

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Interactions Ligands-Protéine :

Présenté et soutenu par : AKRICHE SARA

REGUIG IBTISSAM

Le : 25/06/2015

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme Rezgoune D. (MCB), Université Mentouri, Constantine

Examineur : M. Benmekhbi L. (MCB), Université de Msila

Rapporteur : Mme Bencheraiet R. (MCA), Université Mentouri, Constantine

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciements

On remercie Dieu qui nous a donné la force et le courage de réaliser ce travail.

Nous souhaitons tout d'abord exprimer notre gratitude à Madame Bencheraïet d'avoir accepté de nous diriger sans hésitation : Merci Madame pour vos conseils, votre patience et aussi pour tout ce que nous avons appris avec vous.

Nous tenons à remercier Madame Bencharif, la directrice du laboratoire de chimie des Matériaux Constantine (LCMC) de nous avoir permis de réaliser notre mémoire au sein de son laboratoire.

Nos remerciements vont également à tous les membres du laboratoire et particulièrement à : Monsieur Djabli et Madame Hamlaoui qui ont eu la gentillesse de nous aider et nous conseiller sur les techniques d'optimisation et de docking.

Nous voudrions remercier Madame Rezgoune.Djalila Maitre de conférences au département de Biologie Animale et Monsieur Benmekhbi. Lotfi Maitre de conférences à l'Université de Msila, qui ont bien voulu examiner ce travail.

À tous nos enseignants de Génétique Moléculaire : Un grand MERCI pour la formation que vous nous avez donnée

Nous remercions tous nos camarades étudiants de Chimie théorique Master II pour leur aide.

Nous remercions nos familles et toutes les personnes qui nous ont aidées à mener ce travail à terme.

Sommaire

Introduction	01
Chapitre I : La cyclooxygénase et ses isoformes	04
I.1. La Cyclooxygénase (COX)	05
I.1.1. La cyclooxygénase - 1	06
I.1.2. La cyclooxygénase -2	08
I.1.2.1. Le gène.....	08
I.1.2.2. Structure.....	08
I.1.2.3. Expression.....	09
I.1.2.4. Le site actif de la COX-2	09
I.1.2.5. Rôle de cyclooxygénase-2.....	10
I.1.2.5.1. cyclooxygénase-2 et carcinogenèse.....	10
a) Initiation et promotion de la tumeur.....	10
b) Apoptose.....	11
c) Angiogenèse.....	11
d) Invasion et métastase.....	12
e) Cyclooxygénase-2, système immunitaire et inflammation.....	12
I.1.3. Les Inhibiteurs des cyclooxygénases.....	12
I.1.3.1. Mode d'action générale.....	13
I.1.3.2. Les Inhibiteurs spécifique de la cyclooxygénase-2.....	14
I.1.3.3. Les effets secondaires des AINS.....	14
a) Effets secondaires digestifs.....	15
b) Effets secondaires rénaux	15
c) Effets secondaires cardiovasculaires.....	15
Chapitre II : Les flavonoïdes.....	16
II.1. Introduction.....	17
II.1.2. Structure chimique et classification.....	17
II.1.2.1. Définition	17
II.1.2.2. Distribution et localisation	18
II.1.2.3. Les différentes classes des flavonoïdes.....	19
II.1.2.4. Propriétés des flavonoïdes.....	20
II.1.2.4.1. Propriétés anti-inflammatoire.....	20
II.1.2.4.2. Propriétés anti-cancérigènes	21
II.1.2.5. Relation entre les flavonoïdes et la cyclooxygénase-2.....	22
Chapitre III: Interactions protéine-ligands : COX-2/Flavonoïdes, résultats.....	23

III.1. Introduction.....	24
III.2. Modélisation moléculaire	24
III.2.1. Le docking moléculaire.....	25
III.2.1.1. Les étapes de docking moléculaire	27
III.2.1.1.1. La recherche conformationnelle.....	28
III.2.1.1.2. La fonction de score.....	28
III.3. Interactions flavonoïdes/COX-2.....	29
III.3.1. Molécules impliquées dans le docking.....	29
III.3.1.1. Structure de COX-2 (1cx2).....	29
III.3.1.2. les acides aminés.....	30
III.3.1.3. les ligands.....	30
A) SC-558.....	31
B) Isorhamnétine.....	31
C) Tamarixétine	31
D) Quercétine	32
E) Kaempférol.....	32
F) Galangine.....	32
III.3.2. Interactions flavonols/1cx2.....	33
III.3. Calcul de ΔG	33
III.3.2.2. Étude des complexes Flavonols/1cx2.....	33
A- Complexe SC-558/1cx2.....	33
B- Complexe Iso/1cx2	34
C- Complexe TAM/1cx2.....	35
D- Complexe QUE/1cx2.....	36
E- Complexe KAE/1cx2.....	37
F- Complexe GAL/1cx.....	38
III.4. Conclusion	40
Conclusion générale	41
Références bibliographiques	43
Résumé	63

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique

aa: Acide aminé

ACTH : Adrénocorticotrophine

ADN : Acide désoxyribonucléique

AINS : Anti-inflammatoire non stéroïdiens

AIS : Anti-inflammatoire stéroïdiens

AMP : Adénosine mono phosphate

AMPc: Adénosine mono phosphate cyclique

ARN: Acide ribonucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

BAX: Bcl-2-associated X protein

BCL-2: B cell lymphoma 2

COX: Cyclooxygénase

COX-1: Cyclooxygénase 1

COX-2: Cyclooxygénase 2

DMBA: Diméthylbenz[a]anthracène

EBV: Epstein Barr Virus

EP2: E series of prostaglandin receptor 2

EP4: E series of prostaglandin receptor 4

FGF: Epithélial growth factor

H₂O₂: Peroxyde d'hydrogène

LB: Lymphocytes B

LT: Lymphocytes T

MMPc: Matrix metalloproteinase cyclique

NF-IL6: Nuclear factor for Il-6

NF-κB: Nuclear factor kappa B

Nk: Natural killer

P53: Proteine 53

PGD: Prostaglandine

PGE2: Prostaglandine E2

PGF2X: Prostaglandine F_{2x}

PGG: Prostaglandine

PGH2: Prostaglandin H2

PGI2: Prostaglandin I2

PI-3R: Phosphoinositide 3-kinase

PTGS1: Prostaglandine-endoperoxyde synthase 1

PTGS2: Prostaglandine-endoperoxyde synthase 2

TxA2: Thromboxane A2

UV: Ultraviolet

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

FGF : Facteur de Croissance des Fibroblastes

Liste des figures

Figure 01 : Résumé de la biosynthèse des prostanoides.....	05
Figure 02 : Structure de la COX-1.....	06
Figure 03 : localisation du gène de la cyclooxygénase- 2 (PTGS2) sur le chromosome1.....	08
Figure 04 : Structure de la COX-2.....	08
Figure 05 : Site actif de la COX-2.....	10
Figure 06 : Mode d'action des AINS	13
Figure 07 : Quelques inhibiteurs spécifiques de la Cyclooxygénase-2.....	14
Figure 08 : Structure de base des flavonoïdes	17
Figure 09 : Les différentes classes de flavonoïdes	19
Figure 10 : Représentation schématique du docking de deux molécules.....	25
Figure 11 : Représentation schématique des étapes du docking.....	27
Figure 12 : Entrée 1cx2 de la COX-2 vue de face.....	29
Figure 13 : Position de SC-558 dans le site actif de 1cx2.....	34
Figure 14 : SC-558 avec quelques résidus de la1cx2.....	34
Figure 15 : Position de l'isorhamnétine dans le site actif de 1cx2.....	35
Figure 16 : Isorhamnétine avec quelques résidus de la 1CX2.....	35
Figure 17 : Position de la tamarixétine dans le site actif de 1cx2.....	36
Figure 18 : Tamarixétine avec quelques résidus de la 1cx2.....	36
Figure 19 : Position de la quercétine dans le site actif de 1cx2.....	37
Figure20 : Quercétine avec quelques résidus de la 1cx2	37
Figure 21 : Position du kaempférol dans le site actif de 1cx2	38
Figure 22 : Kaempférol avec quelques résidus de la 1cx2.....	38
Figure 23 : Position de la galangine dans le site actif de 1cx2.....	39
Figure24 : Galangine avec quelques résidus de la 1cx2.....	39

Liste des tableaux

Tableau 01 : Différences Cyclooxygénase -1 / Cyclooxygénase -2	07
Tableau 02 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes.....	18
Tableau 03 : L'ensemble de l'acide aminé.....	30
Tableau 04 : Valeurs de ΔG_{bind} du complexe COX2/flavonol.....	33
Tableau 05 : Liaisons hydrogènes dans le complexe SC-558/1cx2	34
Tableau 06 : Liaisons hydrogènes dans le complexe ISO/1cx2.....	34
Tableau 07 : Liaisons hydrogènes dans le complexe TAM/1cx2.....	35
Tableau 08 : Liaisons hydrogènes dans le complexe QUE/1cx2.....	36
Tableau 09 : Liaisons hydrogènes dans le complexe KAE/1cx2.....	37
Tableau 10 : Liaisons hydrogènes dans le complexe GAL/1cx2	38

Introduction générale

Selon l'Organisation mondiale de la santé, environ 14,1 millions de nouveaux cas de cancer ont été enregistrés en 2012 et le nombre de décès dus au cancer survenus la même année s'élèveraient à 8,2 millions (**FERLAY et al., 2013**).

Certains cancers seraient liés à une dérégulation locale de la voie de l'inflammation. Les liens entre inflammation chronique et cancer sont établis. En effet, des études ont montré que des personnes ayant des prédispositions génétiques favorisant les phénomènes inflammatoires avaient un risque plus important de développer un cancer¹.

L'inflammation entraîne l'altération de certaines cellules et met en jeu des médiateurs biologiques tels que les prostanoïdes. Ces derniers sont le résultat de l'activation de la cascade de l'acide arachidonique par la COX-2, une isoforme de la cyclooxygénase, découverte il y a une vingtaine d'années. Elle est présente au niveau des foyers inflammatoires et elle est responsable de nombreux états physiologiques et pathologiques.

La COX-1, l'autre isoforme, produit des prostanoïdes cytoprotecteurs dans différentes fonctions de l'organisme et son inhibition provoque des effets indésirables importants au niveau gastrique, rénal et de la circulation sanguine. C'est pourquoi des laboratoires essaient de trouver des molécules ayant un effet inhibiteur sur COX-2, sans influencer sur l'activité de COX-1².

Jusqu'à présent, l'emploi de produits de synthèse entraînent parfois des réactions néfastes pour l'organisme, d'où l'intérêt des chercheurs pour l'utilisation de molécules d'origine naturelle. Parmi le grand nombre de composés issus du métabolisme secondaire des plantes, les flavonoïdes seraient des candidats potentiels pour jouer le rôle d'inhibiteurs de COX-2 (**PERERA et al., 2001**).

C'est dans ce contexte que se situe notre travail qui a pour objectif de déterminer l'interaction de COX-2, enzyme impliquée dans l'inflammation avec une série de flavonols afin d'établir une relation entre ces molécules et leur éventuel pouvoir inhibiteur sur la cyclooxygénase-2.

¹(<http://www.inserm.fr/espace-journalistes/le-lien-entre-cancer-et-inflammation-se-resserre>)

²(<http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/dossiers/d/medecine-etude-reaction-inflammatoire-partie-2-205/>).

Pour réaliser cette étude *in silico* (HERNANDEZ et al., 2007), le docking moléculaire sera utilisé. Pour cela nous nous sommes tournées vers les approches de la modélisation.

La simulation *in silico* (docking moléculaire) entre l'enzyme et le ligand, de part son coût peu onéreux et sa rapidité à se mettre en œuvre, reste une bonne alternative qui permet à la recherche dans le domaine du médicament d'avancer plus vite.

In silico, le docking moléculaire, vise à prédire la formation du complexe le plus stable résultant de la protéine et du ligand pris séparément. L'avantage essentiel de cette approche est de mettre en évidence les propriétés électroniques, structurales et énergétiques de l'architecture moléculaire ainsi constituée.

Le présent mémoire comporte trois parties :

Le premier chapitre est présenté sous forme d'une revue bibliographique consacrée à la description des deux isoformes de la cyclooxygénase (COX). Il sera question de la régulation, rôle, localisation tissulaire et similitude structurelle entre la cyclooxygénase 1 et 2 et également l'implication de la cyclooxygénase 2 dans les cancers.

Le deuxième chapitre est consacré à une présentation des flavonoïdes, composés issus du métabolisme secondaire des plantes : leur structure, leur classification et leurs propriétés biologiques.

La dernière partie de ce travail consiste en une étude *in silico* de l'inhibition de la COX-2 par des flavonols choisis et qui sont employées comme ligands. Le docking est effectué à l'aide de ArgusLab 4.01, logiciel libre. L'énergie libre (ΔG_{bind}) et les liaisons hydrogènes sont utilisées pour analyser les interactions entre les flavonoïdes et le site actif de COX-2. L'évaluation de l'activité se fait par comparaison avec des grandeurs expérimentales.

Toute notre recherche et nos calculs ont été réalisés au sein du **Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine (LCMC)**.

Chapitre I

La cyclooxygénase et ses isoformes

I.1. La cyclooxygénase (COX)

La cyclooxygénase (COX) ou prostaglandine G/H synthase, est une enzyme capable de convertir l'acide arachidonique (AA), qui participe à la formation des membranes cellulaires, en prostaglandines H₂, responsables de nombreuses fonctions physiologiques, notamment au niveau musculaire (**Figure 01**). Au début des années 1990, deux isoformes de cette enzyme ont été identifiées : la cyclooxygénase 1 et la cyclooxygénase 2 (XIE et *al.*, 1991).

La COX-2 est en partie responsables de phénomènes inflammatoires³.

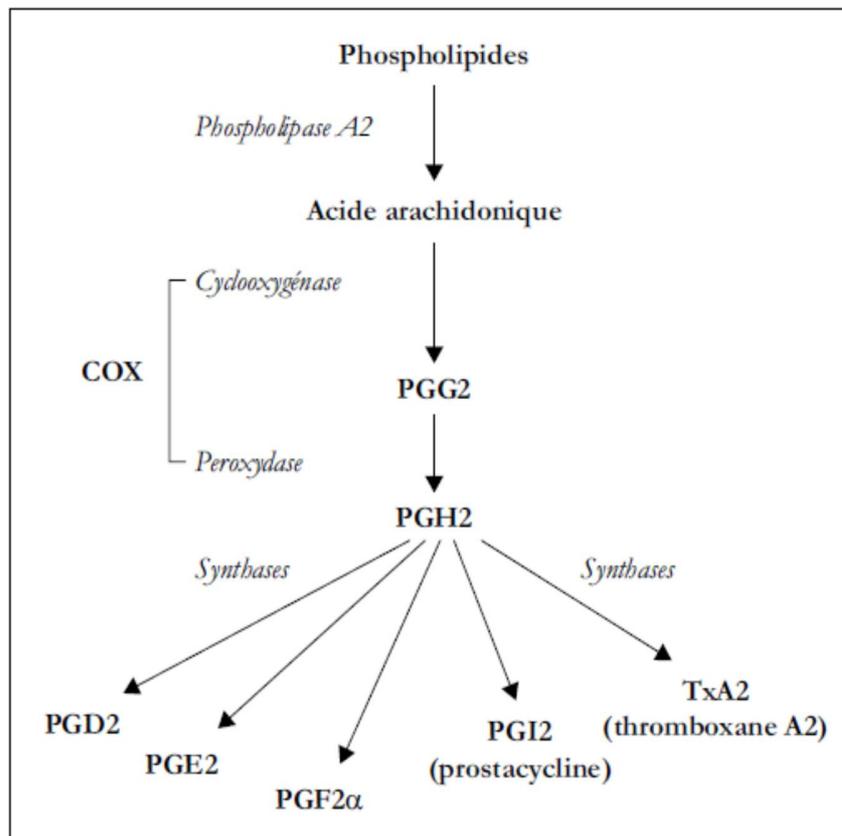


Figure 01 : Résumé de la biosynthèse des prostanoides (BOTTING, 2006 ; MERIC et *al.*, 2006)

³(<http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/19197-cyclo-oxygenase-definition>)

La présence de COX-1 est **constitutive** dans la plupart des tissus à des concentrations à peu près constantes (**WILLOUGHBY et al., 1996**), elle joue un rôle lui permettant le maintien des fonctions physiologiques comme la cytoprotection (**SHATTUCK et al., 2000**).

