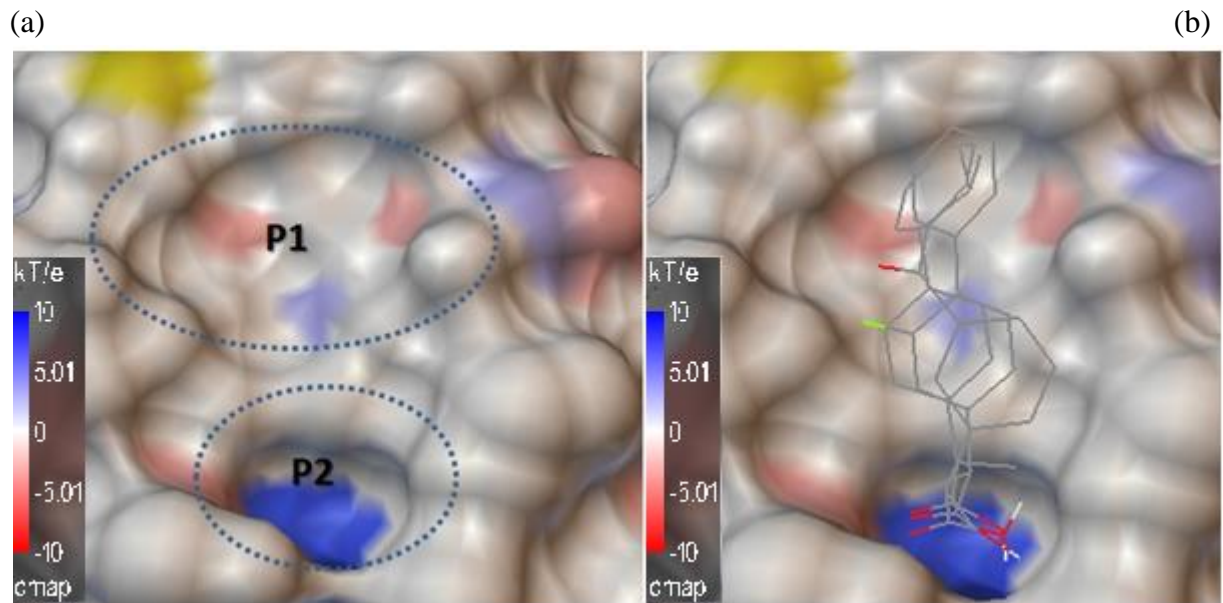


Figure 6 : (a) Surface de la cavité catalytique de la COX-1, colorée en potentiel électrostatique, (b) Superposition des conformations bioactives de quelques ligands dans le site actif.

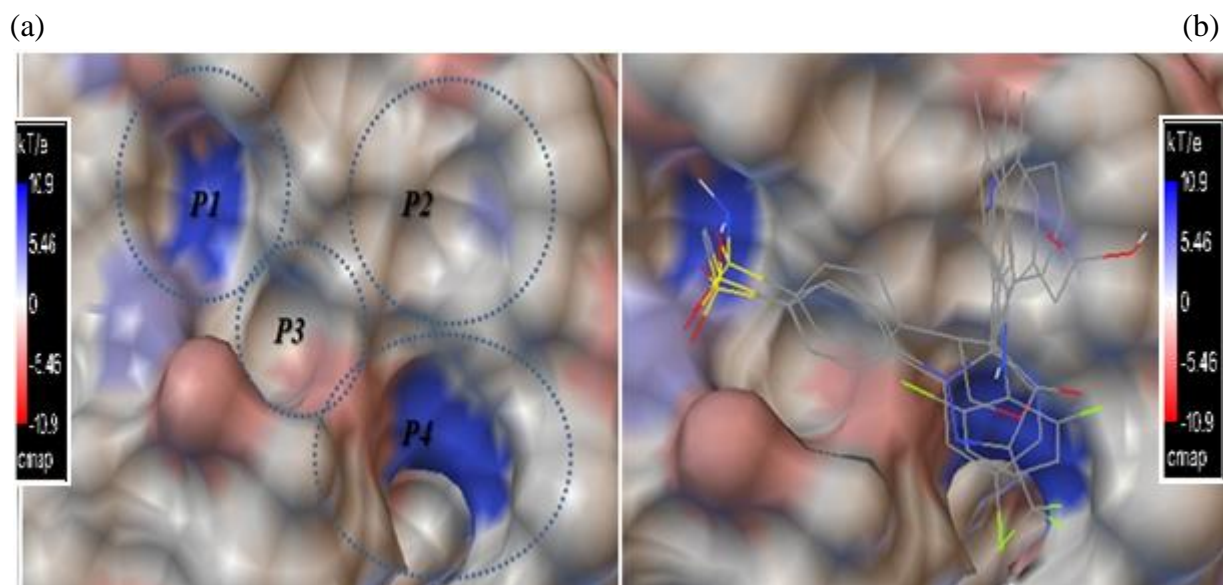


Figure 7 : (a) Surface de la cavité catalytique de la COX-2, colorée en potentiel électrostatique, (b) Superposition des conformations bioactives des coxibs dans le site actif.

La figure 6 montre que le site actif de la COX-1 est constitué principalement de 2 poches que nous notons **P1** et **P2**, dans la suite du manuscrit. On note que celui de la COX-2 est constitué de 4 poches que nous notons : **P1, P2, P3 et P4** bien distinctes (figure 7).

III- Discussion des résultats obtenus

1-Mode de liaison des anti-inflammatoires préférentiels COX-1

Rappelons que les préférentiels COX-1 ont été découverts au milieu des années 90, tels que le Flurbiprofène, l'Indometacine, le Ketorolac, le Piroxicam et le Sulindac dont le sulfide est un métabolite actif. La plupart de ces médicaments tiennent leur efficacité d'une interaction forte avec le site de liaison du substrat [10,11].

Nous récapitulons dans le tableau suivant, les interactions entre la conformation dockée de chaque ligand et les résidus du site actif.

Tableau 1 : Interactions mises en jeu entre chaque AINS préférentiel COX-1 et les résidus du site actif

Molécule	[Cluster-Conformation]	Liaison Hydrogène		
		Atome du ligand	Résidu de la cible	Distance (Å)
Flurbiprofène	[1-1]	-COOH	Arg120	1.882
		-COOH	Arg120	1.952
		-COOH	Tyr355	1.959
Ibuprofène	[2-1]	-COOH	Arg120	1.912
		-COOH	Arg120	1.907
		-COOH	Tyr355	1.903
Kétoprofène	[2-1]	-COOH	Arg120	1.901
		-COOH	Arg120	1.903
		-COOH	Tyr355	1.920
Piroxicam	[1-1]	-OH	Ile523	2.066
Tenoxicam	[2-4]	-OH	Ser530	2.193
Sulindac	[2-1]	-COOH	Arg120	1.899
		-COOH	Arg120	1.916
		-COOH	Tyr355	2.052

Tableau 2 : Energie de liaison $\Delta G_{\text{binding}}$ (Kcal/mol) et les valeurs de IC_{50} (μM) des préférentiels COX-1.

Molécule	$\Delta G_{\text{binding}}$	IC_{50}
Flurbiprofène	-5.39	0.29
kétoprofène	-5.69	0.02
Piroxicam	-7.13	0.76
Tenoxicam	-7.03	2.3
Sulindac	-5.41	1.02
Ibuprofène	-4.22	4.7

Nous donnons ci-dessous les illustrations des modes de liaisons préférentiels COX-1 et COX-2, pour chaque ligand

a- Le flurbiprofène

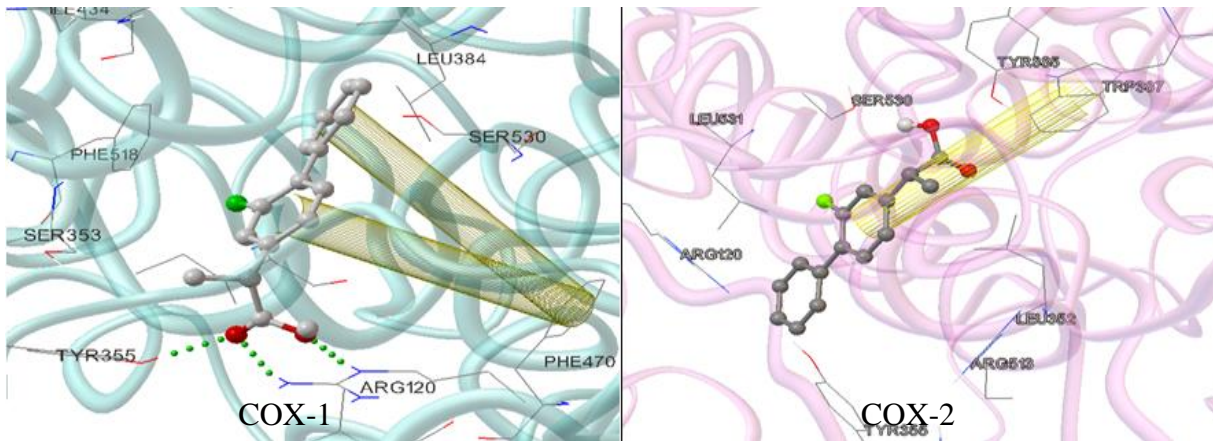
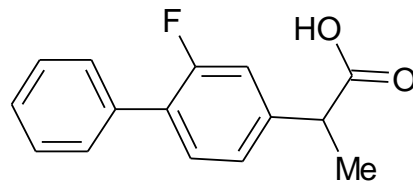


Figure 8: Mode de liaison du Flurbiprofène avec la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2). Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés et les interactions π - π , en cylindres jaunes.

Dans la COX-1, le Flurbiprofène est stabilisé par deux types d'interactions : 2 de nature hydrophobe de type π - π entre le groupement phényle, le fluorophényle et le résidu **Phe470** et 3 liaisons hydrogène, dont 2 avec l'**Arg120** et 1 avec la **Tyr355**. Ces interactions confèrent une stabilité appréciable au complexe.

Dans la COX-2, on observe que le groupement fluorophényle forme 2 interactions de type hydrophobe avec le **Trp387**, et on n'y observe aucune interaction de type hydrogène.

Notons aussi que l'atome de fluor n'établit aucune interaction dans les deux cavités COX-1 et COX-2. Dans la COX-2, le fluor est proche de l'**Arg120** alors que dans la COX-1, il est plutôt du côté de la **Tyr355**.

Le groupement acide carboxylique du ligand est orienté vers l'**Arg120** et la **Tyr355**, occupant l'entrée du site actif caractérisant la poche hydrophile, notée **P2**, dans la COX-1 ; ce qui est prédit par d'autres études [12,13]. En revanche dans la COX-2, ce groupement occupe la poche **P1** et est orienté vers la **Tyr385**, se trouvant au fond du canal arachidonique.