La COX-2 n'est pas présente dans les conditions physiologiques normales (**SEIBERT et al., 1994**). Son expression est induite par certains stimuli dont les cytokines pro-inflammatoires, les substances carcinogènes, les oncogènes, les facteurs de croissance, l'hypoxie et la radiothérapie (**SMITH et DEWITT, 1996 ; VANE et al., 1998**).

Les deux isoformes COX-1 et COX-2 possèdent des rôles biologiques différents (**Tableau 01**) (**HOUCHAN et al., 2000**).

I.1.1. La Cyclooxygénase-1

La cyclooxygénase-1 est une protéine de 71kDa composée de 576 acides aminés (aa). Par ailleurs, fixée à la membrane des cellules, c'est une hémoprotéine et une glycoprotéine (**PIOOT et al., 1994**).

La COX-1 est bifonctionnelle, (**DE WITT, 1991**) codée par un gène du chromosome 9. Le promoteur de ce gène ne contient pas de TATAbox ce qui implique que cette enzyme n'est pas régulée, d'où son caractère constitutif (**OSHIMAT et al., 1991**).

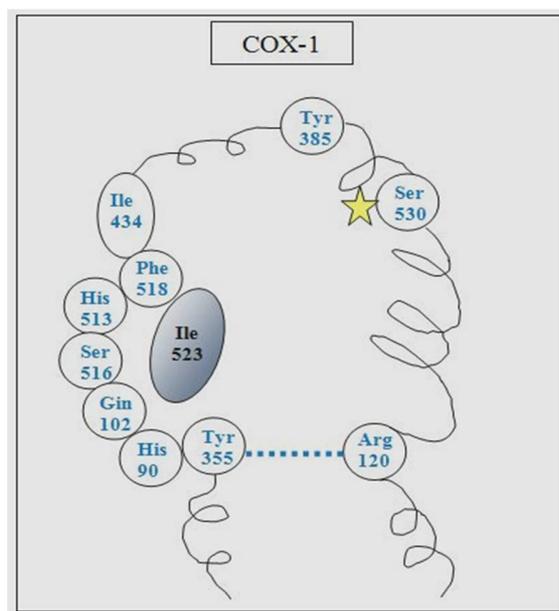


Figure 02: Structure de la Cyclooxygénase-1 (KNIGHTS et al., 2010)

La COX-1 est hautement exprimée dans :

- les plaquettes sanguines (FUNCK et *al.*, 1991).
- les cellules endothéliales vasculaires (GOPPELT, 1995).
- l'estomac (SMITH et *al.*, 1994).
- les reins (SEIBERT et *al.*, 1994).

Tableau 01 : Différences Cyclooxygénase-1 / Cyclooxygénase-2 (CHANDRASEKHARAN et SIMMONS, 2004 ; GOLDMAN, 2004)

	COX-1	COX-2
Similitude structurelle	Seulement 60% d'homologie dans la séquence d'acides aminés (COX-1 et COX-2 sont codées par des gènes différents). Le site actif de COX-2 est plus grand que celui de COX-1.	
Régulation	Présence physiologique, multiplication possible de la concentration par un facteur deux à quatre.	Formation induite lors d'inflammation (synthèse multipliée par 10 à 80 en cas de stimulation appropriée : inflammation, hormones).
Expression	Constitutive	Induite
Nom du gène	PTGS1	PTGS2
Localisation du gène	Chr.9 (9q33.2)	Chr.1 (1q31.1)
Poids moléculaire	71kDa	72kDa
Nombre d'acide aminé	576	604
Localisation tissulaire	Présente dans la plupart des tissus, surtout abondante dans les thrombocytes, les cellules endothéliales, l'estomac, les reins et les muscles lisses.	Présence : -Physiologique dans la prostate, l'utérus, les testicules et les poumons. -dans tous les tissus après induction.
Fonction de l'enzyme	Production de prostaglandines à fonctions protectrices, régulant le fonctionnement rénal, la fonction digestive et la coagulation sanguine.	Activée par une inflammation qu'elle aggrave par la production de prostaglandines pro inflammatoires, mais, rôle physiologique non négligeable pour le maintien de diverses fonctions vitales.

I.1.2. La cyclooxygénase- 2

I.1.2.1. Le gène

Le gène de la cyclooxygénase 2 est situé sur le chromosome 1 (1q31.1) (**Figure 03**), et se compose de 10 exons et de 9 introns (**FLETCHER et al., 1992 ; KOSAKA et al., 1994**). Ce gène est inductible, avec un promoteur contenant une zone TATA et des zones de fixation pour des régulateurs transcriptionnels comme le NF- κ B, le NF-IL-6 et la protéine de liaison pour la réponse à l'AMP cyclique (**HINZ et BRUN, 2002**).

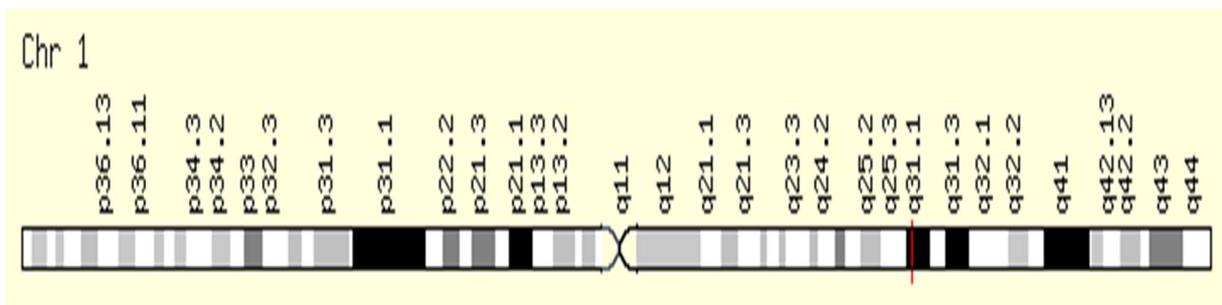


Figure 03 : Localisation du gène de la cyclooxygénase-2 (PTGS2) sur le brin long du chromosome 1 à partir de la première bande de la troisième région q31.1⁴

I.1.2.2. Structure

La COX-2 a une masse de 72 kDa environ et l'ARN messager fait 4,5 kb.

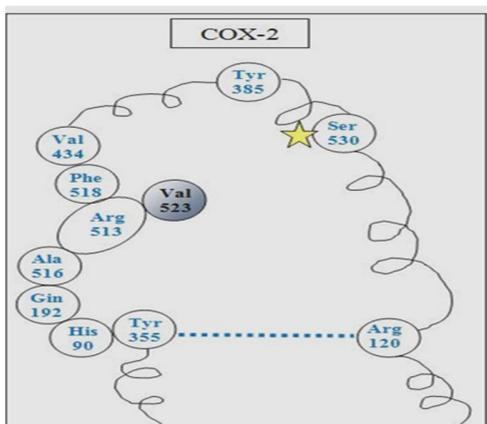


Figure 04 : Structure de Cyclooxygénase-2 (KNIGHTS et al., 2010)

⁴(<http://atlasgeneticsoncology.org/extdef.html#GENECARD>)

Après la traduction de ce dernier, l'enzyme se retrouve dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans les feuillettes internes et externes de l'enveloppe nucléaire des monocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Cependant, COX-2 préfère se localiser dans l'enveloppe nucléaire où son activité est plus importante (**SPENCER et al., 1998**).

I.1.2.3. Expression

L'expression de la COX-2 est régulée par de multiples facteurs impliqués dans l'inflammation avec des facteurs inducteurs [interleukine 1 bêta, TNF (*tumor necrosis factor*)], facteurs de croissance et inhibiteurs (corticoïdes, interleukine 4, interleukine 13, interleukine 10) (**HINZ et BRUN, 2002**). Par ailleurs, il semble qu'il existe un feedback positif sur la production de COX-2 par l'induction périphérique de l'enzyme (**NANTEL et al., 1999**).

Par son action élévatrice sur l'AMP cyclique, la PGE₂, facteur principal découlant de l'action de la COX-2, induisait une production accrue de COX-2 dans des cellules comme les monocytes, les macrophages (**HINZ et BRUN, 2002**).

I.1.2.4. Site actif de la COX-2 (figure 5)

Cette isoforme possède deux particularités :

- **une particularité géométrique** : La COX-2 est caractérisée par une taille plus grande de son site récepteur (+ 20%, par rapport à COX-1) car l'isoleucine 523 de COX-1 a été remplacée par une valine chez COX-2. Le raccourcissement de la chaîne latérale d'un seul atome de carbone suffit pour supprimer la zone d'étranglement : cela permet alors l'accès à une poche qui agrandit le volume du récepteur.
- **une particularité électronique** : La poche latérale du récepteur contient une arginine (Arg⁵¹³), caractéristique de la COX-2. Ce résidu, ionisé au pH physiologique, fait apparaître une charge positive supplémentaire : ce site cationique est fondamental dans le mode d'action des inhibiteurs sélectifs de COX-2.

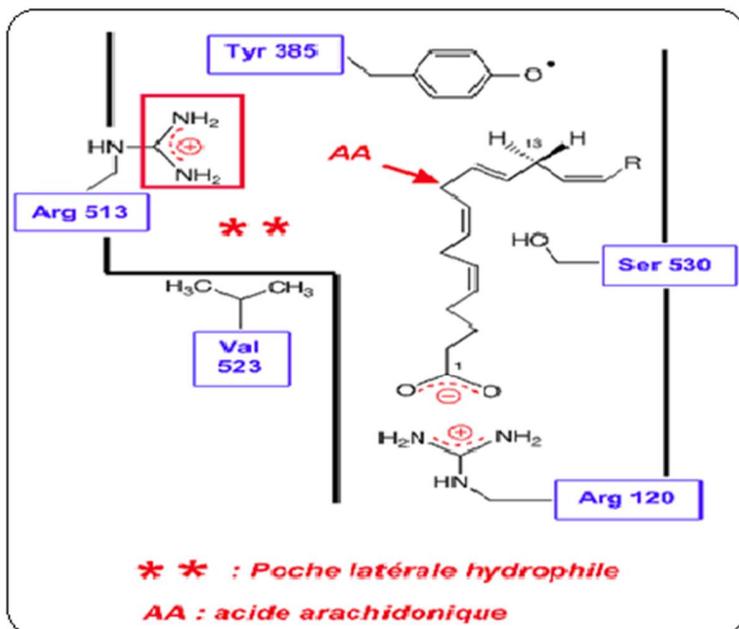


Figure 05: Site actif de la COX-2⁵

I.1.2.5. Rôle de la Cyclooxygénase-2

I.1.2.5.1. Cyclooxygénase-2 et carcinogénèse

La surexpression de la COX-2 joue un rôle principale dans la promotion tumorale en induisant la prolifération des cellules tumorales, en réduisant la mort cellulaire programmée et en diminuant l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses (chimiothérapie, radiothérapie, thérapie photodynamique) (PHILIP *et al.*, 2004 ; CHOI *et al.*, 2005 ; PALAYOOR *et al.*, 2005 ; CHAN *et al.*, 2007 ; JOHNSON *et al.*, 2008 ; ZRIEKI *et al.*, 2008).

a) *Initiation et promotion de la tumeur*

Les cyclooxygénases peuvent activer certaines substances « pro » cancérogènes d'origines environnementales ou alimentaires (amines aromatiques et hétérocycles, hydrocarbures polycycliques...) au niveau des sites extra-hépatiques et provoquer ainsi des altérations au niveau de l'ADN ou des protéines cellulaires impliquées dans la progression tumorale (WIESE *et al.*, 2001).

⁵(http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2009_Bordeaux_Nuhrich_AINS/co/Module_AINS_10.html)

La production de PGE2 (par COX-1 ou par COX-2) va par la suite être un facteur influençant l'installation du processus tumoral et ce principalement par deux voies :

- l'activation de la voie PI-3K/Akt qui va induire la survie cellulaire.
- l'activation des récepteurs des facteurs de croissance (**HAN et Wu, 2005**) qui va stimuler l'intervention des voies de signalisation (Ras/MAPK, JAK/STAT, PI3K) (**TELLIEZ et al., 2006**).

A noter également le rôle déterminant de COX-2 et des récepteurs EP2 et EP4 dans l'expression de l'aromatase qui catalyse la synthèse des œstrogènes à partir des androgènes après la ménopause (**SUBBARAMAIAH et al., 2006**).

b) Apoptose

Une étude faite sur des rats présentant une surexpression de COX-2 a démontré qu'il y avait en même temps chez ces sujets une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qu'un traitement par un AINS permettait de contrebalancer (**TSUJII et Dubois, 1995**).

La protéine pro-apoptotique Bax est quant à elle présente en bien plus faible quantité (**LIU et al., 2001**). De plus, COX-2 participe à la régulation en NO, qui a un effet dose dépendant dans la régulation de l'apoptose. Enfin, cet effet anti-apoptotique est surtout occasionner par le cross-talk existant entre COX-2 et p53 (**DE MORAES et al., 2007**). Selon le type de cancer et le contexte biologique, la protéine p53 peut contrôler l'expression de COX-2 via NF-κB qui, en retour, contrôle l'activité transcriptionnelle de p53.

c) Angiogenèse

La création de vaisseaux destinés à l'irrigation d'une tumeur est indispensable pour que cette tumeur puisse dépasser une certaine taille. Or, la production de prostanoïdes va pouvoir activer des médiateurs pro-angiogéniques, en particulier VEGF et FGF, ce qui va avoir un effet important sur la vitesse de formation des vaisseaux autour de la tumeur (**IÑIGUEZ et al., 2003**). Ceci a été prouvé par l'utilisation de Célécoxib dans un modèle animal, où l'on a pu observer une diminution de la taille des vaisseaux formés au cours de l'angiogenèse (**MASFERRER et al., 2000**). Ce sont donc essentiellement VEGF et les intégrines, responsables de l'adhésion des cellules endothéliales et de

la MEC (également sous le contrôle de COX-2) qui provoquent l'angiogenèse tumorale COX-2 dépendante (**DERMOND et RUEGG, 2001**).

d) Invasion et métastases

La surexpression de COX-2 induit une diminution de l'expression de la E-cadhérine (**OKAMOTO et al., 2008**), la synthèse des MMPs et facilite la mobilité des cellules tumorales dans la matrice (**TSUJII et al., 1997**).