Aucune interaction de type liaison hydrogène de ce groupement avec la COX-2 n'est mise en évidence par notre étude ; ce qui explique son profil préférentiel COX-1.

b-L'ibuprofène

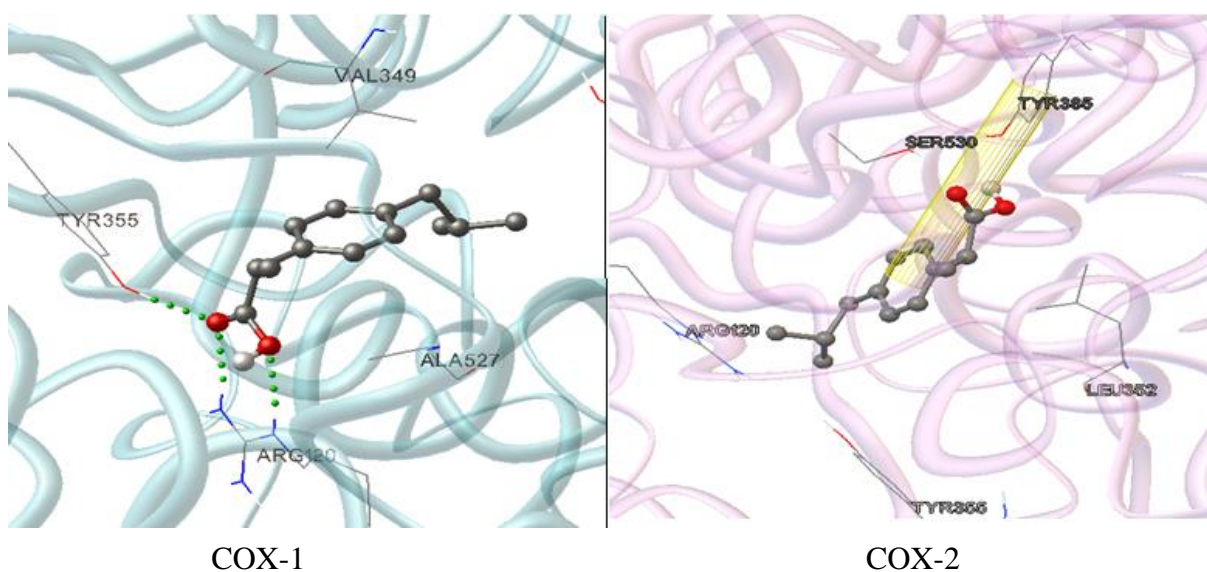
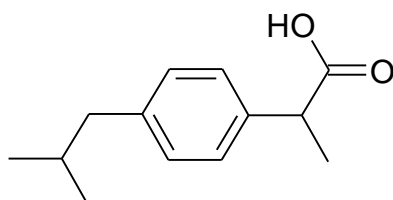


Figure 9: Mode de liaison de l'Ibuprofène avec la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Dans le complexe Ibuprofène/COX-1, on remarque l'absence d'interactions de type hydrophobe. En revanche, on observe **2** liaisons hydrogène avec l'**Arg120** et **1** liaison hydrogène avec la **Tyr355**, retrouvées dans le site de liaison Flurbiprofène/COX-1. Ce résultat peut expliquer l'activité supérieure du flurbiprofène.

Dans la COX-2, une seule interaction stabilisante est formée, cette interaction est de nature hydrophobe de type π - π , entre le groupement aromatique et la **Tyr385**.

On note aussi que le groupement acide de l'Ibuprofène se positionne de manière similaire dans la COX-1 et dans la COX-2, que le flurbiprofène ; ce qui peut être attribué à leur même profil préférentiel COX-1.

c-Le kétoprofène

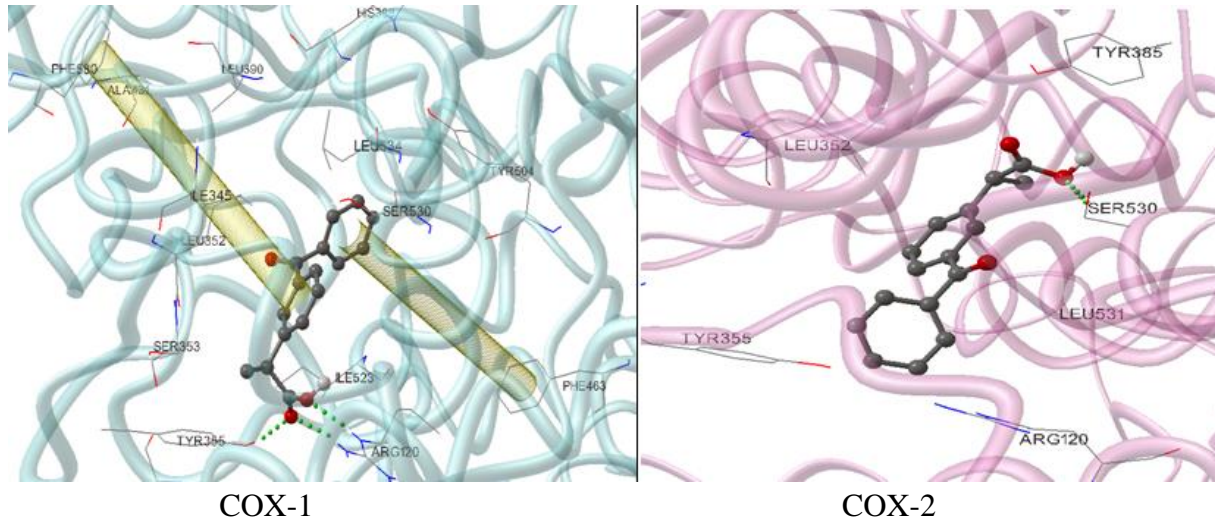
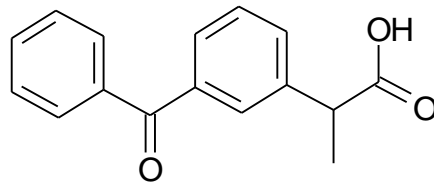


Figure 10: Mode de liaison du Kétoprofène avec la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Le Kétoprofène est très actif sur COX-1 et son activité sur COX-2 est 54 fois plus petite que sur COX-1 [14,15]

L'illustration de son mode de liaison avec la COX-1, représenté dans la figure 10, montre 2 interactions de type hydrophobe avec la **Phe463** et la **Phe580**. On note également la formation de 3 liaisons hydrogène : **2** entre le groupement acide et l'**Arg120**, et **1** autre avec la **Tyr355**.

Dans la COX-2, on n'observe aucune interaction hydrophobe. Ici aussi, nous observons une inversion de la position du ligand dans la COX-1 et dans la COX-2, mais contrairement aux ligands précédents la fonction acide établit une liaison hydrogène avec la **Ser530** dans la COX-2 ; ce qui peut être attribuée à l'activité son activité non négligeable sur COX-2 par rapport aux ligands précédents.

A titre de récapitulation de nos résultats de docking des profènes, nous donnons ci-dessous la superposition des conformations ‘viables’ dans chaque site de liaison.

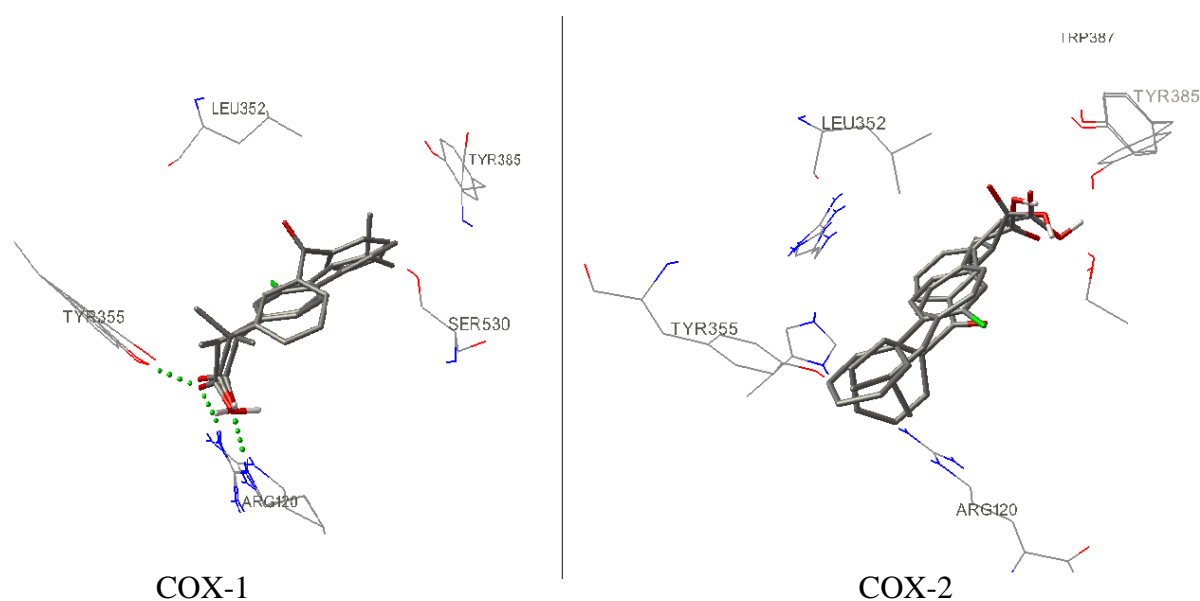


Figure 11: Superposition des meilleurs positionnements des profènes dans 1EQG et COX-2.

La superposition des profènes montre que les 3 molécules adoptent la même orientation dans la COX-1, avec le groupement acide occupant la poche **P2**. Il faut noter que dans la COX-2, cette orientation est inversée pour les 3 profènes étudiés ; ce qui peut être associé aux profils anti-inflammatoires respectifs.

d-Le piroxicam

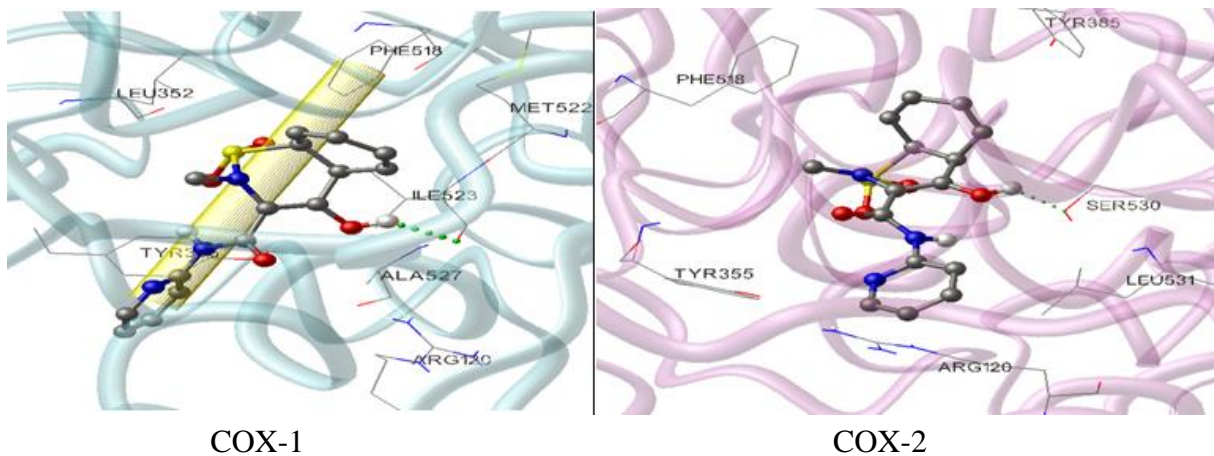
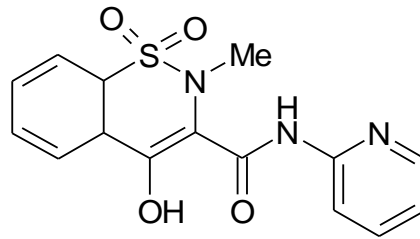


Figure 12: Mode de liaison du Piroxicam dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Le résultat de simulation du docking de ce composé représenté dans la figure 12 montre que le complexe Piroxicam/COX-1 est stabilisé par une interaction hydrophobe de type π - π avec le résidu **Phe518** et une liaison hydrogène avec le résidu **Ile523**. Cependant dans la COX-2 aucune interaction de type hydrophobe n'est observée, une seule liaison hydrogène est formée entre le ligand et la **Ser530** ; ce qui est déjà observé dans le site de liaison Kétoprofène/COX-2.

Nous observons un réseau faible en interactions au sein des 2 sites actifs du ligand piroxicam. Dans la COX-2, seule une interaction par liaison hydrogène a été mise en évidence. Ce résultat peut être imputé à sa rigidité structurale, ne lui permettant d'explorer tout le site actif.

e-Le tenoxicam

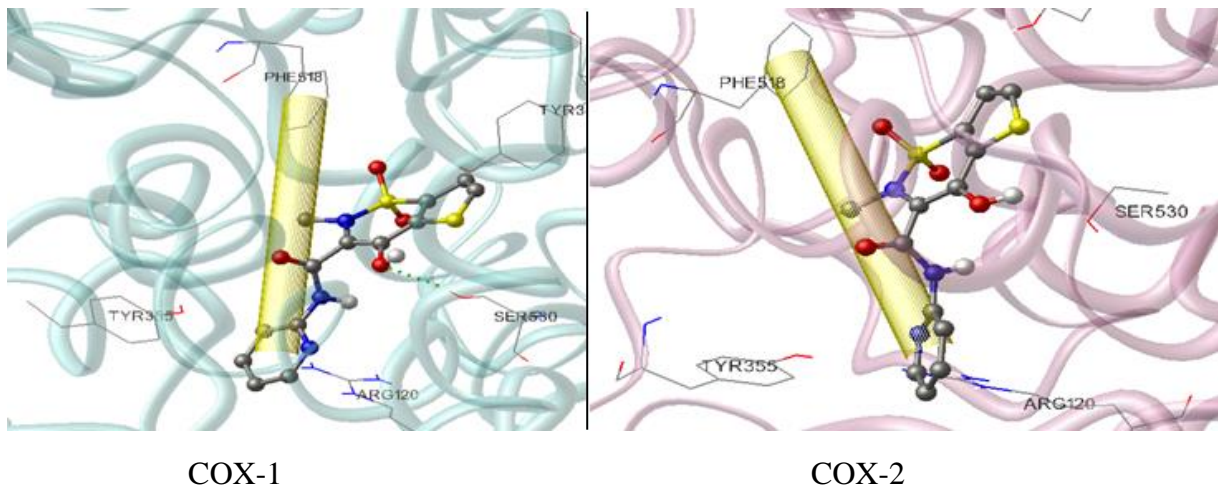
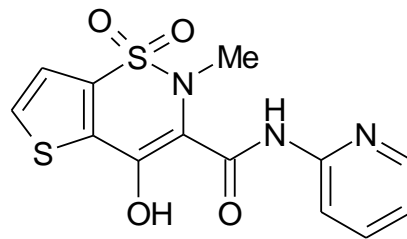


Figure 13: Mode de liaison du Tenoxicam dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Dans le mode de liaison du Tenoxicam, possédant 3 rotules, nous relevons une interaction hydrophobe de type π - π avec la **Phe518** dans les deux sites de la COX et une autre interaction par liaison hydrogène avec la **Ser530** ; ce qui pourrait associer à son profil préférentiel sur COX-1.

Pour récapituler nos résultats de docking des oxicams, nous donnons ci-dessous la superposition des conformations ‘viables’ dans chaque site de liaison.

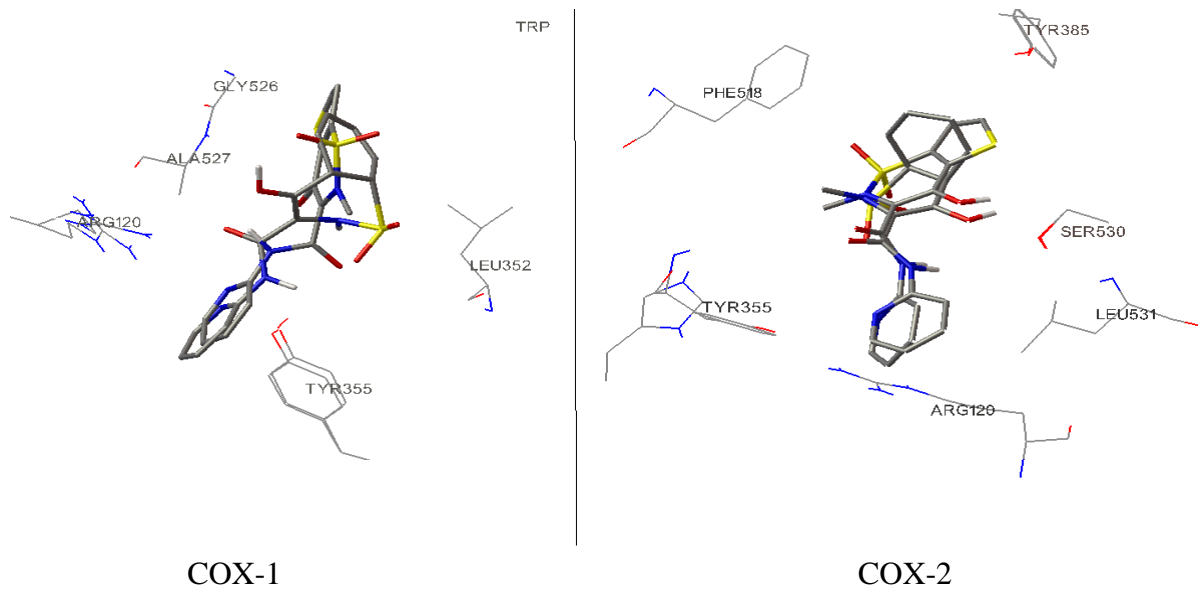


Figure 14 : Superposition des meilleurs positionnements des oxicams dans 1EQG et 3NT1.

La superposition des Oxycams montre que le positionnement au sein de chaque site est pratiquement le même. Ce qui explique leur profil préférentiel COX-1.

f-Le Sulindac sulfide

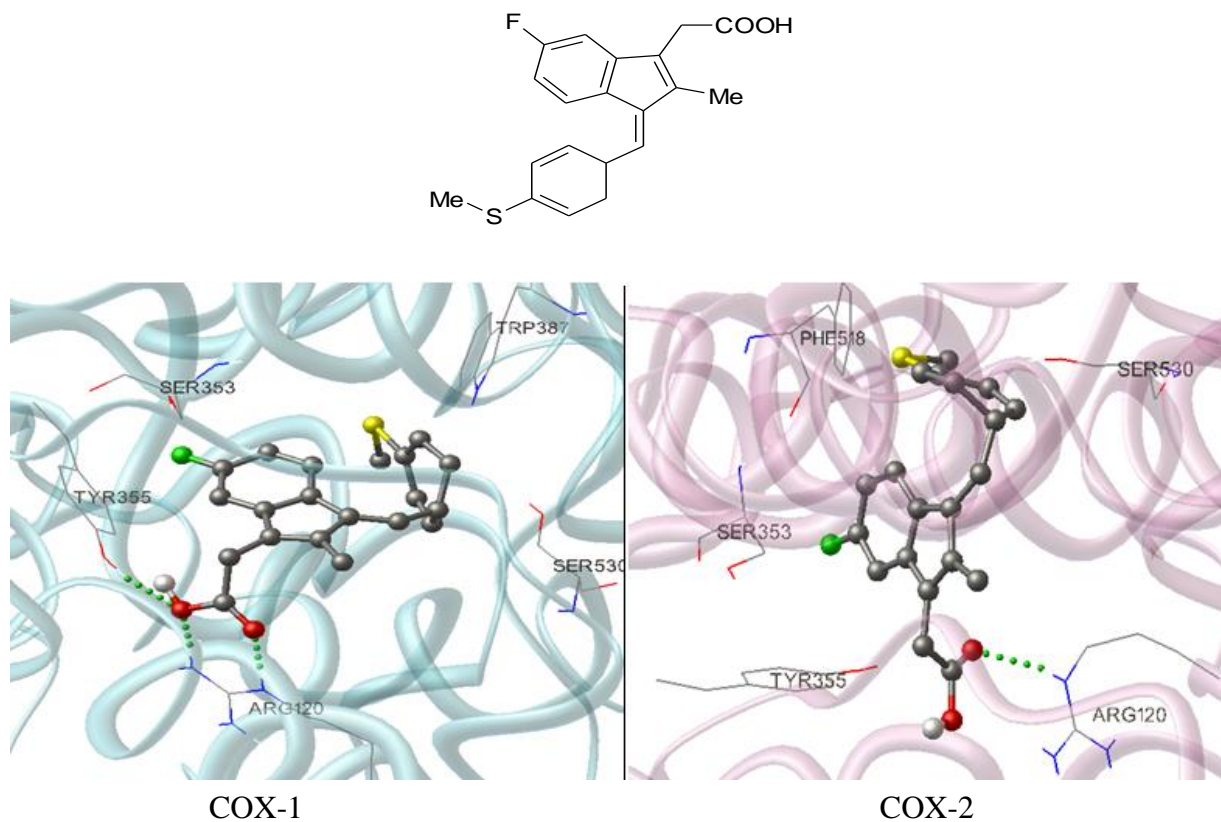


Figure 15: Mode de liaison du Sulindac sulfide dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Le Sulindac sulfide occupe tout le volume du site actif de la COX-1, cependant aucune interaction stabilisante de nature hydrophobe n'est observée. Le groupement acide du ligand se positionne au niveau de l'entrée du canal arachidonique ; ce qui conduit à la formation de **2** liaisons hydrogène avec l'**Arg120** et **1** liaison avec la **Tyr355**. Ce résultat est en accord avec la littérature qui rapporte l'importance de l'interaction entre les AINS, pourvus de fonction carboxylique, et l'**Arg120** [16].

Par ailleurs, ce ligand ne forme qu'une seule liaison hydrogène dans le site actif de la COX-2, entre l'**Arg120** et sa fonction acide. Cette faiblesse d'interactions stabilisantes explique sa faible activité sur l'enzyme impliquée dans l'inflammation.

2-Mode de liaison des anti-inflammatoires préférentiels COX-2

Les anti-inflammatoires préférentiels COX-2, développés dans le but de réduire les effets indésirables des AINS préférentiels COX-1 [17], sont connus pour leurs interactions avec la **Ser530** et le résidu catalytique **Tyr385**, dans la COX-2.

Nous présentons ci-dessous les résultats obtenus à l'issue de nos simulations par le docking moléculaire dans les 2 COXs.

Tableau 3 : Interactions mises en jeu entre la conformation dockée de chaque ligand préférentiel COX-2 et les résidus du site actif

Molécule	Numéro [Cluster-Conformation]	Liaison Hydrogène		
		Atome du ligand	Résidu de la cible	Distance (Å)
L-748	[1-1]	-COOH	Arg513	2.038
L-780	[2-1]	-COOH	Tyr385	2.028
Diclofénac	[2-1]	-COOH -NH	Tyr385 Ser530	2.061 2.059

a- L-748 :

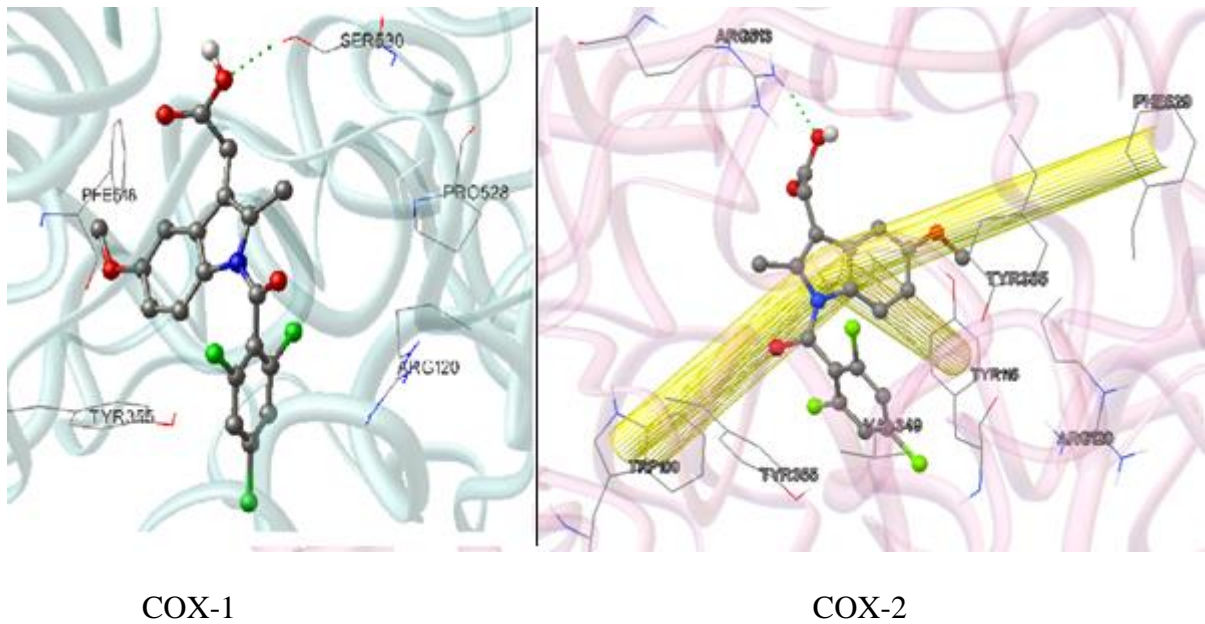
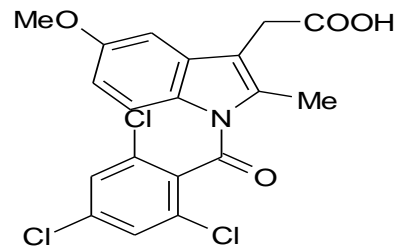