Un mécanisme plus indirect impliquerait un effet modulateur des inhibiteurs de COX et des antagonistes EP4 sur l'activité des cellules NK responsables de la lyse des cellules transformées. Tout ceci va expliquer l'effet inducteur de COX-2 sur le détachement des cellules cancéreuses, leur passage et leur progression dans la circulation sanguine ou le réseau lymphatique (**FULTON et al., 2006**).

e) Cyclooxygénase-2, système immunitaire et inflammation

La PGE2 induit directement l'interleukine-10, qui a un effet immunosuppresseur, et inhibe la production de lymphokines, la prolifération des cellules B (LB) et cellules T (LT) et l'activité cytotoxique des cellules NK (**HUANG et al., 1998**), ce qui crée un espace favorable à la prolifération des cellules non différenciées.

I.1.3. Les inhibiteurs des cyclooxygénases

Les anti-inflammatoires constituent une importante classe de médicaments qui présentent différentes activités pharmacologiques de type anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique et antiplaquettaire. Il existe différentes familles d'anti-inflammatoires. Selon leur formule chimique de base, ils seront classés en deux catégories (**MEKELLECHE, 2001**) :

- **Les anti-inflammatoires stéroïdiens** : Les anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) constituent une vaste famille de médicaments dérivés du cortisol, principal glucocorticoïde surrénalien. Les glucocorticoïdes sont des substances dérivées du cholestérol, dont la production est stimulée par l'ACTH libérée par le lobe antérieur de l'hypophyse.

- **Les anti-inflammatoires non stéroïdiens** : Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sont une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde en raison de leurs propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique et antalgique. Actuellement, il y a plus de 50 différents AINS qui sont sur le marché mondial.

I.1.3.1. Mode d'action général

La COX-2 présente une extension supplémentaire par rapport à COX-1 du côté C-term, elle est responsable de la spécificité des inhibiteurs sélectifs de COX-2 (par exemple, le célécoxib ou le rofécoxib). Dans cette « poche », une isoleucine a été substituée par une valine en position 523.

Les AINS classiques (par exemple, l'ibuprofène ou le kétoprofène) ont la capacité de se fixer sur les deux isoformes de COX et l'inhibition de COX-1 s'accompagne souvent d'effets délétères : ulcères, problèmes cardiovasculaires (KURUMBAIL et al., 1996) d'où l'intérêt de développer des inhibiteurs hautement sélectifs de la COX-2, tels le célécoxib (Célébrex®) et le rofécoxib (Vioxx®) avec pour objectif de conserver une activité anti-inflammatoire et analgésique efficace tout en réduisant les risques de complications gastro-intestinales (Figure 06).

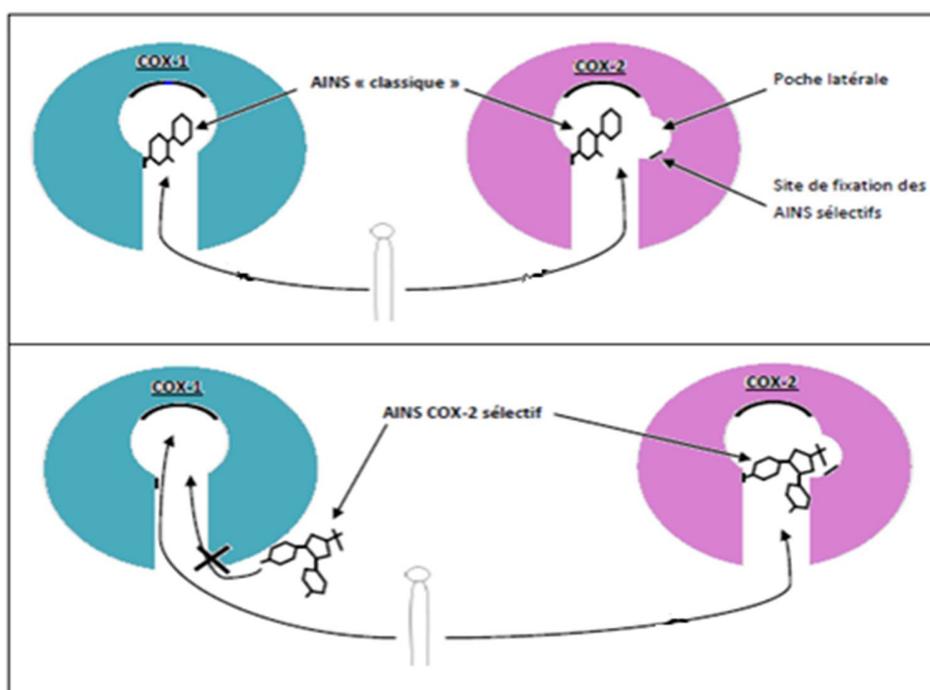


Figure 06 : Mode d'action des AINS (GUERLIN M., 2013)

I.1.3.2. Les inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase-2

Les inhibiteurs de COX-2 peuvent être séparés en deux catégories (SOBOLEWSKI et al., 2010) :

- ceux qui inhibent spécifiquement l'activité de COX-2 (**en bleu**).
- le nimésulide et le méloxicam qui inhibent préférentiellement COX-2 (**en gris**), alors que pour COX-1, ils n'interviennent que pour les plus fortes posologies recommandées.

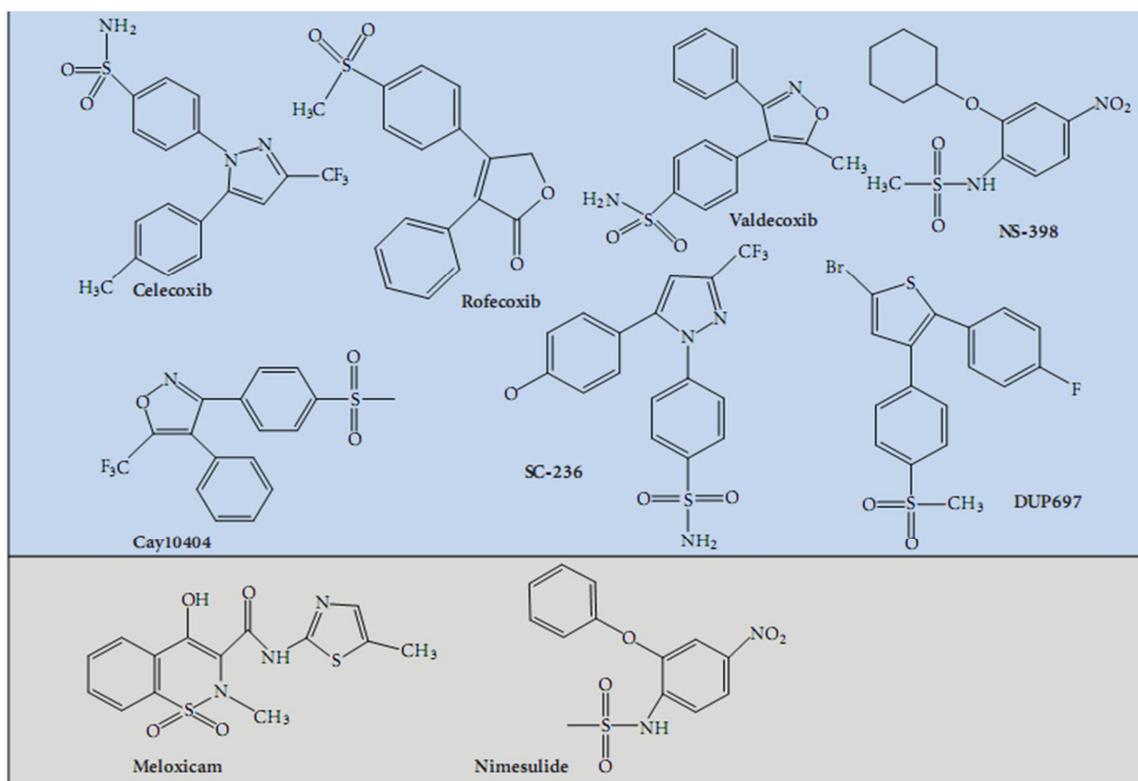


Figure 07 : Quelques inhibiteurs spécifiques de la Cyclooxygénase-2

I.1.3.3. Effets secondaires des AINS

Les AINS inhibent la cyclooxygénase 1 et/ou 2, d'où leur action anti-inflammatoire, antalgique, antipyrétique et antiagrégant plaquettaire pour certains. A ces propriétés pharmacologiques seront associés des effets indésirables liés à l'inhibition de ces COX :

- a) *Effets secondaires digestifs* : Les effets digestifs sont les plus fréquents et la sévérité des lésions est variable. Ils peuvent aller d'une douleur épigastrique modérée à des gastrites érosives, des ulcérations peptiques et des hémorragies qui peuvent mettre en danger la vie des patients. Les ulcérations gastro-intestinales peuvent s'accompagner d'une anémie secondaire et d'hypoprotéinémie causées par les pertes de protéines plasmatiques et de sang (**KORE, 1990 ; KECK, 1991**).
- b) *Effets secondaires rénaux* : Bien que moins fréquentes que les complications gastro-intestinales, les altérations rénales liées à la prise d'AINS n'en sont pas moins importantes et peuvent être soit « lésionnelles » soit fonctionnelles. (**BREYER et BADR, 1996**).
- c) *Effets cardiovasculaires* : Les effets secondaires cardiovasculaires des AINS classiques sont connus depuis longtemps : hypertension artérielle, rétention hydrosodée, œdème des membres inférieurs. De nombreuses études ont permis de mettre en évidence un sur-risque de mortalité cardiovasculaire notamment avec le rofécoxib (médicament retiré du marché). Avec cette molécule il a été démontré qu'il y avait environ deux fois plus d'événements thrombotiques cardiovasculaires que sous placebo après 18 mois de traitement. Les données récentes et multiples ne sont pas toujours concordantes mais il est logique de considérer que tous les AINS, pris à forte dose et à long terme, sont susceptibles d'augmenter le risque thrombotique cardio-vasculaire et la mortalité cardiovasculaire (**GETTIGAN et HENRY, 2004**).

Chapitre II

Les flavonoïdes

II.1. Introduction

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les Flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les Isoflavones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides.

On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (**MIDDLETON et CHITHAN, 1993**) et aussi dans le miel (**GRANGE et DAVEY, 1990**).

II.2. Structure chimique et classification

II.2.1. Définition

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des fruits et des légumes, comptent parmi les composés phytochimiques d'importance de notre alimentation (**SURH, 2003**). Ces molécules sont constituées

de deux noyaux benzènes (A et B) connectés par un noyau pyrane contenant un oxygène (C).

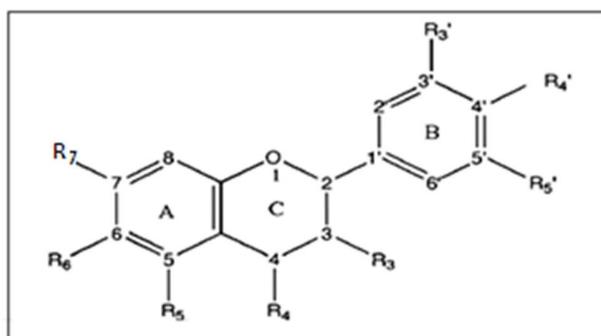


Figure 08: Structure de base des Flavonoïdes

Les flavonoïdes possédant un groupe hydroxyle en position C-3 du noyau C sont classifiés en tant que 3-hydroxyflavonoïdes (famille comprenant les sous-classes des flavonols, anthocyanes, leucoanthocyanes et catéchines), tandis que ceux ne la possédant pas sont classifiés en tant que 3-désoxyflavonoïdes (famille comprenant les sous-classes des flavanones et flavones) (**Figure 08**).

La classification à l'intérieur de ces deux familles est basée sur la présence ou non de groupes hydroxyle et méthyle additionnels ainsi que de la position où ceux-ci ont été insérés dans le squelette de base. À l'exception de ces deux familles, le noyau B des iso flavonoïdes est lié au noyau C en C-3 plutôt qu'en C-2, faisant des iso flavonoïdes une catégorie à part. Il est intéressant de souligner que les anthocyanes et les catéchines ne possèdent pas de groupement carbonyle en position C-4 (ERLUND, 2004).

II.2.2. Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes, feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. De nombreux travaux montrent que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones. (BRONNER et al., 1995 ; CROZIER et al., 1997 ; JUSTEN et al., 1998).

Le **Tableau 02** regroupe la distribution nutritionnelle de certains flavonoïdes.

Flavonoïdes	Aliments
Flavonols	Oignon, Poireau, Brocolis, Pommes, Chou frisé, Thé.
Flavones	Persil, Céleri.
Flavanones	Fruits du genre citrus.
Isoflavones	Graines de soja et produits dérivés
Flavan3-ols	Thé noire, Thé vert, Cacao, Chocolat.
Anthocyanidines	Raisins, Certaines variétés de céréales.

Tableau 02 : Distribution alimentaire des principales classes de flavonoïdes (GALATI et al., 1994 ; READ, 1995).

II.2.3. Les différentes classes de flavonoïdes

Plusieurs classes de flavonoïdes ont été proposées selon le chemin biosynthétique (**Figure 09**) (**BRUNETON, 2009**).