Figure 16: Mode de liaison du L-748 dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Le résultat du docking montre une pénétration **incomplète** du L-748 dans le site actif de la COX-1 et que le groupement acide établit une liaison hydrogène avec la **Ser530** ; ce qui peut expliquer sa faible activité sur COX-1

Toutefois, la large cavité du site actif de la COX-2 permet l'insertion totale du L-748 : **6** interactions hydrophobes sont observées et réparties comme suit : **2** avec la **Tyr115**, **2** avec le **Trp100** et **2** avec la **Phe529**, une liaison hydrogène entre le groupement acide et l'**Arg518** est également formée, attribuée à sa bonne activité sur la COX-2. Cependant, aucune interaction par liaison hydrogène décrite dans la littérature n'est observée

b- L-780

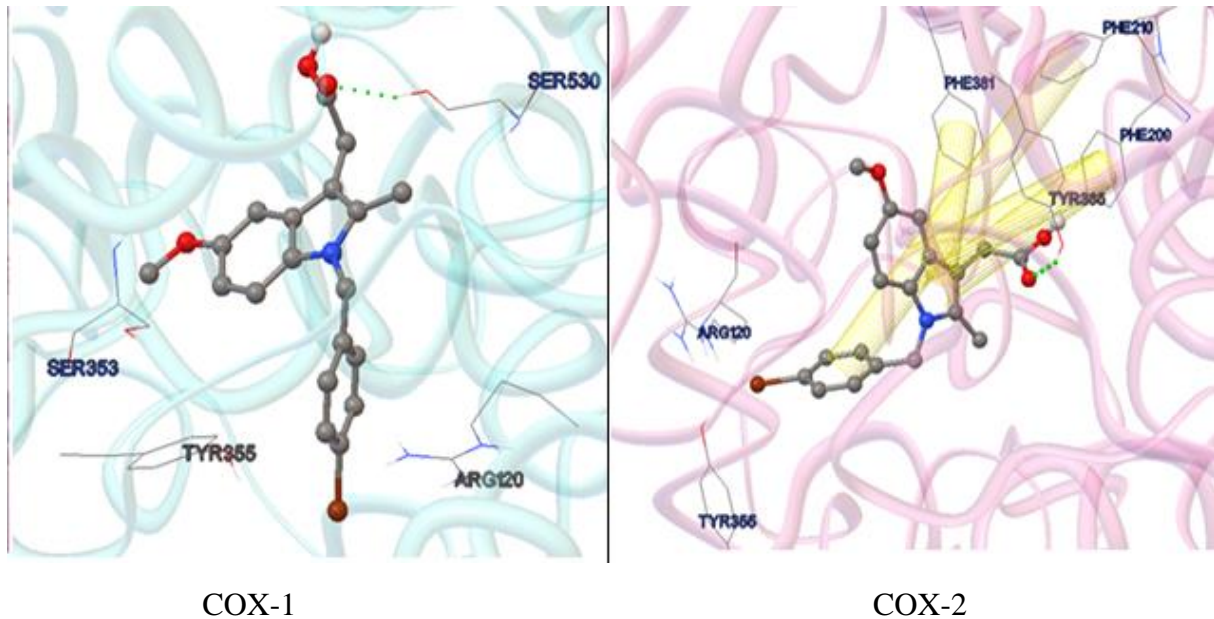
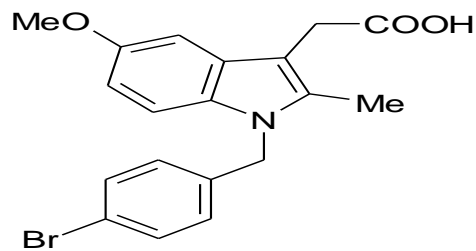


Figure 17: Mode de liaison du L-780 dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

De la même façon que pour le L-748, la visualisation et l'exploration des sites de liaison des complexes formés avec les 2 cibles montrent que le L-780 ne rentre pas entièrement dans le site actif de la COX-1. Notons que l'atome de brome reste à l'extérieur du site ; ce qui peut être associé à sa forte taille. Le groupement acide forme une liaison hydrogène avec la **Ser530**.

Dans la COX-2, le volume du site actif permet l'insertion intégrale du L-780. Nous y observons des interactions hydrophobes de type π - π avec les résidus **Phe381**, **Phe210** et **Phe209** ; ce qui explique son activité importante par rapport aux autres préférentiels COX-2. On observe également la formation d'une liaison hydrogène entre le groupement acide et la **Tyr385** ; ce qui est en conformité avec la littérature [18]

c-Le diclofénac

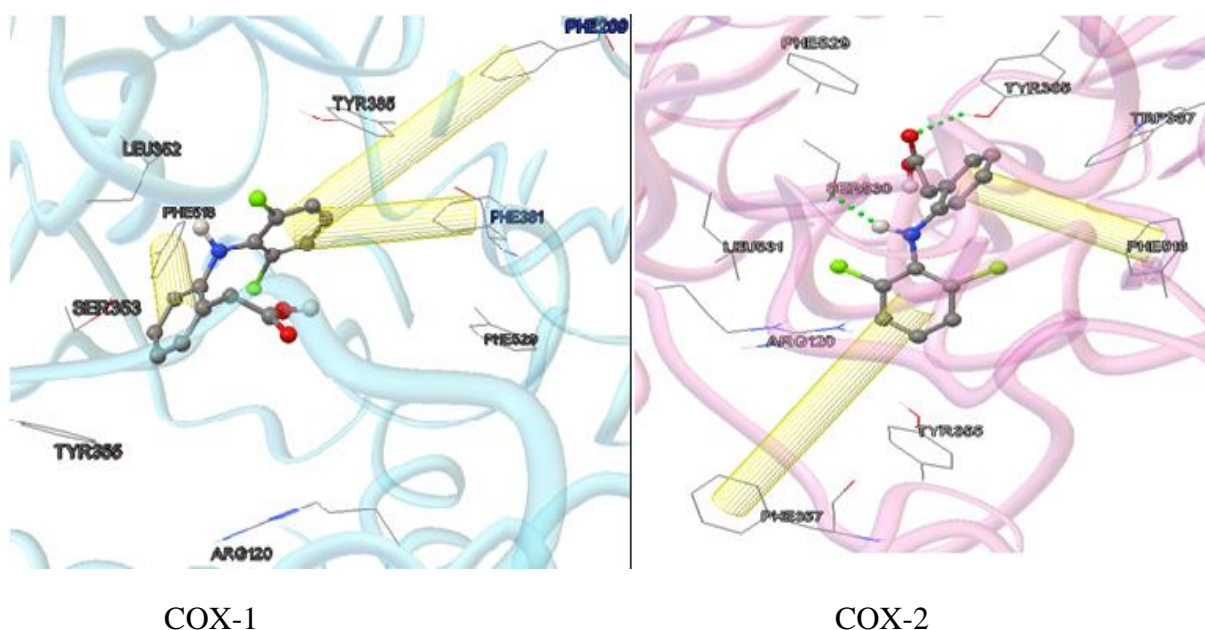
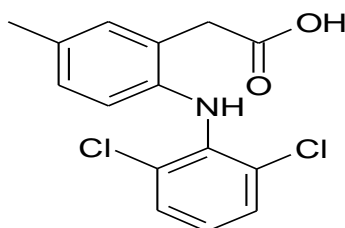


Figure 18: Mode de liaison du Diclofénac dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Dans le complexe Diclofénac/COX-1, on y observe aucune liaison hydrogène. Le ligand établit 3 interactions de type hydrophobe avec les résidus **Phe209**, **Phe381** et **Phe518**.

Dans la COX-2, le Diclofénac est stabilisé par deux types d'interactions : 2 de nature hydrophobe de type π - π entre le groupement phényle et la **Phe513** et entre le dichlorophényle et le résidu **Phe357**. Nous relevons également 2 interactions de type hydrogène avec les résidus **Ser530** et **Tyr385**. Ce résultat est en accord avec la littérature qui stipule que le Diclofénac établisse des liaisons hydrogène avec ces résidus [19,20].

Dans la COX-1 le groupement acide est orienté vers l'entrée du site actif et le dichlorophényle vers la **Tyr 385**, dans la COX-2 la position du ligand est inversée.

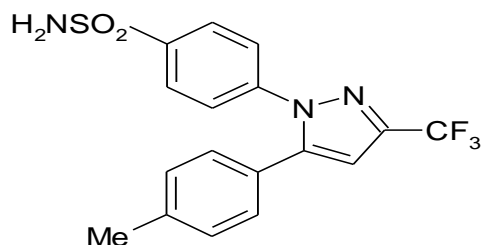
3- Mode de liaison des anti-inflammatoires sélectifs COX-2

La 3^e classe d'AINS synthétiques, à laquelle nous nous sommes intéressées, est celle qui est dénuée des effets indésirables sur le tractus gastro-intestinal : ce sont les AINS sélectifs COX-2. Nous présentons ci-après l'ensemble des résultats obtenus à l'issue de notre étude par le docking.

Tableau 4 : Interactions mises en jeu entre la conformation dockée de chaque AINS sélectif COX-2 et les résidus du site actif

Molécule	Numéro [Cluster-Conformation]	Liaison Hydrogène		
		Atome du ligand	Résidu de la cible	Distance (Å)
Célécoxib	[1-1]	SO ₂ NH ₂ SO ₂ NH ₂	His90 Arg513	2.229 1.986
Etoricoxib	[1-2]	NH	Met522	2.752
Rofécoxib	[2-1]	SO ₂ CH ₃	Tyr385	2.280
Lumiracoxib	[2-1]	COOH COOH	Tyr385 Ser530	1.938 1.999

a-Le célécoxib



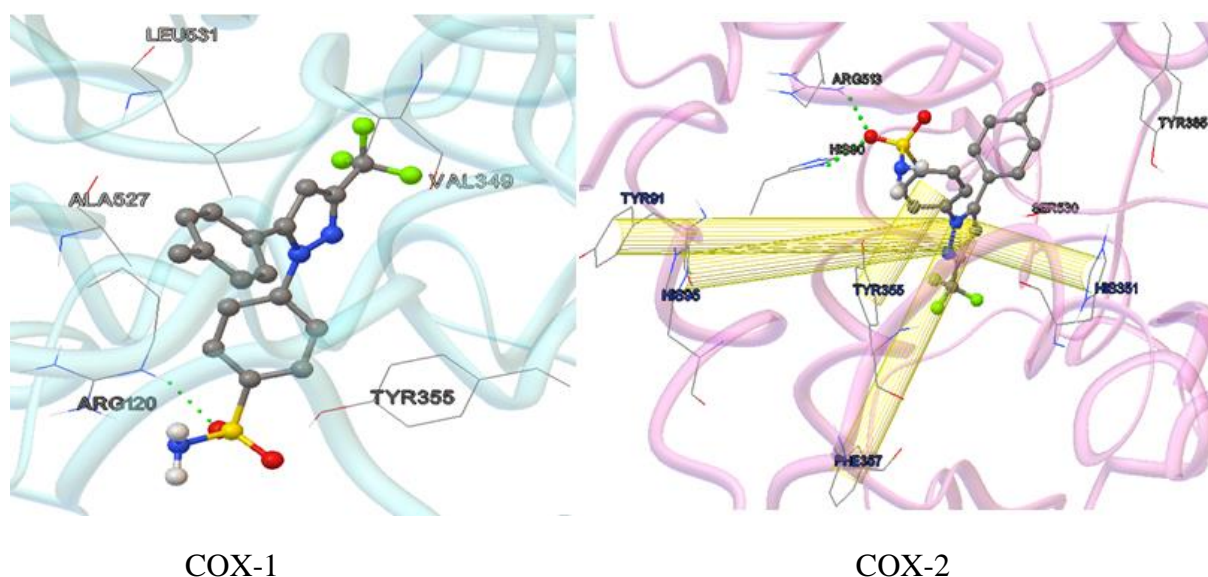


Figure 19: Mode de liaison du Célecoxib dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

La visualisation du mode de liaison du Célecoxib dans la COX-1 montre qu'il ne pénètre pas complètement dans le site actif du récepteur, le groupement SO_2NH_2 reste bloqué en dehors du site en se mettant à proximité des résidus **Arg120** et **Tyr355**, formant ainsi une liaison hydrogène avec l'**Arg120**. En effet aucune autre interaction stabilisante n'est observée, ce qui explique la très faible activité du Célecoxib sur la COX-1.