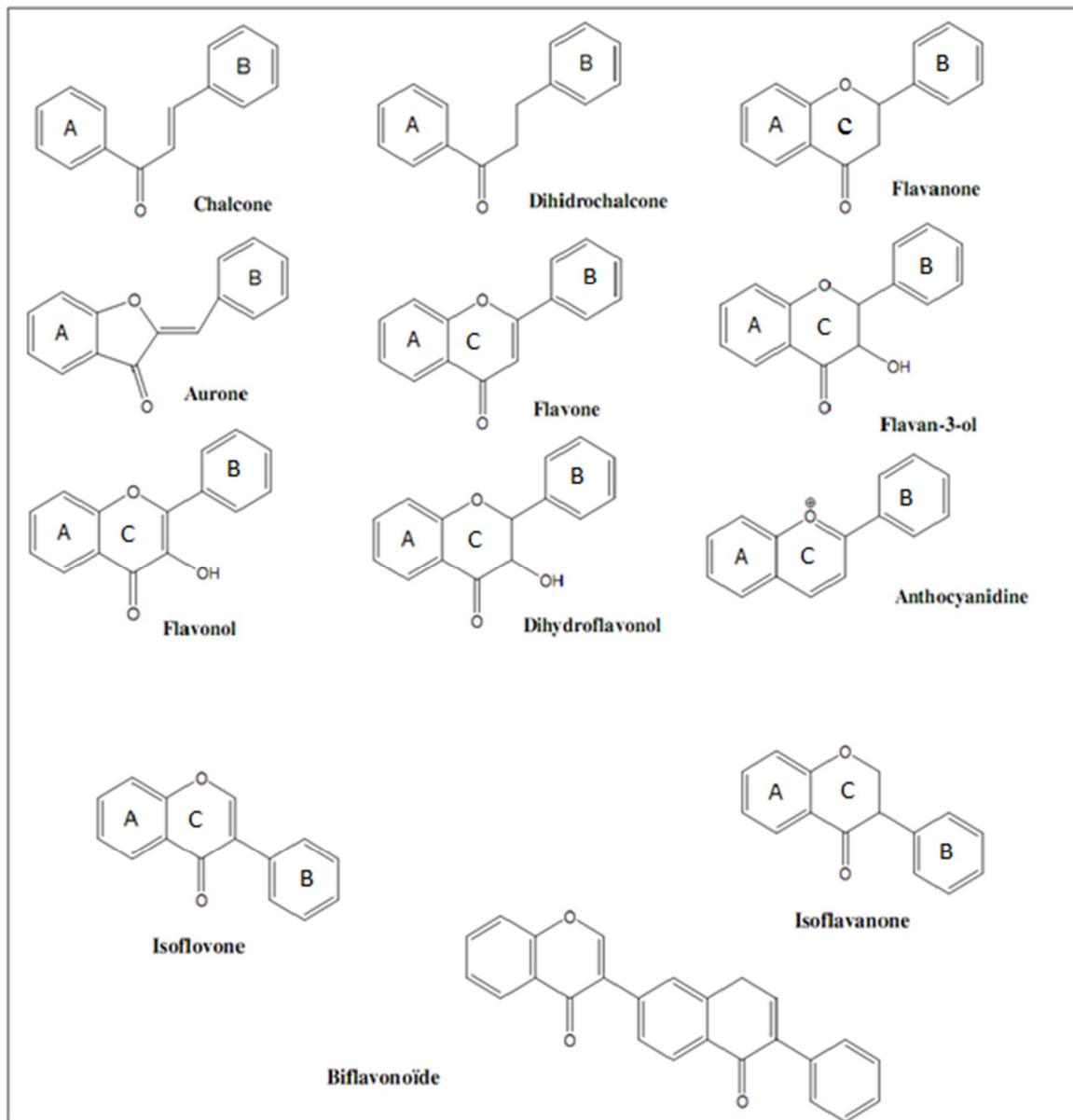


Figure 09: Les différentes classes de flavonoïdes

II.3. Propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances naturelles retrouvées dans les fruits, les végétaux, les racines, les fleurs, le thé. Plus de 4000 variétés de flavonoïdes ont été identifiées, dont plusieurs sont responsables de la coloration retrouvée sur les fleurs, les fruits et les feuilles. (NIJVELDT *et al.*, 2001). Les flavonoïdes ont des propriétés :

- Dans la prévention du cancer (MANACH *et al.*, 1996).
- Antibactériennes, (RICE-EVANS *et al.*, 1996 ; VAN ACKER *et al.*, 1996 ; ALCARAZ *et al.*, 2000 ; BURDA et OLESZEK, 2001 ; SYUCHI *et al.*, 2006).
- Antiviraux (FORMICA et REGELSON, 1995 ; MANTAS *et al.*, 2000).
- Analgésiques, antiallergiques, (GALVEZ *et al.*, 1993 ; BASILE *et al.*, 1999 ; MARTINI *et al.*, 2004 ; GOODARZI *et al.*, 2006 ; OUALI *et al.*, 2007).
- Anti-inflammatoires (MEDIC *et al.*, 2009).
- Anti-tumoraux (FORMICA et REGELSON, 1995 ; DI CARLO *et al.*, 1999).
- Anti-ulcéreuse (LEE *et al.*, 1993 ; HANG *et al.*, 2002).
- Hépatoprotectrice (DI CARLO *et al.*, 1993 ; LORENZ *et al.*, 1994).
- Antidiabétique (VESSAL *et al.*, 2003).
- Anti cardiovasculaire (BAST *et al.*, 2007 ; NETO, 2007 ; ZAFRA *et al.*, 2007).
- Antinéoplasique (KONTRUCK *et al.*, 1986 ; IZZO *et al.*, 1994 ; MURAKAMI *et al.*, 1992).

II.3.1. Propriétés anti-inflammatoires et effets sur le système immunitaire

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (GALATI *et al.*, 1994 ; SILVA *et al.*, 1994 ; READ, 1995) et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (MIDDLETON, 1996).

Ils sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T (MOOKERJEE *et al.*, 1986 ; NAMGOONG *et al.*, 1994). Cet effet des flavonoïdes sur les lymphocytes B ou T peut être variable : en effet, les flavones (apigénine, lutéoline et 7,3',4' hydroxyflavone) et les flavonols (kaempférol, quercétine et myricétine) inhibent la prolifération des lymphocytes T alors que seule la myricétine est active sur les lymphocytes B. L'explication est encore inconnue.

L'effet antiprolifératif des flavonoïdes pourraient s'expliquer par leur capacité à inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine Kinase C ou protéine tyrosine kinase) (**MOOKERJEE et al., 1986 ; NAMGOONG et al., 1994**). Par ailleurs, les flavonoïdes sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (**MIDDLETON et DRZEWIECKI, 1984**).

La phagocytose qui accompagne une infection virale ou bactérienne est suivie d'une production d'espèces oxygénées réactives par les neutrophiles ce qui va promouvoir l'inflammation.

D'une manière générale, les espèces radicalaires, quelles que soient leurs origines, peuvent induire des dommages tissulaires, favoriser le processus de vieillissement, voire être à l'origine de certaines pathologies telles que le cancer et l'athérosclérose (**WARD, 1994**). Il est intéressant de noter que de nombreux flavonoïdes sont capables de contrer cette production d'espèces oxygénées par les neutrophiles (**LIMASSET et al., 1993**).

Les flavonoïdes inhibent également l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'hispiduline, une méthoxyflavone, diminue par exemple l'agrégation plaquettaire en augmentant les taux intracellulaires en AMPc à la suite d'une inhibition des phosphodiesterases. En effet, l'accumulation d'AMPc plaquettaire semble interférer avec la mobilisation de Ca^{2+} impliqué dans l'agrégation de ces cellules (**ROENGSUMRAN et al., 2000**).

II.3.2. Propriétés anti-cancérigènes

La quercétine, par exemple, est capable de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthylbenz (a)anthracène) ou la NMU (Nnitrosométhylurée) (**VERMA et al., 1988**). Les études réalisées chez la souris abondent dans le même sens et mettent en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs des tumeurs (**KATO et al., 1983**). L'action anti tumorale de la quercétine pourrait aussi s'expliquer par une interaction de celle-ci avec le complexe calcium-calmoduline (**NISHINO et al., 1984**) qui jouerait aussi un rôle dans le mécanisme d'action de nombreux promoteurs de tumeur. C'est ainsi qu'un antagoniste de la calmoduline inhiberait l'induction de l'ODBC (Ornitine Décarboxylase) par le TPA (12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (**VERMA et BOUTWELL, 1981**).

Le complexe calcium-calmoduline pourrait faciliter l'action du TPA en augmentant la synthèse d'ADN dans les cellules de foie (**BOYNTON et al., 1982**).

Les flavonoïdes peuvent également interférer avec le métabolisme des xénobiotiques (WATTENBERG et LEE, 1983), notamment en stimulant les systèmes de détoxification (BU-ABBAS et *al.*, 1995). En donnant à des rats ou à des souris une alimentation contenant de la flavone ou de la quercétine, on peut observer des effets chimio préventifs à divers niveaux, et en particulier au niveau du foie par une stimulation de la glutathion- S-transférase (NIJHOFF et *al.*, 1995). Enfin, les flavonoïdes peuvent inhiber les enzymes intervenant dans l'activation des pro carcinogènes en intermédiaires mutagènes et carcinogènes (OBERMEIER et *al.*, 1995). Les résultats dans ce domaine sont difficiles à interpréter car les flavonoïdes semblent avoir des effets divers sur l'activité des enzymes de détoxification (LASKER et *al.*, 1984).

II.4. Relation entre les flavonoïdes et la cyclooxygénase-2

Les flavonoïdes représentent une des principales catégories de molécules d'origine végétale montrant une activité inhibitrice vis-à-vis de la COX et parmi ce grand nombre de composés (plus de 4000) se trouvent des inhibiteurs spécifiques de COX-2 (KIM et *al.*, 2004 ; JACHAK, 2006 ; GARCIA-LAFUENTE, 2009 ; PRASAD, 2010 ; JACOB, 2011).

Un travail de recherche effectué par Raso et ses collaborateurs démontre que l'apigénine et la quercétine sont en mesure de moduler l'expression de COX-2 (RASO, 2001). Leurs résultats sont confirmés par O'leary et son équipe (O'LEARY et *al.*, 2004).

Pour étudier les effets des flavonoïdes sur la COX-2 exprimée dans des cellules de cancer du côlon humain, Michihiro et *al.* testent 9 molécules et seulement 3 d'entre elles possèdent une activité significative. Leurs conclusions indiquent que le nombre de groupes hydroxyle sur le cycle B et un groupe oxo à la position 4 du cycle C sont importants pour la suppression de l'activité de COX-2 (MICHIIHIRO et *al.*, 2000).

Une étude des effets de la santaline, la centaureidine, l'ermanine et le flavonol isolés de *Tanacetum microphyllum* comme agents anti-inflammatoires potentiels est initiée par Guerra et son équipe. Les résultats obtenus ont montré que tous les flavonoïdes mentionnés réduisaient l'expression de iNOS et de COX-2 (GUERRA et *al.*, 2006).

Chapitre III

Interactions protéine ligands : COX-2-Flavonoïdes : Résultats

III.1.Introduction

Les pathologies dans lesquelles la COX-2 est surexprimée sont nombreuses. La recherche d'inhibiteurs spécifiques de cette enzyme constitue des enjeux pharmacologiques majeurs.

La mise au point de tels composés chimiques ayant des activités inhibitrices demande des études expérimentales quantitatives de leur action. La mise en place d'un protocole reproductible pour estimer cette efficacité *in vitro* et *in vivo* est parfois très difficile à réaliser sur le plan biologique. Faire les expérimentations au laboratoire demanderait trop d'investissements au niveau économique, temps, travail car le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient, dans lequel les essais cliniques succèdent au développement pré-clinique.

Pour remédier à ces inconvénients, les chercheurs se tournent de plus en plus vers des approches informatisées. L'un de ces outils informatiques est la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire. Celui-ci consiste à prédire et à reproduire les interactions protéine-ligand (**WODAK et JANIN, 1978**) ce qui est plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales.

III.2. Modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est une approche scientifique multidisciplinaire : elle utilise des lois de la chimie, de la physique et de la biologie dans des programmes informatiques spécifiques afin de trouver la structure et les propriétés de composés chimiques et biochimiques (protéines, acides nucléiques, complexes moléculaires, solides, cristaux etc.). (**LEACH, 2001**).

La modélisation moléculaire permet d'étudier des systèmes complexes et de représenter leur comportement en simulant, à l'aide de fonctions semi-empiriques appropriées, les grandeurs réelles. Les différentes interactions des atomes entre eux et avec leur environnement sont décrits par un «champ de force». Il existe plusieurs méthodes pour modéliser le comportement d'une molécule et de son environnement : la minimisation d'énergie, la méthode de Monte Carlo (MC), la dynamique moléculaire (DM) (**BASTARD, 2005**).

La modélisation moléculaire s'est développée grâce à l'évolution de l'informatique qui a permis d'intégrer les concepts de chimie théorique dans les algorithmes et de développer des machines capables d'exécuter les lourds calculs demandés et de stocker les données générées (**LIOTTA, 1988 ; DEREMBLE et LAVERY, 2005 ; TOULHOAT, 2007**).

Utilisées dans le domaine du Docking, ces applications permettent l'étude au niveau atomique d'interactions entre deux entités moléculaires. Elles visent la prédiction de l'agencement le plus probable de ces dernières en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable (**WARREN et al., 2006**).

III.2.1. Docking moléculaire

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques, les identifier est une étape importante dans la conception de composés pouvant être utilisés en thérapie. Cette information s'obtient directement par le docking (ancrage ou amarrage) qui est le nom donné aux simulations moléculaires dont lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire et d'une petite molécule (**SEURET, 2003**).

Le docking *in silico* rend possible l'identification des interactions qui existent dans l'entité constituée à partir d'une protéine et d'un ligand. Il vise à prédire le positionnement le plus probable en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations qui favoriseraient la formation du complexe le plus stable (**WARREN et al., 2006**) (**Figure 10**).

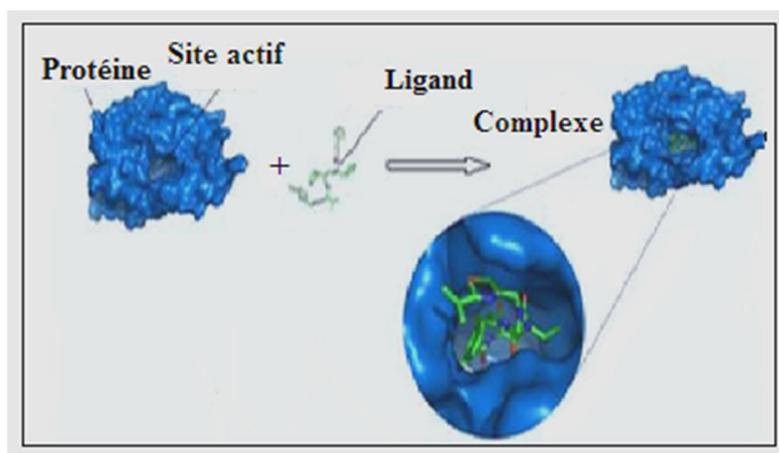


Figure 10: Représentation schématique du docking

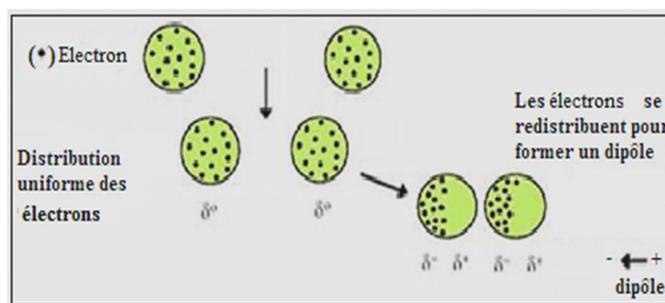
La plupart des programmes existants, essaient de déterminer la géométrie du complexe macromolécule-ligand. L'algorithme de base tient essentiellement en trois points :

- définir une géométrie du complexe
- évaluer la qualité de cette géométrie
- recommencer en classant les géométries

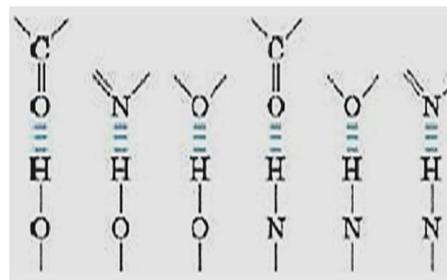
Le docking moléculaire permet l'étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes. Cette association est assurée grâce à plusieurs types de liaisons faibles :

a) **Les interactions de Van Der Walls** : Elles résultent de l'interaction des nuages électroniques

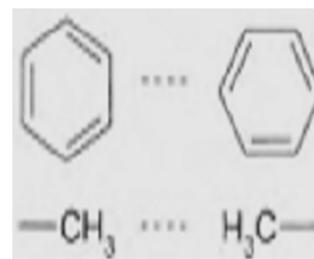
de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive pour des distances de 3-4 Å. Les interactions de van der Walls sont généralement faibles. Leur importance provient du nombre cumulé de liaisons créées.



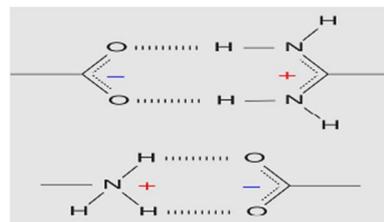
b) **les liaisons hydrogènes** : Cette liaison intervient lorsqu'un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (le donneur) est attiré par un autre atome électronégatif (l'accepteur). Elle agit à très courte distance (0,8 à 2,8 Å). Les liaisons hydrogènes sont peu nombreuses et s'adaptent très bien à la flexibilité.



c) **Les interactions hydrophobes** : Les molécules dépourvues de groupes chargés ou d'atomes capables de former des liaisons hydrogène ne peuvent donc pas s'hydrater, pour cette raison, on les nomme substances hydrophobes. L'effet hydrophobe est la tendance qu'ont ces groupes à se rassembler par coalescence.



d) **Les interactions électrostatiques** : elles agissent à plus grande distance entre dipôles chargés



III.2.1. 1. Les étapes du docking moléculaire

Toutes les approches employant le docking moléculaire utilisent deux étapes complémentaires (**Figure 11**).

La première (searching) consiste à rechercher les conformations du ligand apte à établir des interactions idéales avec le récepteur par un algorithme de recherche. La deuxième (scoring) est l'évaluation de ces conformations par des fonctions mathématiques appelées fonctions de score, elle est basée sur un calcul rapide de l'énergie libre du système formé par la protéine et le ligand.

La partie de recherche doit parcourir au mieux l'espace conformationnel pour trouver l'énergie minimale globale.

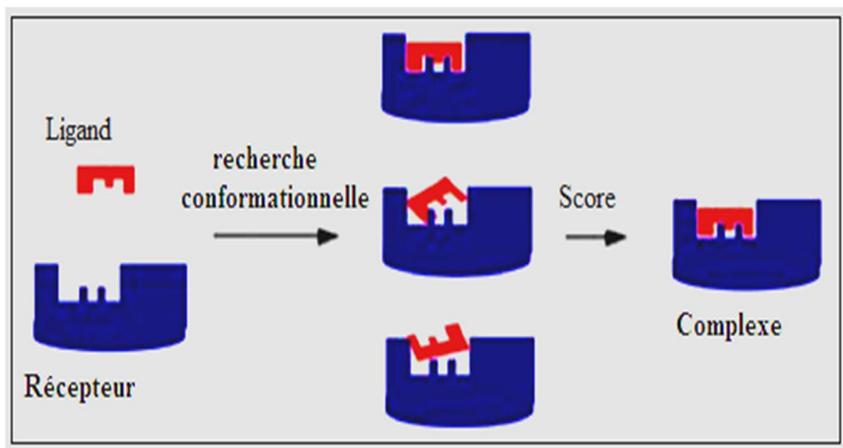


Figure 11 : Représentation des étapes du docking

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

Pour faciliter les calculs, la majorité des logiciels de docking ne prennent en compte que la flexibilité du ligand, la protéine est considérée entité rigide.

III.2.1.1.1. La recherche conformationnelle

Il existe plusieurs méthodes de recherche de l'espace conformationnel, celles basées sur la complémentarité géométrique et celles fondées sur la complémentarité atomique. Elles utilisent différents algorithmes (recherche stochastique, exhaustive, Monté Carlo, construction incrémentale....etc) afin de trouver le meilleur positionnement du ligand au sein de la cavité enzymatique (**KONTOYIANNI et al., 2004 ; HUANG et ZOU, 2010**).

ArgusLab⁶ le logiciel que nous avons utilisé pour effectuer notre travail, se base sur une description géométrique du système protéine-ligand. Le ligand flexible va subir plusieurs translations suivies de rotations pour trouver sa position optimale dans le site actif de la protéine qui est considérée rigide. Dans cette approche, l'évaluation de l'énergie du système protéine-ligand est calculée après chaque combinaison de translation-rotation du ligand.

III.2.1.1.2. La fonction de score

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à leur association sous forme de complexe (**KOLLMAN et al., 2000**).

Ces informations peuvent s'acquérir directement par le biais du docking du ligand sur la structure tridimensionnelle de l'enzyme obtenue par RMN ou diffraction des rayons X.

L'utilisation des fonctions de score permet de déterminer la conformation qui représentera au mieux le ligand concerné et classer les premières poses de chaque ligand afin d'établir un classement final des molécules les plus prometteuses. Représentant le résultat de la prédiction de l'interaction protéine-ligand, elle est estimée à partir de diverses méthodes (empirique, champs de force, knowledge-base, consensus) (**STAHL et al., 2001**).

Avec le code ArgusLab, (**AKIFUMI et al., 2009**) les conformations sont classées selon leurs énergies croissantes par "Ascore" formulée à partir de l'équation suivante :

⁶ <http://www.ArgusLab.com>

$$\Delta G_{\text{Liaison}} = \Delta G_{\text{vdw}} + \Delta G_{\text{hydrophobique}} + \Delta G_{\text{Liaison-H}} + \Delta G_{\text{déformation}} + \Delta G_0 \quad \text{où}$$

ΔG_{vdw} → interactions de Van Der Waals entre le ligand et la protéine

$\Delta G_{\text{hydrophobique}}$ → interactions hydrophobes

$\Delta G_{\text{Liaison-H}}$ → liaison hydrogène

$\Delta G_{\text{déformation}}$ → pénalités de déformation

ΔG_0 → constante qui exprime la perte d'entropie due à la déformation du complexe

III.3. Interactions flavonoïdes/COX-2

III.3.1. Molécules impliquées dans le docking

III.3.1.1. Structure de COX-2 (1cx2)

Un complexe expérimental (un ligand cristallisé avec le récepteur) reste la meilleure méthode pour arriver au site actif de la macromolécule. Afin de réaliser un docking où le RMSD (le root mean square deviation) est inférieur ou égal à deux, les coordonnées cristallographiques de deux COX-2 (**1cx2** et **3ln1**), tirés de la banque de données (PDB)⁷, sont testées et celles qui correspondent le mieux au critère sont celles de 1cx2.

Afin de confirmer le choix de 1cx2 (COX-2/SC-558) dont la structure cristalline a été déterminée en 1996 (**KURUMBAIL et al., 1996**), un redocking dans les mêmes conditions opératoires est refait pour le ligand natif de cette structure.

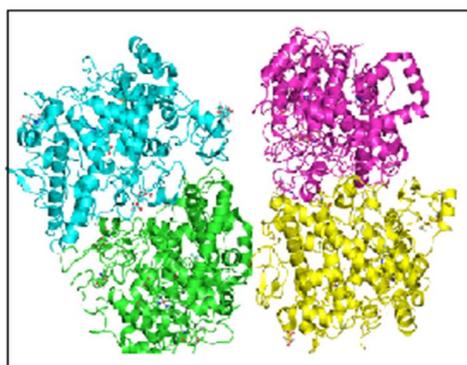


Figure 12 : Entrée 1cx2 de la COX-2 vue de face⁷

⁷ www.PDB.org

III.3.1.2. Les acides aminés

L'identification des résidus d'acides aminés de l'entrée (1cx2) pouvant se lier avec les ligands est une étape importante dans le docking.

Le **Tableau 03** renferme ceux impliqués dans le site actif de l'entrée 1cx2.

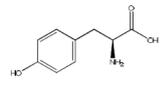
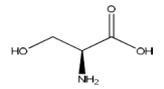
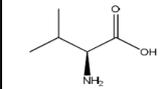
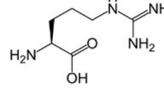
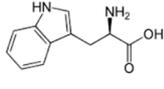
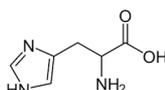
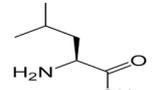
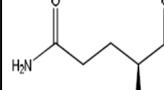
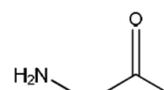
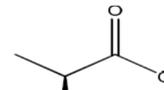
Nom	Tyrosine	Sérine	Valine	Arginine	Tryptophane
Structure					
Nom	Histidine	Leucine	Glutamine	Glycine	Alanine
Structure					

Tableau 03 : Liste des acides aminés impliqués dans le site actifs de la COX-2

III.3.1.3. Les ligands

Cinq flavonoïdes de type flavonol serviront de ligands dans cette étude *in silico*. Les molécules choisies : l'Isorhamnétine, la Tamarixétine, la Quercétine, le Kaempférol et la Galangine sont tirées du répertoire des molécules isolées dans le laboratoire LCMC.

La molécule référence (SC-558) est le ligand de la forme cristallisée de 1cx2.

Pour s'assurer des résultats fiables et reproductibles, une optimisation de la géométrie (minimisation de l'état énergétique) des 5 flavonols et la molécule référence à partir de leur configuration 3D est une étape essentielle avant le processus du docking. Pour effectuer cette opération, le programme Gaussien 09 est utilisé. Il se base sur la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) avec la fonctionnelle d'échange-corrélation (B3LYP) et la base des orbitales atomiques 6-331G.

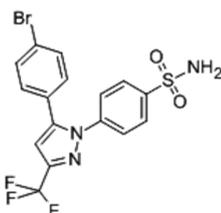
Les propriétés biologiques des ligands citées dans ce chapitre sont tirées de la Duke Data Bank⁸

⁸ www.ars-grin.gov/duke

A) SC-558

La molécule référence est un composé organique de synthèse. C'est un anti-inflammatoire non stéroïdien appartenant à la famille des coxib.

Son faible IC_{50} ($0,0093\mu M$) fait de lui l'un des meilleurs inhibiteurs de COX-2.



4-[5-(4-bromophenyl)-3-(trifluoromethyl)pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide

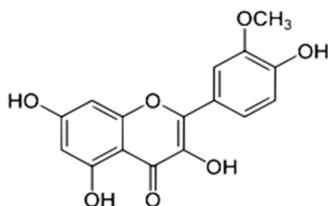
B) Isorhamnétine (ISO)

L'isorhamnétine est un flavonoïde et spécifiquement un flavonol O-méthylé en 3'. Il peut être extrait de différentes plantes dont *Ammi visnaga*, une espèce appartenant à la famille des Apiacées (**BENCHERAIET et al., 2011**).

Cette molécule possède plusieurs propriétés

parmi lesquelles :

- Anti-inflammatoire
- Antioxydante
- Préviend le cancer

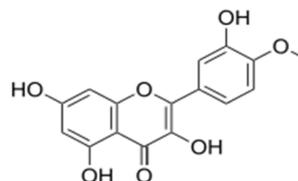


C) Tamarixétine (TAM)

La tamarixétine est un flavonol O-méthylé en 4'. Cette molécule a été isolée d'une autre Apiacée, *Bupleurum montanum* (**BENAHMED, 2008**).

Ce composé est connu pour son pouvoir antioxydant

($IC_{50}=1.5\mu g/ml$)



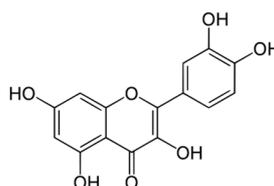
D) Quercétine (QUE)

La quercétine est un flavonol présent chez les plantes comme métabolite secondaire. On la trouve notamment dans la câpre, le piment, le sureau, le chocolat, l'oignon.

La quercétine est le plus actif des flavonoïdes et de nombreuses plantes médicinales doivent leur efficacité à sa présence à un taux élevé.

Les études *in vitro* et *in vivo* ont montré que c'était un excellent :

- Antioxydant
- Antiarthritique
- Anticancéreux ($IC_{50}=120\mu\text{g/ml}$)
- Inhibiteur de la COX-2 ($IC_{50}\leq 40$)
- Inhibiteur de la 5-lipooxygénase ($IC_{50}=0,1-5\mu\text{M}$)

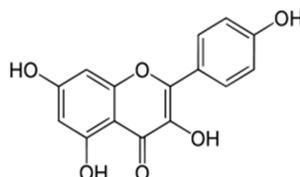


E) Kaempférol (KAE)

Le kaempférol est un flavonol que l'on trouve dans les fraises, les brocolis et les épinards. C'est un pigment jaune, beaucoup plus soluble dans certains solvants organiques (alcools, cétone,...) que dans l'eau.

Cette molécule possède plusieurs propriétés

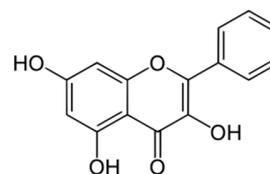
- Anti-inflammatoire
- Antioxydant ($IC_{50}=1,2\mu\text{g/ml}$)
- Anticancéreux
- Inhibiteur de la COX-2 ($IC_{50}=120\mu\text{M}$)
- Inhibiteur de la 5-lipooxygénase ($IC_{50}=120\mu\text{M}$)



F) Galangine (GAL)

La Galangine est un composé organique de la famille des flavonols présent dans la racine de galanga (*Alpinia galanga*) et dans la propolis et possède plusieurs propriétés telles que :

- Anti-inflammatoire ($IC_{50}=5,5\mu\text{M}$)
- Inhibition de la cyclooxygénase2 ($IC_{50}=7\mu\text{M}$)



- Antimutagène
- Antioxydant
- Inhibiteur de la 5-lipooxygénase ($IC_{50}=20\mu M$)

III.3.2. Interactions flavonols/1cx2

III.3.2.1. Calcul de ΔG

Les énergies libres de formation des différents complexes entre les flavonols et l'enzyme 1cx2 sont obtenues grâce au logiciel libre ArgusLab 4.01. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 04**.