Dans la COX-2 où le site actif est plus volumineux, l'insertion du Célecoxib est intégrale, L'analyse visuelle du complexe Célecoxib/COX-2 montre que l'atome d'oxygène du groupement aminosulfonyl occupe la poche **P1** et forme des liaisons hydrogène avec les résidus **Arg513** et **His90**, Ce résultat est en accord avec ceux déjà décrits dans la littérature [7,17]. Ainsi, le groupement guanidinium du résidu **Arg513** semble jouer un rôle important dans la fixation des composés dans le site de COX-2. La littérature identifie l'**Arg513** comme résidu pertinent dans les interactions électrostatiques avec des groupements azido d'une série de composés très sélectifs de la COX-2 [21,18]. Aussi, on observe la formation de 5 interactions hydrophobes de type π - π avec les résidus **Tyr91**, **His95**, **Tyr355**, **His351**, **Phe357**.

Le groupement pyrazole occupe la poche **P4** et le phenyl occupe la poche **P2** ; ce qui est en accord avec notre travail antérieur [22].

b-L'Etoricoxib

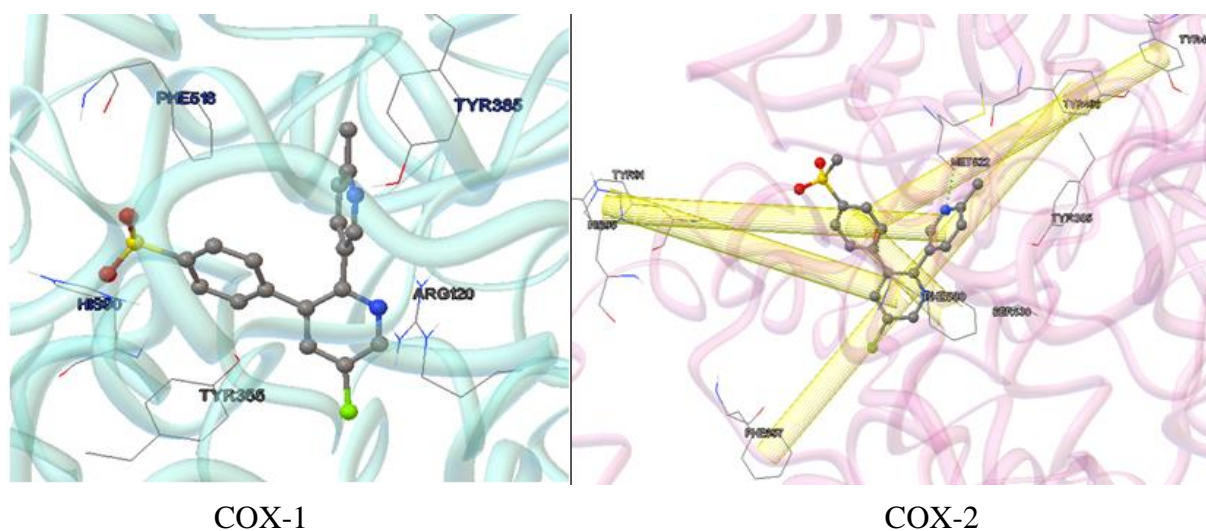
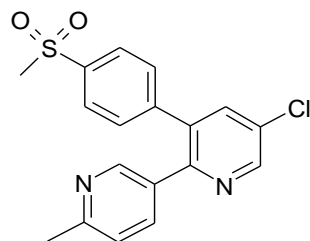


Figure 20 : Mode de liaison de l'Etoricoxib dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Le mode de liaison favorable montre que l'Etoricoxib ne rentre pas entièrement dans le site actif de la COX-1. En effet, le chlore du groupement chlorophenylpyridine se positionne hors du canal arachidonique et on n'y observe aucun type d'interaction stabilisante. On note que le groupement méthyle-sulfonyl est à proximité du résidu **His90**.

Dans le complexe Etoricoxib/COX-2 nous relevons d'une part, **6** interactions hydrophobes de type π - π avec les résidus **Tyr91**, **His95**, **Phe357**, **Tyr460**, **Phe580** et **Tyr460** et, d'autre part, une liaison hydrogène établie avec le résidu **Met522**.

Les poches **P1**, **P2**, **P4** sont occupées par les groupements : méthylsulfone, le phenyl et pyridinyl respectivement.

c-Le rofécoxib

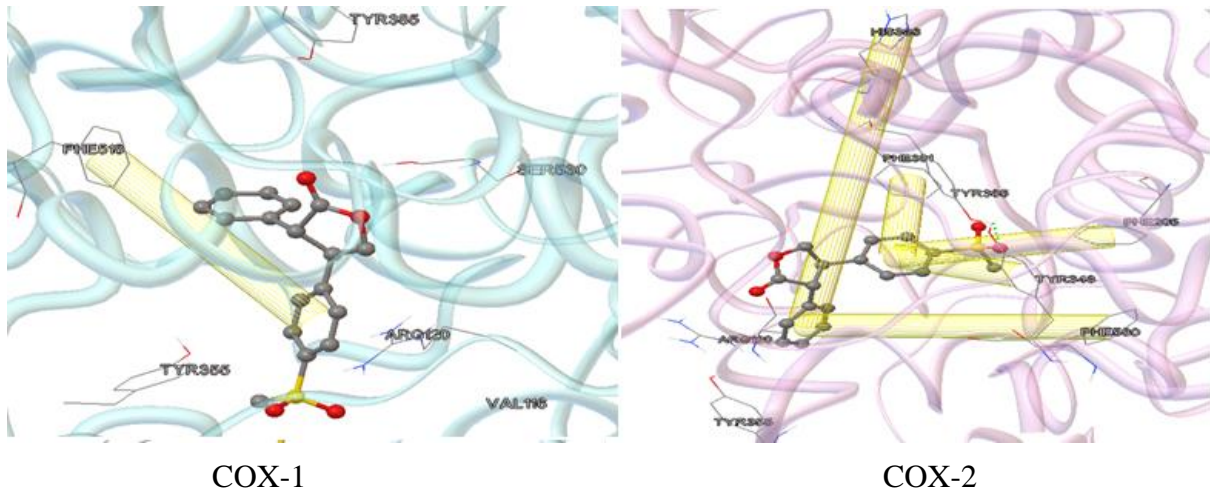
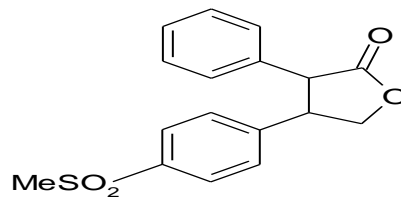


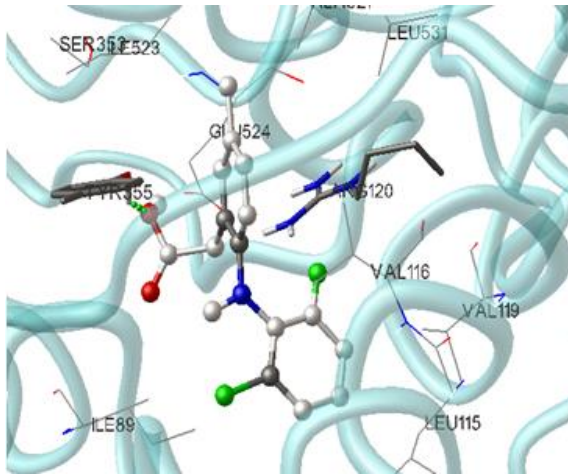
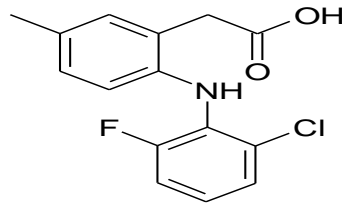
Figure 21: Mode de liaison du Rofécoxib dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

L'illustration montre que le Rofécoxib ne rentre pas complètement dans le site actif de la COX-1 et qu'une interaction hydrophobe de type π - π se forme entre **Phe518** et le phenyl de groupement sulfoné.

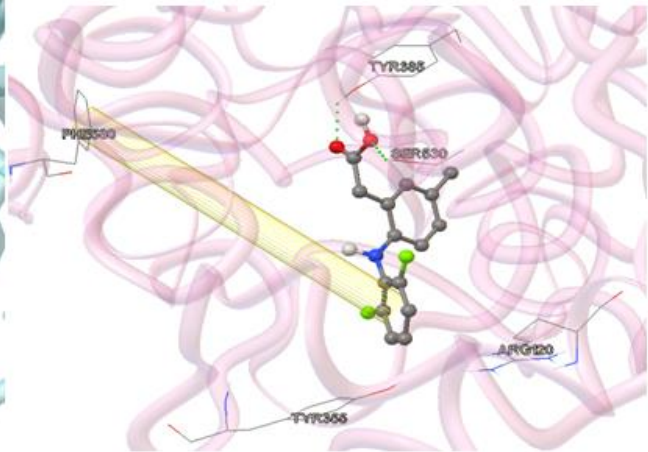
Le complexe Rofécoxib/COX-2 est stabilisé par des interactions hydrophobes de type π - π avec les groupements aromatiques des résidus **Phe205**, **Tyr348**, **Phe381**, **His386**, **Phe580**, comme il est observé sur la figure 21, nos résultats révèlent aussi la présence d'une liaison hydrogène importante avec le résidu **Tyr385** résidu initiateur de la catalyse de la COX-2.

Pour récapituler, le méthylsulfone occupe la poche **P1**, le furanone occupe la poche **P4** et le phenyl se positionne dans la poche **P2**.

d-Le Lumiracoxib



COX-1



COX-2

Figure 22: Mode de liaison du Lumiracoxib dans la 1EQG (COX-1) et la 3NT1 (COX-2).

Nos simulations par le docking dans COX-1, conduisent le lumiracoxib à bloquer l'entrée du site actif par une interaction hydrogène avec la **Tyr355**, l'empêchant ainsi d'aller plus loin dans le site ; ce qui explique sa faible activité sur la COX-1

Dans la COX-2, le lumiracoxib est orienté de manière à établir des liaisons hydrogène entre son groupement acide qui occupe la poche **P2** et les chaînes latérales des résidus **Tyr385** et **Ser530**. De plus, une interaction de type hydrophobe est observée entre le groupement aromatique du résidu **Phe580** et le chlorofluorophenyl occupant la poche **P4**.