Complexe 1cx2-ligand	$\Delta G_{(bind)}$ (kcal/mol)
SC-558	-10,66
ISO	-7,94
TAM	-8,83
QUE	-9,85
KAE	-10,00
GAL	-10,05

Tableau 04 : Valeurs de $\Delta G_{binding}$ du complexe COX-2/flavonol

III.3.2.2. Étude des complexes Flavonols/1cx2

A- Complexe SC-558/1cx2

Lors du docking, SC-558 établit avec la COX-2 trois liaisons hydrogènes par le biais de deux acides aminés appartenant au site actif : une avec ARG⁵¹³ et deux autres avec HIS⁹⁰. SC-558 occupe la poche adjacente contenant l' HIS⁹⁰ et l' ARG⁵¹³ (**Tableau 05**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
-OH	HIS ⁹⁰	2,57
-OH	HIS ⁹⁰	2,98
-OH	ARG ⁵¹³	2,78

Tableau 05 : Liaisons hydrogènes dans le complexe SC-558/1cx2

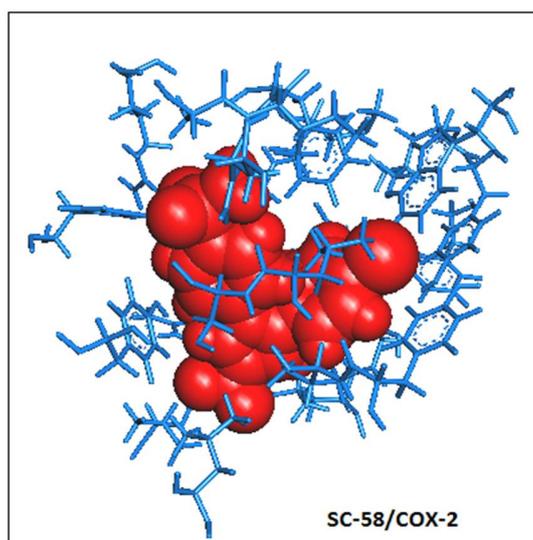


Figure 13 : Position de SC-558 dans le site actif de 1cx2

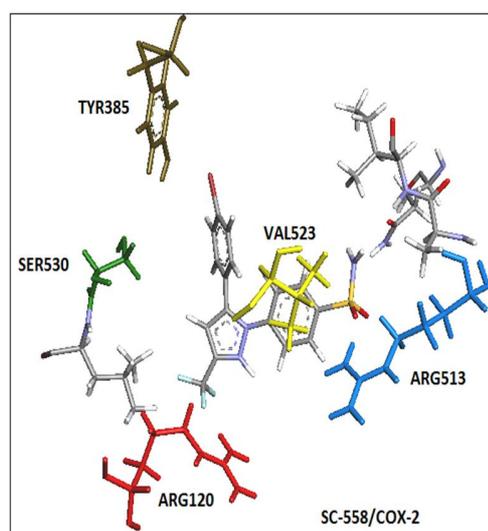


Figure 14 : SC-558 avec quelques résidus de la 1cx2

B- Complexe Iso/1cx2

L'isorhamnétine a établi avec l'enzyme deux liaisons hydrogènes, dont une avec LEU³⁵² et une autre avec ALA⁵²⁷ (**Tableau 06**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
7-OH	LEU ³⁵²	2,89
3-OH	ALA ⁵²⁷	2,57

Tableau 06 : Liaisons hydrogènes dans le complexe ISO/1cx2

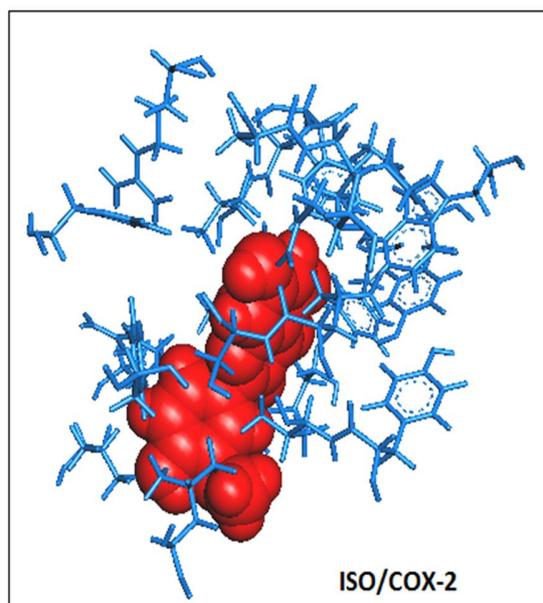


Figure 13 : Position de l'Isorhamnétine dans le site actif de 1cx2

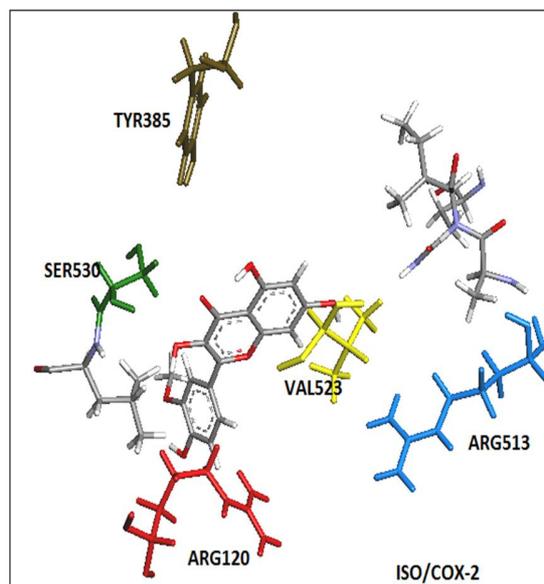


Figure 16 : Isorhamnétine avec quelques résidus de la 1CX2

C- Complexe TAM/1cx2

La tamarixétine établit avec COX-2 des liaisons hydrogènes avec quatre acides aminés différents. L'hydroxyle en 5 se lie avec GLY⁵²⁶, alors que celui en 3' le fait avec GLN¹⁹² et LEU³⁵². Enfin, le OH en 4' préfère HIS⁹⁰ (Tableau07).

Comme la molécule de référence, la tamarixétine a une liaison hydrogène avec HIS⁹⁰ qui est localisée dans la poche latérale. A noter que LEU³⁵² se trouve dans la partie hydrophobe.

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
5-OH	GLY ⁵²⁶	2,94
3'-OH	GLN ¹⁹²	2,79
3'-OH	LEU ³⁵²	2,40
4'-OH	HIS ⁹⁰	2,3

Tableau 07 : Liaisons hydrogènes dans le complexe TAM/1cx2

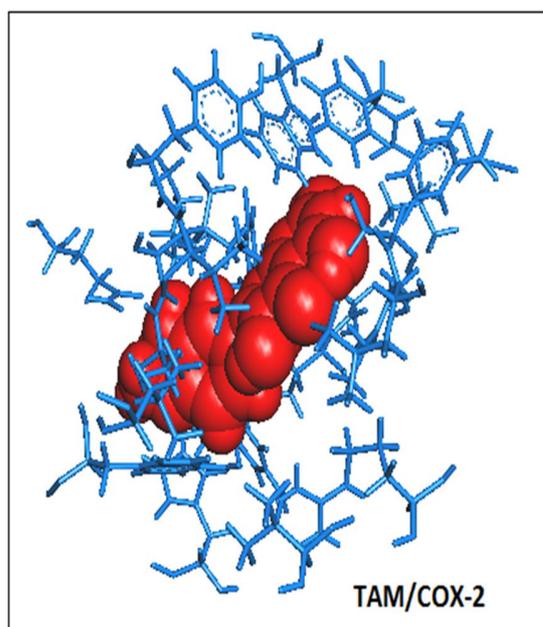


Figure 17 : Position de la tamarixétine dans le site actif de 1cx2

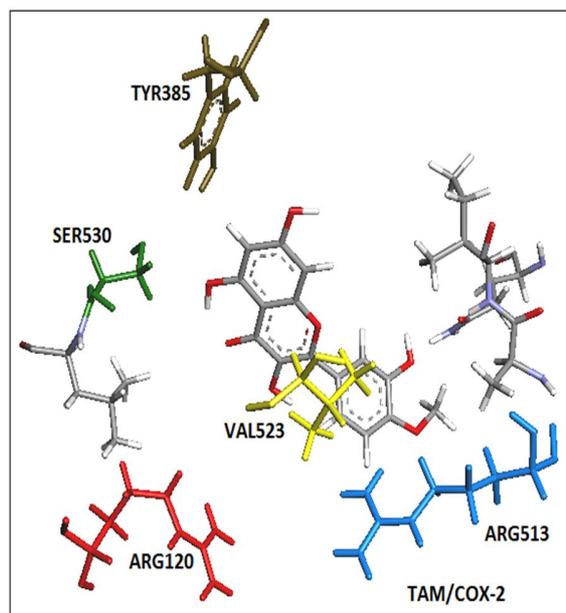


Figure 18 : Tamarixétine avec quelques résidus de la

D- Complexe QUE/1cx2

Les OH en 3' et 4' de la quercétine établissent avec l'enzyme deux liaisons hydrogènes avec le même acide aminé HIS⁹⁰ (**Tableau08**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
3'-OH	HIS ⁹⁰	2,84
4'-OH	HIS ⁹⁰	2,97

Tableau 08 : Liaisons hydrogènes dans le complexe QUE/1cx2

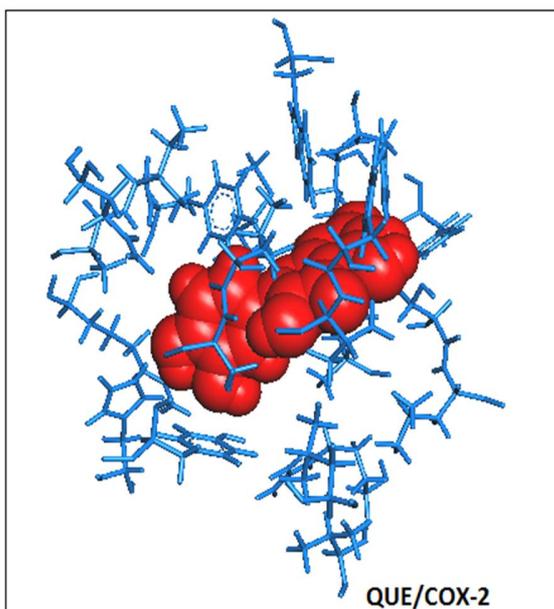


Figure 19 : Position de la quercétine dans le site actif de 1cx2

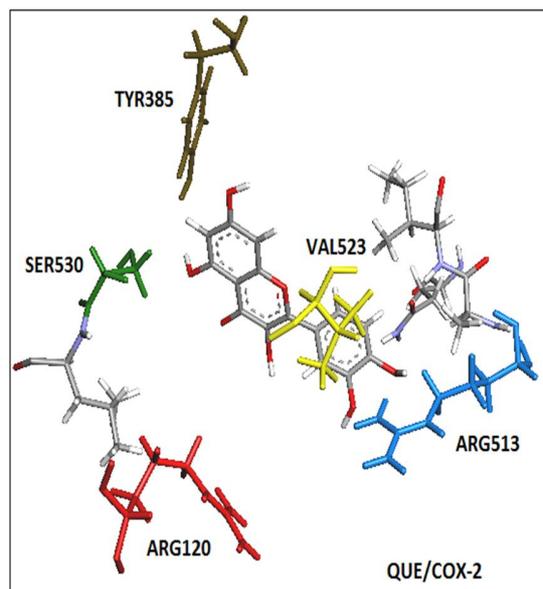


Figure 20 : Quercétine avec quelques résidus de la 1cx2

E- Complexe KAE/1cx2

Le kaempférol établit cinq liaisons hydrogènes avec différents acides aminés : le OH en 7 se lie avec deux acides aminés différents SER³⁵³ et LEU³⁵² ce dernier forme une liaison avec le OH en 3' qui lui-même se rapproche de TRP³⁸⁷. Le OH en 3 lui choisit GLY⁵²⁶ (**Tableau 09**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
7-OH	SER ³⁵³	2,75
7-OH	LEU ³⁵²	2,89
3-OH	GLY ⁵²⁶	2,95
3'-OH	LEU ³⁸⁴	2,87
3'-OH	TRP ³⁸⁷	2,61

Tableau 09 : Liaisons hydrogènes dans le complexe KAE/1cx2

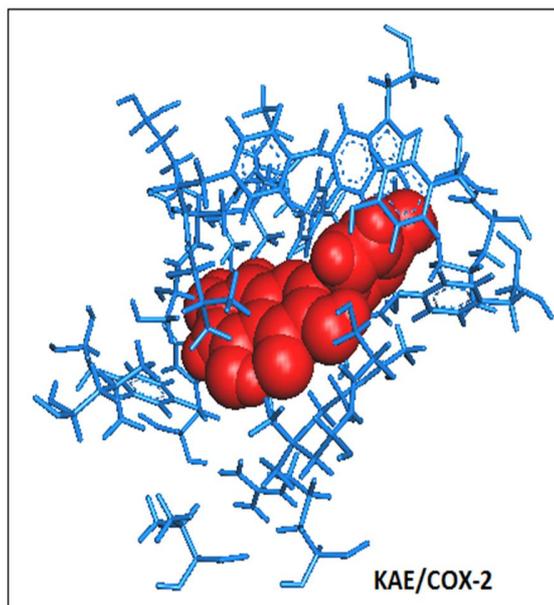


Figure 21 : Position du kaempférol dans le site actif de 1cx2

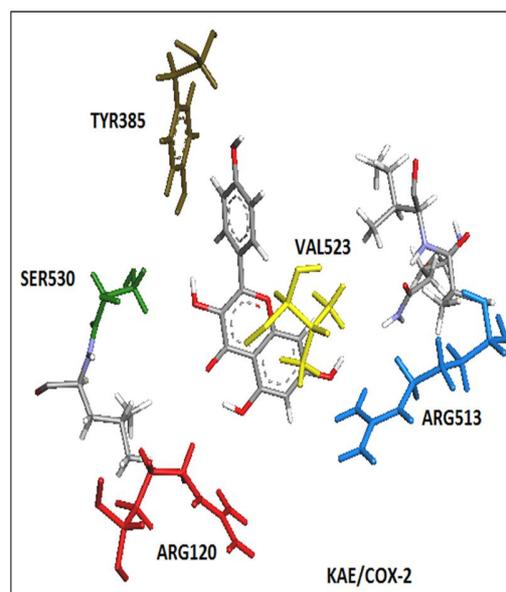


Figure 22: Kaempférol avec quelques résidus de la 1cx2

F- Complexe GAL/1cx2

La galangine établit avec l'enzyme deux liaisons hydrogènes avec 2 résidus différents SER³⁵³ et HIS⁹⁰ mais qui partent du même hydroxyle en position 7 (**Tableau10**).

Atome du ligand	Résidu	Distance (Å)
7-OH	SER ³⁵³	2,05
7-OH	HIS ⁹⁰	2,99

Tableau 10 : Liaisons hydrogènes dans le complexe GAL/1cx2

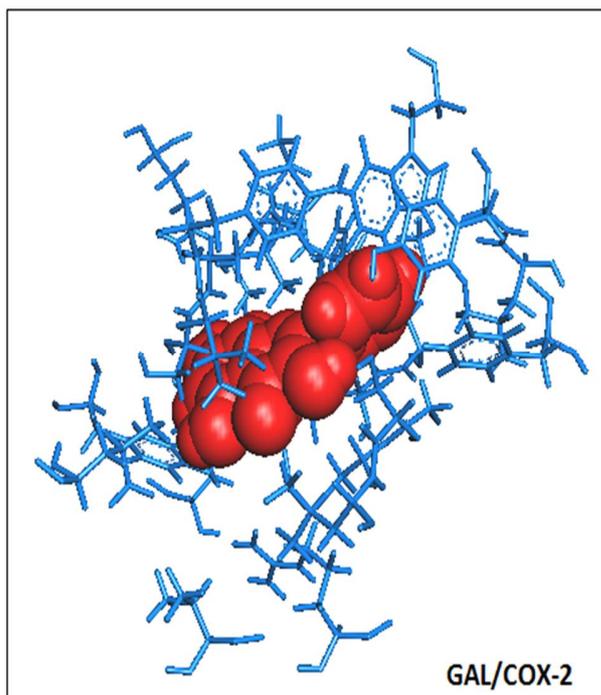
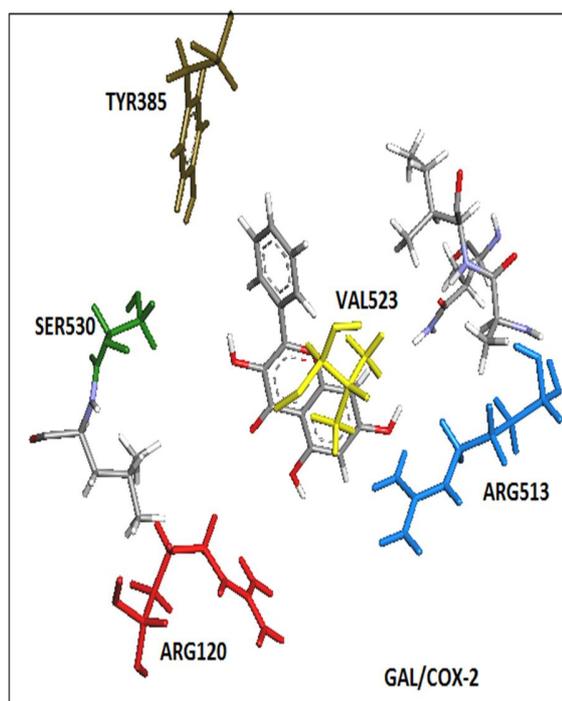


Figure 23: Position de la galangine dans le site actif de 1cx2

Figure 24: Galangine avec quelques résidus de la 1cx2



III.4. Conclusion

En analysant les différentes interactions obtenues grâce à la simulation du docking moléculaire effectué avec le logiciel ArgusLab 4.01 et en comparant les énergies des complexes, nous remarquons que ceux formés avec la galangine (-10,05 kcal/mole), le kaempférol (-10,00 kcal/mol) et la quercétine (-9,85 kcal/mol), présentent les valeurs les plus proches de celui de la molécule référence (-10,66 kcal/mol) comparés à ceux de la tamarixétine (-8,83 kcal/mol) et de l'isorhamnétine (-7,94 kcal/mol).