Superposition des coxibs

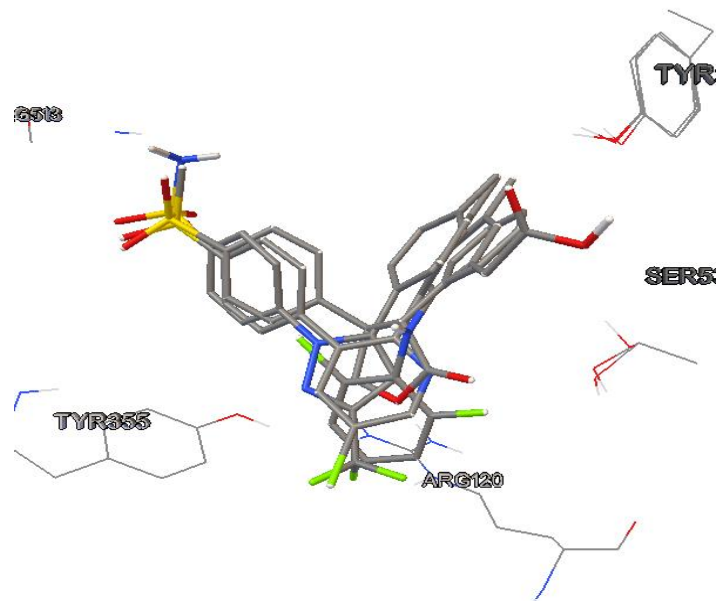


Figure 23 : Superposition des meilleurs positionnements des COXIBs dans la COX-2.

La superposition des conformations viables ou retenues à l'issue du docking montre que les COXIBs s'insèrent bien dans le site actif de la COX-2. A l'exception du lumiracoxib, possédant un groupement acide et dépourvu de groupement sulfoné, on peut affirmer que les COXIBs adoptent le même positionnement dans la COX-2. Toutefois, le lumiracoxib adopte une conformation de manière à ce que ses groupements se positionnent dans les mêmes poches que les autres coxibs ; ce qui est en accord avec leur profil commun sélectif anti-COX-2.

En effet,

- ✓ le sulfonamide du célécoxib, le méthylsulfone du rofécoxib et l'étoricoxib, occupe chacun l'espace délimité par les résidus **Ala516, Arg513, His90, Gln192** et **Phe518** (poche **P1**).
- ✓ Le groupement phenyl occupe l'espace localisé au sommet de la cavité qui est constituée par des acides aminés à majorité hydrophobes : **Tyr348, Tyr385, Phe518, Met522** et **Trp387** (poche **P2**).
- ✓ L'hétérocycle central : pyridinyl de l'étoricoxib, le furanone du rofécoxib et le pyrazole du célécoxib, se positionne dans l'espace localisé à proximité de l'entrée du site actif lequel est délimité par la **Leu359, Tyr355, Val116** et **Arg120**. 'bouche du site actif' (poche **P4**).

Il ressort de cette étude que les sélectifs COX-2 fixent la protéine par un nombre important d'interactions. Nos résultats concernant les interactions établies par chacun des ligands au sein de la COX-2, montrent que le célécoxib se lie à la COX-2 plus fortement que l'étoricoxib et le rofécoxib. Ce résultat est en accord avec la littérature qui rapporte que le célécoxib fixe la COX-2 à 97% [6], l'étoricoxib à 92% [7] et le rofécoxib à 87% [5].

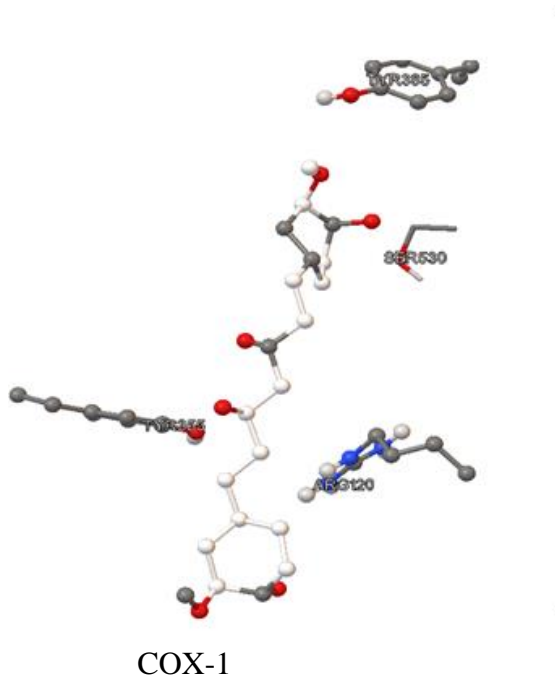
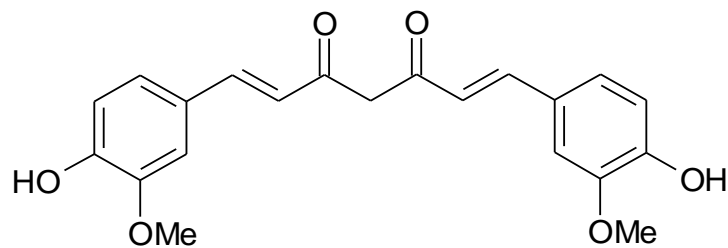
Il est important de noter que ces résultats de classement de l'affinité des coxibs sur COX-2 sont corroborés par les énergies de liaison, estimées par les enthalpies libres de liaison calculées par AutoDock4. Nous les donnons dans le tableau suivant :

Tableau 5: Energies de liaison $\Delta G_{\text{binding}}$ (Kcal/mol) et IC_{50} (μM) des sélectifs COX-2 étudiés

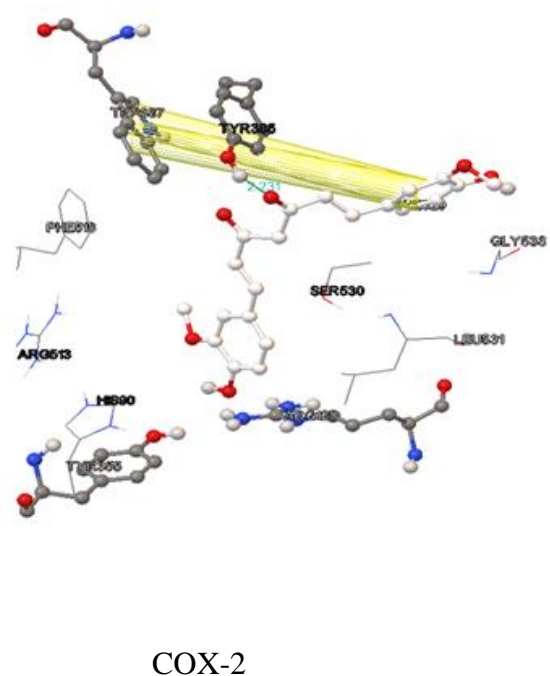
Molécule	$\Delta G_{\text{binding}}$	IC_{50}
Célécoxib	-11	0.069
Etoricoxib	-10.41	1.1
Rofécoxib	-8.84	0.645
Lumiracoxib	-5.09	0.13

4- Molécules naturelles

a- Curcumine



COX-1

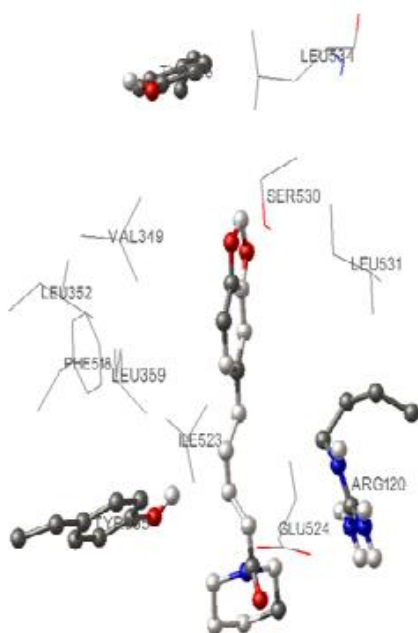
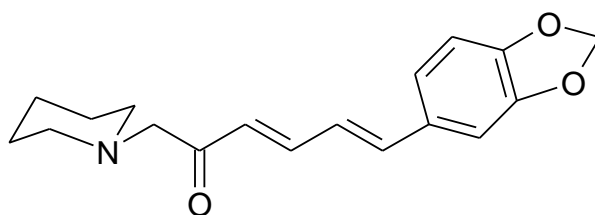


COX-2

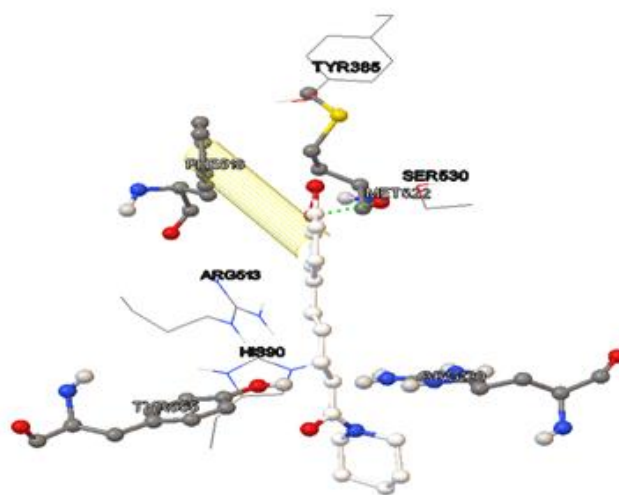
Nos résultats montrent que la curcumine ne semble pas pénétrer dans le site de la COX-1 ; ce qui peut prédire une activité faible voire inexistante sur COX-1. Cependant, elle s'insère bien dans le site de la COX-2 et le complexe ainsi formé est stabilisé d'une part, par 2 interactions hydrophobes de type π - π entre le ligand et le résidu **Trp387** et, d'autre part, une liaison hydrogène avec la **Tyr385**.

Cette analyse montre que la curcumine, connue pour sa non toxicité [23] semble présenter un profil préférentiel voire sélectif COX-2.

b- Pipérine



COX-1

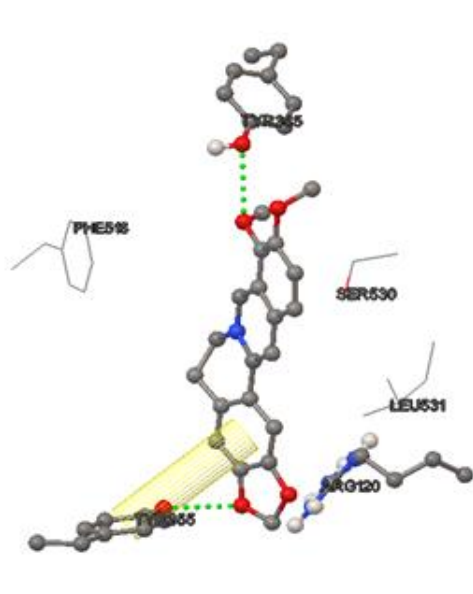
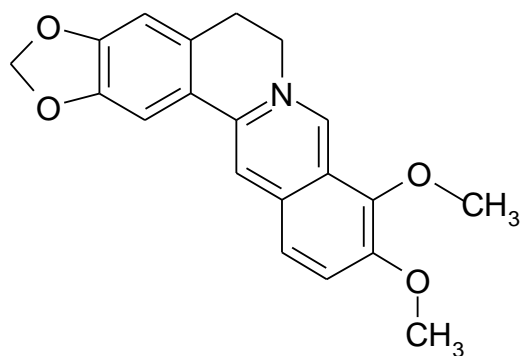


COX-2

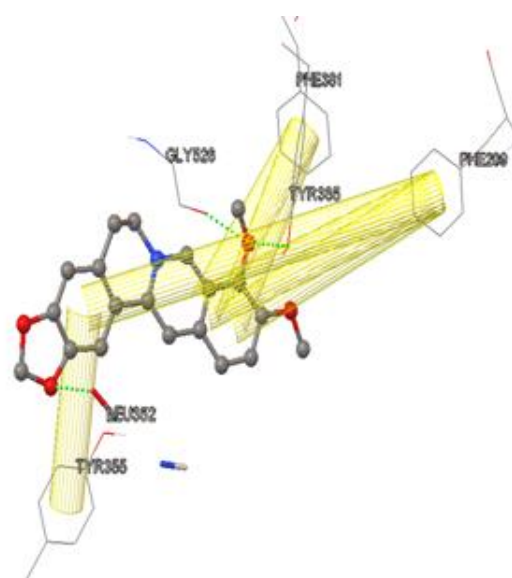
La visualisation du mode de liaison de la pipérine dans la COX-1, montre que le ligand ne pénètre pas complètement dans le site actif du récepteur et aucune interaction avec le récepteur n'est observée.