Avec son $\Delta G_{\text{(bind)}}$ de -10,05 kcal/mol, la galangine forme le complexe le plus stable et se place en première position.

Pour cette série de flavonols étudiés, la substitution de leur cycle B intervient sur la stabilité du complexe ligand-récepteur et diminue leur affinité avec la 1cx2. En effet, la galangine qui ne possède aucun substituant est classée en premier, vient ensuite le kaempférol avec un seul OH en 3'. La quercétine prend le troisième rang avec ses ortho di-OH en 3' et 4'.

D'après l'inspection visuelle des positions de chaque ligand, nous constatons que la galangine (**Figure 23**), le kaempférol (**Figure 21**) et la quercétine (**Figure 19**) pénètrent entièrement dans le site actif de la COX-2 alors que pour la tamarixétine (**Figure 17**) et l'isorhamnétine (**Figure 15**), une partie de la molécule reste en dehors du site.

Conclusion générale

Le présent mémoire représente une contribution qui rentre dans le cadre de l'axe de recherche «interactions protéine-ligands » développé au niveau de Laboratoire de Chimie des Matériaux Constantine (LCMC)

Dans ce travail, une étude des interactions moléculaires entre la COX-2 (1CX2) et les flavonols a été réalisée grâce à des techniques de modélisation via la simulation, notamment le docking moléculaire. La molécule SC-558, tirée de la structure cristallographique 3D du complexe 1cx2, sert de référence.

L'outil informatique utilisé pour le docking est le logiciel ArgusLab 4.01. Les énergies de liaison (ΔG_{bind}) ainsi que les liaisons hydrogène formées dans les complexes ligands-protéine sont employées pour analyser les interactions entre les différents flavonols testés et le site actif de la COX-2. Les informations recueillies, après criblage, permettent de déterminer quels sont les complexes les plus stables.

Confrontées entre elles et comparées à la molécule référence SC-558 (10,66 kcal/mol), les énergies du complexe formé avec les différents flavonols se classent comme suit :

- 1- Galangine (-10,05 kcal/mol)
- 2- Kaempférol (-10,00 kcal/mol)
- 3- Quercétine (-9,85 kcal/mol)
- 4- Tamarixétine (-8,83 kcal/mol)
- 5- Isorhamnétine (-7,94 kcal/mol)

D'après les valeurs des ΔG_{bind} obtenues, nous constatons que la Galangine, le Kaempférol et la Quercétine présentent les meilleures affinités avec l'enzyme 1cx2 comparativement à la Tamarixétine et l'Isorhamnétine.

Toujours du point de vue énergétique, GAL/1cx2 (-10,05 kcal/mol) est le complexe le plus stable parmi les 5.

D'après cette étude *in silico* et les résultats obtenus, la galangine, le kaempférol et la quercétine peuvent jouer le rôle d'inhibiteurs potentiels de la COX-2. Pour le confirmer, il faudra peut-être faire des tests *in vitro* et *in vivo*.

Références bibliographiques

- ALCARAZ L., BLANCO S., PUIG O., TOMAS F. FERRETTI F., 2000.- Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theo. Biol.*, 205: 231-240.
- BASILE A., GIORDANO S., LOPEZ SAEZ J.A. COBIANCHI B.C., 1999.- Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. *Phytochemistry*, 2(8): 1419-1482.
- BASTARD K., 2005.- Assemblage flexible de macromolécules : la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques. *UFR Biologie et Sciences de la Nature*.
- BAST A., KAISEROV H., DEN HARTOG GJM., HAENEN GRMM., VAN DER VIJGH WJF., 2007.- Protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity: Flavonoids. *Cell. Biol. Toxicol.*, 23 : 39-47.
- BENAHMED M., ELOMRI A., AKKAL S., LAOUAR H., VÉRITÉ P., SEGUIN E., 2008.- Flavonoids from *Bupleurum montanum* Coss. (Apiaceae). *Planta Med*, 74 :PB89
- BENCHERAIET R., KHERRAB A., KABOUCHE A., KABOUCHE Z. AND JAY M., 2011.- Flavonols and Antioxidant Activity of Ammi visnaga L. (Apiaceae). *Rec. Nat. Prod.* 5(1) : 52-55
- BOTTING R., 2006.- *Journal of Thermal Biology*, 31 (1–2): 208-219.
- BOYNTON A.L., KLEINE L.P., DURKIN J.P., and al., 2009.- Mediation by calci-calmodulin and cyclic AMP of tumor promoter-induced DNA synthesis in calcium deprived rat liver cells. *Biol. Sci. Div.*, 417-31
- BREYER MD., BADR KF., 1996.- Arachidonic acid metabolites and the kidney. In Brenner BM, Eds. *The Kidney*. Philadelphia: W.B. Saunders, 5e Ed: 754-85.
- BRONNER W.E., BEECHER G.R., 1995.- Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, 705:247-256.
- BRUNETON J., 2009.- Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 4e édition. Ed. Tec et doc. Paris (France).
- BU-ABBAS A., CLIFFORD M.N., IOANNIDES C., WALKER R., 1995.- Stimulation of rat hepatic UDP glucuronosyl transferase activity following treatment with green tea. *Food chem. Toxicol*, 33(1): 27-30.
- BURDA S., OLESZEK W., 2001.- Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49(6): 2774-2779.

CHAN M.W., WONG C.Y., CHENG A.S., CHAN V.Y., and al., 2007.- Targeted inhibition of COX-2 expression by RNA interference suppresses tumor growth and potentiates chemosensitivity to cisplatin in human gastric cancer cells. *Oncol. Rep.*18(6): 1557-1562.

CHANDRASEKHARAN N.V., and SIMMONS D.L., 2004.-The cyclooxygenases. *Genome Biol.*, 5(9): 241.

CHOI E.M., KWAK S.J., KIM Y.M., and al., 2005.- COX-2 inhibits an oikis by activation of the PI-3K/Akt pathway in human bladder cancer cells. *Exp. Mol. Med.*, 37(3): 199-203.

CROZIER A., JENSEN E., LEAN M.E.J., and al., 1997.- Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*, 761: 315-321.

DA SILVA E.J.A., OLIVEIRA A.B., LAPA A.J., 1994.- Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, duartin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(2): 118-22.

DE MORAES E., DAR N.A., DE MOURA GALLO C.V. and HAINAUT P., 2007.- Cross-talks between cyclooxygenase-2 and tumor suppressor protein p53 : Balancing life and death during inflammatory stress and carcinogenesis. *International Journal of Cancer*, 121(5) : 929-37

DE WITT D., 1991.- Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochim. Biophys. Acta.*1083: 121-134.

DEREMBLE C.E.T., LAVER Y,R., 2005.- Macromolecular recognition. *Curr Opin Struct Biol*, 15 (2):171–175

DERMOND O. and RUEGG C., 2001.- Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resistance Updates*, 4(5): 314-21.

DI CARLO G., MASCOLO N., IZZO A.A., CAPASSO F., 1999.- Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.*, 65(4): 337-353.

ERLUND IRIS., 2004.- Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research.*, 24(10) : p. 851-874.

FERLAY J., SOERJOMATARAM I., ERVIK M., DIKSHIT R., and al., 2013.- Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base 11 : *International Agency for Research on Cancer*.

FLETCHER B.S., KUJUBU D.A., PERRIN D.M., and HERSCHMAN H.R., 1992.- Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J. Biol. Chem.*, 267: 4338-4344.

FORMICA J.V., REGELSON W., 1995.- Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food & Chem. Toxicol.*, 33(12): 1061-1080.

FULTON A.M., MA X., and KUNDU N., 2006.- Targeting prostaglandin EEP receptors to inhibit metastasis. *Cancer Research*. 66(20): 9794-7.

FUNCK C.D., FUNCK L.B., KENNEDY M.E., and al., 1991.- Human platelet erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase : CDNA cloning, expression and chromosomal assignment. *FASEB J.*, 5: 203-2312.

GALATI E.M., MONFORTE M.T., KIRJAVAINEN S., and al., 1994.- Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid : antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco*.40 (11): 709-12.

GALVEZ J., CRESPO J., JIMENEZ J., SUAREZ A., ZARZUELO A., 1993 a.- Antidiarrhoeic activity of quercetin in mice and rats. *J. Pharmacol.* 45: 157-159.

GARCIA-LAFUENTE A., GUILLAMON E., VILLARES A., ROSTAGNO M. A., MARTINEZ J. A., 2009. - *Inflammation Research*.58(9): 537-552.

GETTIGAN P., HENRY D., 2004.- Cardio-vascular risk and inhibitor of cyclooxygenase. *Jama.*, oct., 296(13): 1633-44.

GOLDMAN-MOTTET S., 2004.- *Utilisation toxicité et effets indésirables des anti-inflammatoires non stéroïdiens : Actualités*. Thèse méd. Vét., Alfort.; 107 p.

GOODARZI M. T., ZAL F., MALAKOOTI M., and al, 2006.- Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran*, 44(1): 41-5.

GOPPELT-STRUEBE M., 1995.- Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozyme expression. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 52: 213-222.

GRANGE J.M., DAVEY R.W., Antibacterial properties of propolis (bee glue) *J. R. Soc. Med.*, 83 : 159-60.

GUERLIN M., 2013.-synthèse bibliographique critique de l'utilisation clinique des AINS en cancérologie chez les carnivores domestique, Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

- GUERRA J.A., MOLINA M.F., ABAD M.J., VILLAR A.M., BERMEJO P., 2006.-Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids isolated from *Tanacetum microphyllum*. *International Immunopharmacology* 6: 1723–1728.
- HAN C., et WU T., 2005.- Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell growth and invasion through EP1 receptor-mediated activation of the epidermal growth factor receptor and Akt. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(25): 24053-63.
- HERNÁNDEZ VICTORIANO., RECIO M.CARMEN., MÁÑEZ SALVADOR., and al., 2007.- Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences*, 81 : 480–488.
- HINZ B., BRUN K., 2002.- Cyclooxygenase-2 10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300: 367-75.
- HOUCHAN C., STENSON W., ET CONN S., 2000.- Disruption of cyclo-1 gene results in an impaired response to radiation injury. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279: 6858-6865.
- HUANG M., STOLINA M., SHARMA S., and al., 1998.- Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2 dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages : up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Research*. 58(6): 1208-16.
- HUANG S.Y., ZOU X., 2010.- Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking. *Int. J. Mol. Sci.* 11: 3016-3030.
- IÑIGUEZ M.A., RODRIGUEZ A., VOLPERT O.V., FRESNO M. and REDONDO J.M., 2003.- Cyclooxygenase-2 : a therapeutic target in angiogenesis. *Trends in Molecular Medicine*, 9(2) : 73-8.
- IZZO A.A., DICARLO G., MASCOLO N., CAPASSO F., AUTORE G., 1994.- Antiulcer effects of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytotherapy Res.*, 8(3): 179-81.
- JACHAK S.M., 2006.- *Current Medicinal Chemistry*, 13(6): 659-678.
- JACOB V., HAGAI T., SOLIMAN K., 2011.- *Current Organic Chemistry*, 15(15) : 2641-2657.
- JOHNSON G.E., IVANOV V.N. and HEI T.K., 2008.- Radio sensitization of melanoma cells through combined inhibition of protein regulators of cell survival. *Apoptosis*, 13(6): 790-802.

JUSTEN U., KNUTHSEN P., LETH T., 1998.- Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*.

KATO R., NAKADATE T., YAMAMOTO S., SUGIMURA T., 1983.- Inhibition of 12-O tetra decanoyl phorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin : possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis*, 4(10): 1301-5.

KECK G., 1991.- Toxicité et effets indésirables des AINS. In: *Le grand livre des AINS. Ségré: Ed. Schering Plough Santé Animal*, p: 131-144.

KIM H.P., SON K.H., CHANG H.W., KANG S.S., 2004.- *Journal of Pharmacological Sciences*, 96 (3): 229-245.

KNIGHTS K., MANGONI A., Miners J., 2010.- Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs:Implications for understanding toxicity. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 3 :769–776.

KOLLMAN P.A., MASSOVA I., REYES C., KUHN B., and al., 2000.- Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models, *Acc. Chem. Res.*, 33: 889-897.

KONTRUCK S.J., RADECKI T., BROZOWSKI T. and al., 1986. - Antiulcer and gastro-protective effects of solon, a synthetic flavonoid derivative of sophorandin. Role of endogenous prostaglandins. *Bur. J. Pharmac*, 125: 185 192.

KORE A.M., 1990.- Toxicology of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Vet. Clin. North Am.: small Animal Practice*, 20(2): 419-430

KOSAKA T., MIYATA A., IHARA H., and al., 1994.- Characterization of the human gene (pTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur. J. Biochem*, 221: 889-897.

KURUMBAIL R.G., STEVENS A.M., GIERSE J.K., and al., 1996.- Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384(6610): 644-648.

LASKER J.M., HUANG M.T., CONNEY A.H., 1984.- *In vitro* and *In vivo* activation of oxidative drug metabolism by flavonoids. *J. pharmacol. exp. Ther.* 229(1): 162-70.

LEACH A., 2001.- *Molecular modelling, Principles and Application*, Prentice hall, New jersey.

LEE SJ., SON KH., CHANG HW., et al., 1993.- Anti-inflammatory activity of naturally occurring flavone and flavonols glycosides. *Arch. Pharm. Res.*, 16(1): 25-28.

LIMASSET B., LE DOUCEN C., DORE J.CH., and al., 1993.- Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. *Biochem. Pharmacol*, 46(7): 1257-71.

LIOTTA D., 1988.- Advances in Molecular Modeling, Ed, *JAI Press*, P1.

LIU C. H., CHANG S. H., NARKO K., and al., 2001.- Over expression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21): 18563-9.