Bien que la pipérine ne pénètre pas entièrement dans la COX-2, on observe dans le site de liaison **2** interactions stabilisantes : **1** liaison hydrogène avec le résidu **Met522** et **1** de nature hydrophobe de type π - π avec le résidu **Phe518**, identifié comme résidu pertinent [24]. Ce résultat peut vouloir signifier que la pipérine est susceptible de présenter un profil préférentiel COX-2. Il est bon de noter que cette épice est connue pour potentialiser l'activité de la curcumine et, en particulier, son effet anti-oxydant voire anti-inflammatoire [25].

c- Berbérine



COX-1



COX-2

Dans la COX-1, la berbérine forme 2 liaisons hydrogène avec la **Tyr355** et la **Tyr385**. On observe aussi la formation d'une interaction hydrophobe de type t-shaped avec la **Tyr355**.

Dans la COX-2, la Berbérine est stabilisé par deux types d'interactions : 6 de nature hydrophobe avec les résidus : **Tyr355**, **Phe209** et **Phe381**, 3 liaisons hydrogène, avec la **Tyr355**, **Tyr385** et **Gly523**. Cet important réseau d'interactions très favorables à la 'viabilité' du complexe Berbérine/COX-2, peut signifier que cette épice d'origine asiatique présente un profil très préférentiel COX-2.

Tableau 5: Energies de liaison $\Delta G_{\text{binding}}$ (Kcal/mol) des molécules naturelles.

Molécule	$\Delta G_{\text{binding}}$	
	COX-1	COX-2
Curcumine	-2.91	-4.8
Pipérine	-3.22	-3.48
Berbérine	-3.50	-4.28

VI-CONCLUSION

Ce travail, mené au moyen du docking moléculaire flexible utilisant la suite de programmes d'Autodock4, consiste à comprendre le mode de reconnaissance COX-1 et COX-2, d'une série d'anti-inflammatoires non stéroïdiens synthétiques et naturels. Les ligands issus des structures cristallographiques 1EQG.pdb et 3NT1.pdb ont été dockés pour valider la pertinence du protocole utilisé.

Les 13 molécules sélectionnées dans la littérature ont été soigneusement dockées dans les sites actifs des 2 COXs. Les modèles ainsi obtenus sont en accord qualitatif avec leur affinité pour l'une ou l'autre COX.

Cette étude nous a permis de discerner les critères de sélectivité enzymatique, des ligands synthétiques, au niveau atomique. Par ailleurs, cette étude nous a permis de prédire le profil anti-inflammatoire des trois épices largement utilisées en aromathérapie et en milieu culinaire.

Notre étude a mis en évidence l'importance de certains résidus déjà décrits dans la littérature. En effet, dans la COX-1 nous avons relevé notamment l'**Arg120** et la **Tyr355** qui sont impliqués dans des interactions de type liaison hydrogène avec les ligands ayant des groupements carboxyliques. Dans la COX-2, les résidus **His90**, **Tyr385**, **Arg513**, **Phe518**, **Ser530**, **Tyr353** établissent des liaisons hydrogène avec le ligand et certains résidus aromatiques, en particulier **His95**, **Tyr91**, **Phe357**, **Tyr355**, **His351**, **Phe580**, **Tyr460**, sont impliqués dans la reconnaissance du ligand moyennant des interactions π - π .

En conclusion, notre étude pourrait aider dans le développement de nouveaux inhibiteurs à profil COX-1 ou COX-2, en ciblant les interactions favorisant l'activité inhibitrice.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-Morris GM., Goodsell DS., Halliday RS., Huey R., Hart WE., Belew RK., Olson AJ. *Journal of Computational Chemistry*; **1998**, 19: 1639-1662.
- 2-Talley JJ. *Prog MedChem*; **1999**,36:201-34.
- 3- Scott LJ., Lamb HM. *Drugs*; **1999**, 58:499-505.
- 4- Davies NM., McLachlan AJ., Day RO., Williams KM. *Clin Pharmacokinet*; **2000**, 38:225-42.
- 5- Cochrane DJ., Jarvis B., Keating GM. *Drugs*; **2002**, 62:2637-51.
- 6-Sorbera LA., Castaner J., Bayes M., Silvestre JS. *Drugs Fut*; **2002**,27:740-7.
- 7- Bouaziz-Terrachet S., Toumi-Maouche A., Maouche B., Taïri-Kellou S. *J Mol Model*; **2010**, 16 : 1919-1929.
- 8-Silvia B., Paolo T., Marta G., Marco L., Roberta. *F.Springer-Verlag Berlin Heidelberg*; **2012**.
- 9- Hegazy GH.,Ali HI. *Bioorg Med Chem*; **2012**, 20: 1259-1270.
- 10-Kurumbail RG., Stevens AM., Gierse JK., McDonald JJ., Stegeman RA., Pak JY., Gildehaus D., Miyashiro JM., Penning TD., Seibert K., Isakson PC., Stallings WC., *Nature*; **1996**, 384 : 644-648.
- 11-Llorens O., Perez JJ., Palomer A., Mauleon D. *J. Mol. Graph. Model*; **2002** , 20 : 359-371.
- 12-Blower PR., *J. Rheumatol. Suppl*; **1992**, 36 : 13-19.
- 13-Bhattacharyya D., Lecomte M., Rieke C., Garavito R M., Smith W. *JBiol. Chem*; **1996**, 2179:2184.
- 14 - Kurumbail RG., Stevens AM., Gierse JK., McDonald JJ., Stegeman RA., Pak JY.,Gildehaus D., Miyashiro JM., Penning TD., Seibert K., Isakson PC., Stallings WC., **1996**, 384 ; 644-648.
- 15- Llorens O.,Perez JJ., Palomer A.,Mauleon D. *J. Mol. Graph. Model* ; **2002**, 20 : 359- 371.
- 16- Thuresson ED., Lakkides KM., Rieke CJ., Sun Y., Wingerd BA., Micielli R., Mulichak AM., Malkowski MG., Garavito RM., Smith WL. *J. Biol. Chem*; **2001**, 276 : 10347-10359.
- 17-Hawkey CJ.*Lancet* ; **1999** ,353 : 307-314.
- 18- Rowlinson S W., Kiefer J R., Prusakiewicz J J., Pawlitz JL.,Kozak K R., Kalgutkar A S., Stallings WC., Kurumbail R G.,Marnett L J. *The Journal of Biological Chemistry*; **2003** 45763–45769.

- 19-Rowlinson SW., Kiefer JR., Prusakiewicz JJ., Pawlitz JL., Kozak KR., Kalgutkar AS., Stallings WC., Kurumbail RG., Marnett LJ. *J Biol Chem*; **2003**, 278:45763–45769.
- 20-Kiefer JR., Pawlitz JL., Moreland KT., Stegeman RA., Hood WF., Gierse JK., Stevens AM., Goodwin DC., Rowlinson SW., Marnett LJ., Stallings WC., Kurumbail RG. *Nature*; **2000**, 405:97–101.
- 21- Rao PN., Uddin MJ., Knaus EE., *J Med Chem*; **2004**, 47:3972–3990.
- 22- Bouaziz T S., Terrachet R., Kellou T S . *Medicinal Chemistry Research*; (12 July 2012), pp. 1-9, doi:10.1007/s00044-012-0174-z.
- 23- Mathy M., Sanchez C., Henrotin Y. 20 congrès français de rhumatologie- CNIT, Paris- la défense, 2007, 1023 : 10-11.
- 24- El-Sayed M A A., Abdel-Aziz N I., Abdel-Aziz Alaa AM., El-Azab AS., ElTahir K EH. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; **2012**, 20:3306–3316.
- 25- Hyung G K., Eun H Ha., Woo-Seok J., Jae H C., Tilak K., Bong H Pa., Thu P T., Young C C., Hye G J. *food and Chemical Toxicology*; **2012**, 2342-2348.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans ce manuscrit constituent une contribution à la compréhension, au niveau atomique, du mécanisme d'action de quelques anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), dont certains présentent une activité sur chacune des deux enzymes responsables de l'inflammation, à savoir la COX-1 et la COX-2.

Ces études, portant essentiellement sur les modes de reconnaissance des sites actifs par certains AINS synthétiques et naturels, ont été essentiellement réalisées au moyen des méthodes de la chimie théorique et, en particulier, d'une technique de drug design, basée sur la cible biologique dite 'receptor based' et plus connue sous le nom de « docking moléculaire ».

Le phénomène inflammatoire qui est une réponse de l'organisme à une agression tissulaire voire cellulaire peut dans certains cas induire d'importantes pathologies. De ce fait, la communauté scientifique investit ses efforts dans le domaine de la thérapie anti-inflammatoire bien ciblée. En effet, cette thématique connaît de nos jours un développement considérable avec des retombées prometteuses dans d'autres domaines thérapeutiques.

Nous avons investi cette thématique par une recherche bibliographique exhaustive et nous avons résumé les résultats de notre investigation dans le premier chapitre. Cette rétrospective a été cruciale car elle nous a permis d'une part, de bien positionner la problématique et, d'autre part, de soutirer le maximum d'informations expérimentales nécessaires voire pertinentes à une approche rationnelle *in silico*.

Nous avons mené les travaux reportés dans ce manuscrit au moyen d'une étude par le docking moléculaire qui représente aujourd'hui une technique rationnelle en drug design. Tout en nous focalisant essentiellement sur les techniques de conception rationnelle de médicaments, nous avons aussi décrits brièvement, dans le chapitre II, les principales méthodes utilisées en chimie théorique. Ces outils performants, de la modélisation moléculaire, devraient aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'interaction ligand/récepteur et, à terme, permettre de rationaliser la conception de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

Nous avons aussi présenté dans ce chapitre les outils informatiques ou logiciels ainsi que la méthodologie adoptée dans l'obtention des modèles ligand/récepteur, qui nous ont permis d'analyser les modes de reconnaissance de chacun des ligands considérés.

Le troisième chapitre rapporte essentiellement les résultats obtenus au cours de ce travail et il concerne le mode de reconnaissance d'une série d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. Nous avons mené ce travail, utilisant la première grande voie d'étude de molécules par modélisation moléculaire, en l'occurrence le docking moléculaire, avec le souci d'utiliser les informations expérimentales jugées pertinentes comme guide dans notre protocole de modélisation.

Cette étude nous a permis de discerner les critères de sélectivité enzymatique COX-1 et COX-2, de chaque ligand étudié. Nous avons validé le modèle du complexe ligand/récepteur en nous basant essentiellement sur la nature, la quantité et la qualité des interactions stabilisantes obtenues.

La mise en évidence de résidus pertinents dans les sites de liaison, COX-1 et COX-2, nous a permis de discuter les différences d'affinités observées pour les composés, considérés dans notre étude. En outre, nos résultats montrent qu'il est possible de moduler l'activité voire la sélectivité des différents composés par des modifications structurales induisant de nouvelles interactions favorables à la viabilité du complexe formé.

Quant aux molécules naturelles, pour lesquelles les activités quantitatives sur COX-1 et sur COX-2 ne sont pas disponibles, les résultats ont mis en évidence la sélectivité et le mode de liaison au sein de chaque cible.

Enfin, pour remédier aux insuffisances des modèles issus du docking et aller plus loin dans nos investigations, nous comptons poursuivre ce travail en utilisant des techniques plus poussées permettant d'appréhender la flexibilité de la protéine. En effet, l'approximation consistant à négliger la variabilité structurale de la protéine lors de la fixation du ligand, considérée comme point faible de tous les logiciels de docking, peut être à l'origine de la cause des erreurs de prédiction ; ce qui incite à envisager la poursuite de ce travail au moyen de simulations en dynamique moléculaire.

ANNEXES

Annexe 1

NOMENCLATURE IUPAC ET DISPONIBILITE SUR LE MARCHE

Tableau 1: Nomenclature IUPAC et disponibilité sur le marché des molécules étudiées

Nom	Nomenclature IUPAC	Nom commercial du médicament	Disponibilité sur le marché international
Flurbiprofène	2-(2-fluorobiphenyl-4-yl)propanoic acid	Antadys	Oui
Ibuprofène	2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoic acid	Advil	oui
Kétoprofène	2-(3-benzoylphenyl)propanoic acid	Bi-profène	oui
Piroxicam	4-hydroxy- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)-4a,8a-dihydro-2 <i>H</i> -1,2-benzothiazine-3-carboxamide-1,1-dioxyde	Feldene	oui
Tenoxicam	4-hydroxy-2-méthyl- <i>N</i> -(pyridin-2-yl)-2 <i>H</i> -thiéno[2,3- <i>e</i>][1,2]thiazine-3-carboxamide-1,1-dioxyde	Mobiflex	oui
Sulindac sulfide	acide (1 <i>Z</i>)-5-fluoro-2-méthyl-1-{4-(méthylsulfanyl)cyclohexa-2,4-dién-1-yl}méthylidène}-1 <i>H</i> -indène-3-carboxylique	Clinoril	oui
L-748	acide 5-méthoxy-2-méthyl-1-(2,4,6-trichlorobenzoyl)-1 <i>H</i> -indole-3-carboxylique	-----	-----
L-780	acide 1-(4-bromobenzyl)-5-méthoxy-2-méthyl-1 <i>H</i> -indole-3-carboxylique	-----	-----

Diclofénac	acide {2-[(2,6-dichlorophényl)amino]-5-méthylphényl}acétique	Voltarene	oui
Célécoxib	4-[5-(4-méthylphényl)-3-(trifluorométhyl)-1 <i>H</i> -pyrazol-1-yl]benzènesulfonamide	Celebrex	oui
Rofécoxib	4-[4-(méthylsulfonyl)phényl]-3-phényldihydrofuran-2(3 <i>H</i>)-one	Vioxx	Retiré du marché en 2004
Etoricoxib	5-chloro-6'-méthyl-3-{4-[méthyl(diméthylidène)-1 ⁶ -sulfanyl]phényl}-2,3'-bipyridine	Arcoxia	oui
Lumiracoxib	acide {2-[(2-chloro-6-fluorophényl)amino]-5-méthylphényl}acétique	Prexige	oui

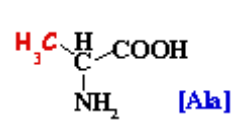
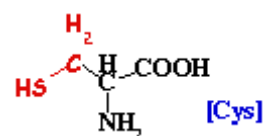
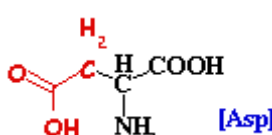
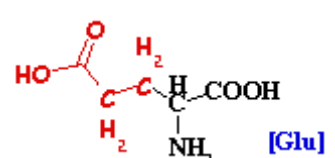
Annexe 2

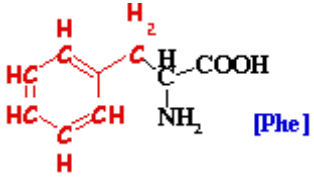
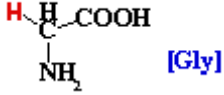
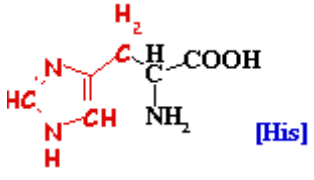
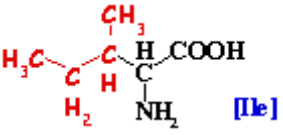
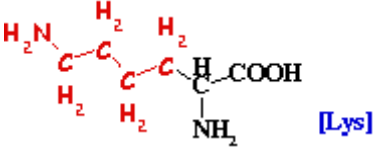
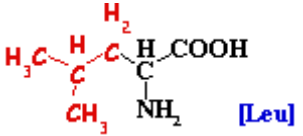
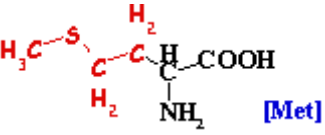
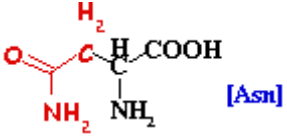
Les acides aminés

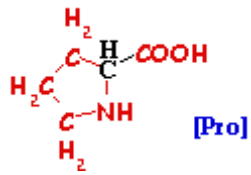
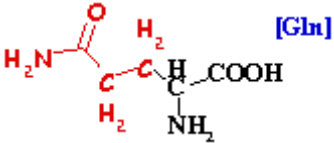
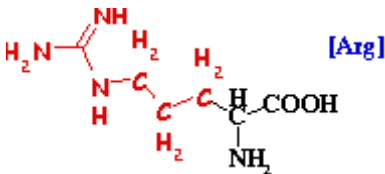
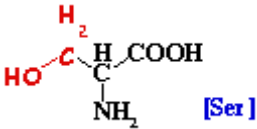
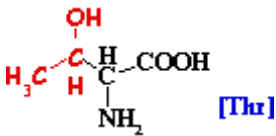
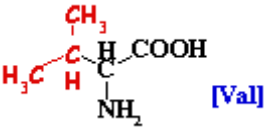
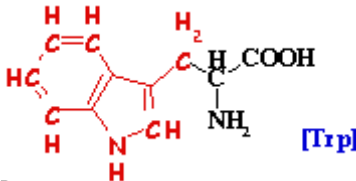
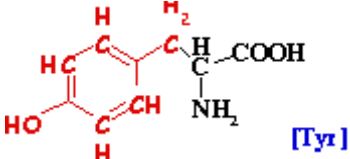
Les acides aminés, sont les briques de construction des protéines grâce à leur assemblage par des liaisons peptidiques, ils possèdent un squelette carboné et 2 fonctions: une fonction amine et une fonction acide carboxylique. Le type (α , β , δ) d'acide aminé est relié à la position de l'amine sur la chaîne carbonée. Les acides aminés composant les protéines sont les acides α -aminés. C'est à dire que la fonction amine est en position α de la fonction acide. Ce sont des molécules relativement petites, 20 acides aminés composent généralement les protéines, 9 d'entre eux sont dits essentiels pour l'alimentation humaine.

Le tableau ci-dessous résume les principales données caractéristiques de ces 20 acides aminés (les codes et abréviations indiqués sont ceux spécifiés par le comité de nomenclature commun [IUAPC](#) -[IUBMB](#))

Tableau 2: Structure avec le code de trois lettres et d'une lettre des 20 acides aminés naturels composant les protéines.

Acide aminé	Nature	Structure 2D	Code
Alanine	Apolaire, aliphatique		Ala A
Cystéine	Polaire		Cys C
Acide aspartique	Acide		Asp D
Acide glutamique	Acide		Glu E

Phénylalanine	Apolaire, aromatique		Phe F
Glycine	Apolaire, aliphatique		Gly G
Histidine	Basique, aromatique		His H
Isoleucine	Apolaire, aliphatique		Ile I
Lysine	Basique		Lys K
Leucine	Apolaire, aliphatique		Leu L
Méthionine	Apolaire		Met M
Asparagine	Polaire		Asn N

Proline	Apolaire		Pro P
Glutamine	Polaire		Gln Q
Arginine	Basique		Arg R
Sérine	Polaire		Ser S
Thréonine	Polaire		Thr T
Valine	Apolaire, aliphatique		Val V
Tryptophane	Apolaire, aromatique		Trp W
Tyrosine	Polaire, aromatique		Tyr Y

Echelle d'hydrophobicité d'Eisenberg

Les acides aminés sont regroupés en deux familles, hydrophobes et hydrophiles (Tableau 3). Cette classification se base sur l'échelle d'hydrophobicité d'Eisenberg.

Tableau 3: Différentes familles d'acides aminés

Familles	Sous familles	Acides aminés
hydrophobes	Aliphatiques	Ala, Ile, Leu, Met, Val
	Aromatiques	Phe, Trp, Tyr
	'Particuliers'	Cys, Gly, Pro
Hydrophiles	Chargés	Arg, Asp, Glu, Lys
	Polaires	Asn, Gln, His, Ser, Thr

Annexe 3

Procédure de docking dans Autodock4

Chaque opération du docking nécessite 4 fichiers input :

- 1- pdbqt du ligand avec les torsions.
- 2- pdbqt du récepteur.
- 3- *gpf pour autogrid.
- 4- *dpf pour autodock.

Chaque opération du docking génère 2 fichiers output :

- 1- glg pour autogrid.
- 2- dlg pour autodock.

Les 6 étapes à suivre pour le docking moléculaire :

Etape 1 : préparation du fichier pdbqt du récepteur

- 1-lecture du récepteur.
- 2-colorer la protéine: color--- by atome type.
- 3-sélectionner les molécules d'eau avec : select ---select from string.
- 4-supprimer les molécules d'eau : edit---delete ---delete atom set.
- 5- ajouter les hydrogènes : edit---hydrogens---add
- 6-enregistrer en pdbqt.

Etape 2 : préparation du fichier pdbqt du ligand

- 1-lecture du ligand

Autodock détecte automatiquement si les atomes du ligand sont chargés ou pas, si non il les ajoute (charge gasteiger)

- 2- ligand---torsion tree---detect root.
- 3-choisir les torsions qui peuvent être gardées actives ou inactives : ligand---torsion tree---choose root.
- 4- ligand---torsion tree---set number of torsions : il s'agit d'une opération permettant de définir l'ordre de priorité pour les liaisons gardées actives.
- 5-enregistrer: ligand---output---save as pdbqt.

Etape 3 : préparation des résidus flexibles du récepteur

1-ouvrir le fichier pdbqt du récepteur : flexible residues---input---open(ou choose) macromolecule.

2-sélectionner les résidus flexibles : select---select from string---residue ARG120, TYR355---add.

3-choix des torsions : flexible residues---choose torsions in currently selected residues.

Le nombre total de torsion (ligand+partie flexible) doit être inférieur à 32

4- flexible residues---redisplay macromolecule

5-enregistrer la partie flexible : flexible residues---output---save flexible pdbqt

6-select---invert selection.

7- enregistrer la partie rigid : flexible residues---output---save rigid pdbqt.

Etape 4 : Autogrid

1-Ouvrir la partie rigid du récepteur : grid---macromolecule---open---*rigid.pdbqt.

2-ouvrir le fichier pdbqt du ligand : grid---set map types---open ligand.

3-construire la boîte potentiel : grid---grid box---(adapter la boîte)

4-enregistrer le fichier gpf : grid---output---save gpf.

Vérification du fichier gpf

5-lancer autogrid : run---run autogrid.

Etape 5 : Autodock

1-Ouvrir les 2 parties du récepteur :

Docking---macromolecule---set rigid filename

Docking---macromolecule---set flexible residues filename

2- ouvrir le fichier pdbqt du ligand : Docking---ligand---choose(ou open)

3-docking---search parameters---genetic algorithm.

4-enregistrer le fichier dpf docking---output---lamarckian---save dpf

Vérification du fichier dpf

5-lancer autodock: run---run autodock.