LORENZ W., KUSCHE J., BARTH H., MATHIAS CH., 1994.- Action of several flavonoids on enzyme of histidine metabolism in vivo. In: *CZ Maslinski (Ed). Histamine. Pennsylvania: Hutchinson and Ross: 265-269.*

LLORENS O., PEREZ J., PALOMER A., MAULEON D., 2002.- Differential binding mode of diverse cyclooxygenase inhibitors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 20: 359–371

MANACH C., REGERA TF., TEXIER O. and al., 1996.- Bioavailability, metabolism and physiological impact of 4-oxo-flavonoids. *Nutr. Res*, 16 (3): 517-544.

MANTAS A., DERETHEY E., FERRETTI F.H., and al., 2000.- Structural analysis of flavonoids with anti-HIV activity. *J. Molec. Struct, Theochem*.504 (1-3) :171.

MARTINI A., KATERERE D. R., ELOFF J. N, 2004.- Seven flavonoids with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol*, 93 (2-3): 207-212.

MASFERRER J.L., LEAHY K.M., KOKI A.T., ZWEIFEL B.S.,and al., 2000.-Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Research*, 60(5): 1306-11.

MEKELLECHE., 2000-2001.- Cours de post-graduation; option : chimie théorique.

MERIC J., ROTTEY S., OLAUSSEN K., and al., 2006.- *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 59 (1):51-64.

MICHIHIRO M., MAMI T., KAZUNORI F., and al., 2000.- Suppression by Flavonoids of Cyclooxygenase-2 Promoter-dependent Transcriptional Activity in Colon Cancer Cells: Structure-Activity Relationship. *J. Cancer Res*. 91: 686–691.

MIDDLETON E.J., 1996.- Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol*. 34 (5): 344-348.

MIDDLETON JR. E., CHITHAN K., 1986.- The impact of plant flavonoids on mammalian biology implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne J.B., editor. *The Flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall; 1993.

MIDDLETON E.J., DRZEWIECKI G., 1984.- Flavonoid inhibition of human basophil histamine release stimulated by various agents. *Biochem. Pharmacol*, 33(21): 3333-8.

MOOKERJEE B.K., LEE T.P., LOGUE G.P., LIPPES H.A., MIDDLETON E., 1986.- The effects of flavonoids on human lymphocyte proliferative responses. *Prog. Clin. Biolo. Res*, 213: 511-20.

MURAKAMI S., MURAMATSU M., OTOMO S., 1992.- Gastric H/KATPase inhibition by catechins. *J. Pharm. Pharmacol*, 44: 926-928.

NAMGOONG S.Y., SON K.H., CHANG H.W., KANG S.S., KIM H.P., 1994.- Effects of naturally occurring flavonoids on mutagen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sci*, 54(5): 313-20.

NANTEL F., DENIS D., GORDON R., NORTHEY A., CIRINO M., METTERS KM., CHAN CC., 1999.- Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br J Pharmacol*, 128: 853-9.

NETO C.C., 2007.- Cranberry and blueberry: evidence for protective effects against cancer and vascular diseases. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51: 652-64.

NIJHOFF W.A., BOSBOOM M.A., SMIDT M.H., PETERS W.H., 1995.- Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by alpha-angelica lactone and flavone. *The Netherlands Carcinogenesis*, 16(3): 607-12.

NIJVELDT R.J., E. VAN NOOD D. VAN HOORN P.G. and al., 2001.- Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, vol. 74, no 4, p. 418-425.

NIKOLIC D., et VAN BREEMEN R. B., 2001.- DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. *Chemical Research in Toxicology*, 14(4):351-4.

NISHINO H., NAITO, E., IWASHIMA A., TANAKA K., and al., 1984.- Interaction between quercetin and calcium-calmodulin complex: possible mechanism for anti-tumor-promoting action of the flavonoid. *Gann*, 75(4): 311-16.

OBERMEIER M.T., WHITE R.E., YANG C.S., 1995.- Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Pharm. Res*, 25(6): 575-84.

OKAMOTO A., SHIRAKAWA T., BITO T., and al., 2008.- Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces up regulation of E-cadherin and has antitumor effect on human bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Urology*, 71(1): 156-60.

O'LEARY K. A., PASCUAL TERESA S. D., NEEDS P. W., and al., 2004.- Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 551 (1-2): 245-254.

OSHIMA T., YOSHIMOTO T., YAMAMOTO., KUMEGAWA S. and al., 1991.- Camp-dependant induction of fatty acid cytooxgénase mRNA In mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). *J. Bio. Chem*, 266: 13621- 13626.

OUALI K., TREA F., TOUMIL., BAIRI A. and al., 2007. L'hespéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations foetales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytother*, 5 (4): 204-209.

PALAYOOR S.T., ARAYANKALAYIL M.J., SHOAIBI A. and COLEMAN C.N., 2005.- Radiation sensitivity of human carcinoma cells transfected with small interfering RNA targeted against cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res*, 11(19 Pt 1): 6980-6986.

PERERA P., RINGBOM T., HUSS U., VASANGE M., BOHLIN L., 2001.- In Bioactive compounds from natural sources; Tringali C., Ed.; Taylor & Francis Ltd: London,p 433-472.

PHILIP M., ROWLEY D.A., and SCHREIBER H., 2004.- Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol*, 14(6): 433-439.

PIOOT D., LOLL P.J., GARAVITO R., M., 1994.- The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367: 243-249.

PRASAD S., PHROMNOI K., YADAV V. R., CHATURVEDI M. M., AGGARWAL B. B., 2010.- *Planta Medica*, 76 (11): 1044-1063.

RASO G M., MELI R., DI C G., PACILIO M., DI C R., 2001.- *Life Sciences*, 68 (8): 921-931.

READ M. A., 1995.- Flavonoids: naturally occurring anti-inflammatory agents Vascular. *Am. J.Pathol*, 147(2): 235-7.

RICE-EVANS C. A., MILLER N. J., PAGANGA G., 1996.- Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radic. Biol. Med*, 20 (7): 933-956.

ROENGSUMRAN S., PETSOM A., NGAMROJANAVANICH N., RUGSILP T., and al., 2000.- Flavonoid and flavonoid glycoside from *Butea superba* Roxb. and their cAMP phosphodiesterase inhibitory activity. *J.Scient. Research of Chulalongkorn University*, 25(1): 169-176.

SARI S., MEDJAHED W., KAJIMA MULENGI J., GHALEM S., 2007.- Approach of the Interaction Enzyme-Substrate by Molecular Modelling, *Asian Journal of Chemistry*, 19(3).

SEIBERT K., ZHANG Y., LEAHY K., HAUSER S., MASFERRER J., PERKINS W., 1994.- Pharmacological and biochemical demonstration of rôle the cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natf. Acad. Sci. USA*, 91: 12013-12017.

SEIBERT K., ZHANG Y., LEAHY K., HAUSER S., MASFERRER 1., PERKINS W., LEE L., et ISAKSON P., 1994.- Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proe Natl Aead sei*, vol 91, p.1201312017.

SEURET P., 2003.- Interactions intermoléculaires et cohésion moléculaire : inhibiteurs viraux, colonnes de séparation HPLC et micro dépôts métalliques. THÈSE de Docteur ès Sciences, Université de Genève

SHATTUCK-BRANDT R.L., VARILEK G.W., RADHIKA A., and al., 2000.- Cyclooxygenase 2 expression is increased in the stoma of colon carcinomas from IL-10-/-mice. *Gastroenterology*, 118: 337-34. 6.

SMITH W.L., MEADE E.A., DE WITT D.L., 1994.- Interactions of PGH synthase isozymes-1 and -2 with NSAIDs. *Am. New York Acad Sci*, 744: 50-57.

SMITH WL., DEWITT DL., 1996.- Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv.mmuno*, 62:167-215.

SOBOLEWSKI C., CERELLA C., DICATO M., and al., 2010.- The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int. J. Cell Biol.*, 2010: 215158.

SPENCER A. G., WOODS J. W., ARAKAWA T., SINGER I. I., ET SMITH W. L., 1998.- Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(16): 9886-93.

SUBBARAMAIAH K., HOWE L. R., PORT E. R., BROGI E., and al., 2006.- HER-2/neu status is a determinant of mammary aromatase activity in vivo: evidence for a cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Cancer Research*, 66(10): 5504-11.

SURH, Y. J., 2003.- Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*. vol. 3, no 10, p. 768-780.

SYUICHI F., KAZUTAKA T., SHIGEHARU M., 2006.- Antioxidant material, anti-deterioration agent and food or beverage. WO2006070810.

TELLIEZ A., FURMAN C., POMMERY N., ET HENICHART J., 2006.- Mechanisms leading to COX-2 expression and COX-2 induced tumorigenesis: topical therapeutic strategies targeting COX-2 expression and activity. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6(3):187-208.

TOULHOAT H., 2007.- Modélisation moléculaire. Bases théoriques : des propriétés microscopiques aux propriétés macroscopiques. *Techniques de l'ingénieur J 1-013*

TSUJII M., ET DUBOIS R., 1995.- Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83(3):493-501.

TSUJII M., KAWANO S., ET DUBOIS R., 1997.- Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7): 3336-40.

VAN ACKER S., VAN DEN BERG D., TROMP M., GRIFFIOEN D. and al., 1996.- 7-Mono hydroxyethylrutoside protects against chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity when administered only once per week. *Free Radic. Biol. Med.*, 20 (3): 331-342.

VANE J., BAKHLE YS., BOTTING RM., 1998. - Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol.Toxic.* 38: 97-120.

VERMA A., BOUTWELL R., 1981.- Intracellular calcium and skin tumor promotion: calcium regulation of induction of epidermal ornithine decarboxylase activity by the tumor promoter 12-tetRadecanoylphorbol-13-acetate. *Biochem. Biophys. Res. Co*, 101(2):375-83.

VERMA A.K., JOHNSON J.A., GOULD M.N., TANNER M.A., 1988.- Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by the dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.*, 48(20): 5754-8.

VESSAL M., HEMMATI M., VASEI M., 2003. - Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin induced diabetic rats. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 135: 357-364.

WARD J., 1994.- Free Radicals, antioxidants and preventive geriatrics. *Austr. J. Physic*, 23(7): 1297-301.

WARREN G., ANDREWS C.W., CAPELLI A.M., CLARKE B., and al., 2006.- A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions, *J. Med. Chem*, 49:5912-5931.

WATTENBERG, LEEW. 1983.- Anticarcinogenic effects of several minor dietary components. *Foods Proc. Int. Conf.*, 157-66.

WIESE F.W., THOMPSON P.A., ET KADLUBAR F.F., 2001.- Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. *Carcinogenesis*, 22(1) : 5-10.

WILLOUGHBY, D. A., TOMLINSON A., GILROY D., et WILLIS D., 1996.- Inducible enzymes with special reference to COX-2 in inflammation and apoptosis. In: VANE J. R.: Improved on steroidal anti-inflammatory drugs COX-2 enzyme inhibitors. London, Harvey Press, p 67-81.

WODAK S J. and JANIN J., 1978.- Computer analysis of protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.*, 124: 323-342.

XIE WL., CHIPMAN J.G., ROBERTSON DL., ERIKSON RL., SIMMONS DL., 1991.-Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2692-6.

ZAFRA-STONE S., YASMIN T., BAGCHI M. and al., 2007.- Berry anthocyanin as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Mol. Nutr. Food Res*, 51(6): 675-83.

ZRIEKI A., FARINOTTI R., and BUYSE M., 2008.- Cyclooxygenase inhibitors down regulate P-glycoprotein in human colorectal Caco-2 cell line. *Pharm Res*, 25(9): 1991-2001.

Résumé

Le présent travail s'articule autour de la modélisation des interactions protéine-ligands. Cette étude « *in silico* » par le biais du docking moléculaire vise à prédire la structure 3D d'un complexe formé à partir de petites molécules et d'une enzyme afin d'évaluer le mode de fixation des différentes interactions établies entre les deux entités.

Dans ce contexte, ArgusLab 4.01, logiciel libre est utilisé pour estimer l'affinité de certains flavonoïdes vis-à-vis de la cyclooxygénase-2 (COX-2), une iso-enzyme inductible responsable de l'inflammation et présente dans certains cancers.

La modélisation par le biais du docking moléculaire a permis de quantifier l'énergie libre de formation (ΔG_{bind}) de la COX-2 avec la galangine, l'isorhamnétine, le kaempférol, la quercétine et la tamarixétine.

D'après les résultats obtenus et comparativement à la molécule référence SC-558 dont le pouvoir anti-inflammatoire est très important ($IC_{50} = 0,0093\mu\text{M}$), seuls la galangine, le kaempférol et la quercétine présentent des capacités d'inhibition vis-à-vis de la cyclooxygénase-2. La galangine se classe en première position.

Abstract

This work is articulated around the modeling of the interactions protein-ligands. This study “*in silico*” by the means of the molecular docking aims at predicting the structure 3D of a complex formed starting from small molecules and of an enzyme in order to evaluate the mode of fixing of the various interactions established between the two entities.

In this context, ArgusLab 4.01, free software are used to estimate the affinity of some flavonoides with respect to cyclooxygénase-2 (COX-2), a inductible Iso-enzyme responsible for the ignition and present in certain cancers.

Modeling by the means of the molecular docking made it possible to quantify the free energy of formation (ΔG_{bind}) of the COX-2 with the galangine, the isorhamnétine, the kaempférol, quercetin and the tamarixétine.

According to the got results and compared to the molecule reference SC-558 whose power anti-inflammatory drug is very important ($IC_{50} = 0,0093\mu M$), only the galangine, the kaempférol and quercetin have capacities of inhibition with respect to the cyclooxygenase-2. The galangine is classified in first position.

ملخص

هذا العمل يدور حول نمذجة التفاعلات بين بروتين-مستقبل البروتين للتنبؤ بطريقة رسو الجزيئة .

من خلال الدراسة عن طريق "*in silico*" و باستخدام الدوكينغ يقوم هذا الأخير بتقييم طريقة رسو الانزيم و تقديم البنية ثلاثية الابعاد للمركب و إظهار كيفية التساق الانزيم مع جميع مكونات المستقبل الجزيئي لتوضيح مختلف التفاعلات الموجودة بين المركبين .

في هذا السياق ،قمنا باستخدام أرجوسلاب و 4،01 هو عبارة عن برنامج حر يستخدم لتقدير التقارب الموجود بين بعض الجزيئات كالفلافونويدات مع الانزيم 2-السيكلو او كسيجيناز (2-كوكس) و هو عبارة عن انزيم يفرز بعد التهاب مسوؤل عن الالتهابات و تطورها الى بعض السرطانات.

اذن نمذجة التفاعلات عن طريق الدوكينغ سمح لنا بتقدير نسبة الطاقة الحرة لالتحام المركب -2كوكس مع الفلافونويدات المنتقاة : (جالانجين ،ايذوغامنتين ، كايمفيرول ، كرسيتين و التاماركسيئين) .

من خلال النتائج المتحصل عليها و بالمقارنة مع الجزيئة النموذجية "SC-558" و اللتي تعتبر من الجزيئات المضادة لالتهابات ، فقط الجالانجين ، الكايمفيرول و الكرسيتين من لهم القدرة على تثبيط الانزيم 2-السيكلو او كسيجيناز . و الجالانجين هو من يحتل المرتبة الاولى من بين الخمس مركبات.