



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية عاوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et Santé*

Intitulé :

Simulation par docking moléculaire des interactions enzyme-inhibiteur : cas de la MMP-13

Présenté et soutenu par : *BENDAMENE Samia*

Le : 05/06/2016

ZAHRAOUI F.Zohra

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIKHI A. (Pr. Université des Frères Mentouri-Constantine).

Rapporteur : BENSEGUENI A. (Pr. Université des Frères Mentouri-Constantine).

Examineur : MOKRANI E.H. (M.A.A Université des Frères Mentouri-Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciement

Au premier lieu, nous remercions dieu de nous avoir donné le pouvoir, la patience et le courage pour réaliser ce présent travail.

Nous adressons nos remerciements les plus profonds et les plus vifs à notre encadrant Mr. BENSEGUENI A. professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine pour son aide, ses orientations, ces précieux conseils, sa patience et surtout sa confiance.

Nous tenon à remercier aussi Mr. CHIKHI A. Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté en nous faisant l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

C'est aussi avec plaisir, que nous exprimons notre profonde gratitude et nos remerciements les plus vifs à Mr MOKRANI El H. Maitre-assistant 'A' à L'Université des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté de faire membre de jury, ainsi pour sa contribution à la réalisation de la partie pratique, pour son aide, sa patience, ces conseils, sa disponibilité tout le long de ce travail.

Nous remercions aussi Mme TENOÛ S. Maitre-assistant 'A' à L'Université des Frères Mentouri Constantine pour son aide et ces conseils. Enfin nous tenons à remercier toute personne qui de près ou de loin nous à soutenue pour mener à terme notre travail.

Dédicace

À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre,,,

À cet source de tendresse, de patience et de générosité,,,

À ma mère !

À mon cher père : Saïd

À mon mari qui a toujours était à mes cotés

A mon cher fils : Mohamed Adam

À mon beau père : Lamine

À tous mes frères et sœurs, ainsi que leurs enfants

À toute ma famille

À tous mes amis et collègues

A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer

ZAHRAOUI F.Zohra

Dédicace

Je dédie ce travail à:

- Mes chers parents.

- Mes frères et mes sœurs.

- Mes oncles et mes cousins.

- Mes amies et à tous mes collègues.

BENDAMENE Samia

Table des matières

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 01 : La pathologie de l'arthrose	
1-Physiopathologie de l'arthrose.....	3
1-1- L'articulation.....	3
1-1-1- Le cartilage.....	3
1-1-2- Le cartilage arthrosique.....	4
2 -Les facteurs favorables de l'arthrose.....	5
2-1- L'âge.....	5
2-2- Les facteurs génétiques.....	5
2-3- Les facteurs mécaniques.....	5
3- Destruction du cartilage.....	5
3-1- Facteurs cataboliques.....	6
3-1-1- Les métallo protéinases de la matrice (MMP s).....	6
3-1-2- Les facteurs inflammatoires.....	6
4- Le traitement pharmacologique de l'arthrose.....	7
4-1- Le paracétamol.....	7
4-2- Les antalgiques palier2.....	7
4-3- Les anti inflammatoires non stéroïdiens (AINS).....	7
4-4- Les médicaments anti-arthrosiques symptomatiques d'action lents (AASAL).....	7
4-5- Les corticoïdes.....	7
4-6- Traitement « chondro-restaurateur ».....	7
4-7- La chirurgie.....	8
Chapitre 02 : La métallo protéinase matricielle -13	
1- La métallo protéinase-13 (collagénase-3).....	9

Table des matières

1-1- Structure de la métallo protéinase-13.....	9
1-1-1- Le peptide signal.....	10
1-1-2- Le pro domaine.....	11
1-1-3- Le domaine catalytique.....	11
1-1-4- la charnière.....	12
1-1-5- Le domaine type haémopéxine	12
1-2- Les substrats de la MMP-13.....	12
1-3 -Activateurs et inhibiteurs de la MMP-13.....	12
Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13	
1-Les inhibiteurs avec un groupe de liaison au zinc (ZBG).....	14
2-Les inhibiteurs sélectifs de la MMP-13sans groupe de liaison au zinc	26
Chapitre 04 : Le docking moléculaire	
1- Docking moléculaire	38
Chapitre 05: Matériel et méthodes	
1-Matériel.....	40
1-1-Micro-ordinateur	40
1-2- logiciels (programmes)	40
2-Méthodes	40
2-1- Préparation des molécules pour le docking moléculaire	40
2-1-1- Préparation de l'enzyme (récepteur)	40
2-1-2- Préparation des ligands.....	42
2-1-3-Génération du protomol.....	42
2-2- Le docking moléculaire	42
2-3- Analyse visuelle des résultats	43

Table des matières

2-4- La règle de 5 de Lipinski	44
Chapitre 06 : Résultats et discussion	
1-Evaluation de la fiabilité du programme surflex	45
1-1- Le RMSD (<i>Root Mean Square Deviation</i>).....	45
1-2- Analyse visuelle	46
1-3- Test du coefficient de corrélation linéaire.....	47
1-4-Conclusion.....	50
2-Analyse visuelle des interactions entre les inhibiteurs et les acides aminés du site actif de la MMP-13.....	50
2-1- Etude des interactions du composé 36	51
2-2- Etude des interactions du composé 14.....	53
2-3- Application de la règle de Lipinski	56
2-4- Conclusion.....	56
3-Recherche de nouveaux inhibiteurs de la MMP-13.	56
3-1- Le docking moléculaire d'un ensemble de composés.	56
3-2- Application de la règle de Lipinski.	62
Conclusion.....	64

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Les acides carboxyliques phényl sulfonamid.....	14
Tableau N° 2 : Structure des inhibiteurs (N-isopropoxy-arylsulfonamide-based hydroxamate) des MMP-13 avec différents radicaux	15
Tableau N°3 : Inhibiteur de MMP-13	17
Tableau N°4 : Spirocycliques linkers inhibiteur du MMP-13.....	19
Tableau N°5 : Les inhibiteurs de MMP-13 à base de pyrimidinetrione.....	20
Tableau N°6 : Les puissants inhibiteurs de MMP-13 à base de pyrimidinetrione.....	21
Tableau N°7 : Hydroxamates pipécolique 3OH 3-méthyl	23
Tableau N°8 : Des puissants inhibiteurs de MMP-13.....	24
Tableau N°9 : Phényl sulfamides carboxylate MMP-13 inhibiteurs	25
Tableau N°10 : Les inhibiteurs obtenus après modification de liaison amide.....	25
Tableau N°11 : Les inhibiteurs dérivés de benzofuranne en C3-méthylé	26
Tableau N°12 : Thiéno [2,3-d] pyrimidine-2-carboxamides portant un carboxybenzène groupe en position 5: Très puissant, sélectif, et disponible par voie orale.....	27
Tableau N°13 : Structure des inhibiteurs sélectifs du MMP-13 avec des différents radicaux.....	29
Tableau N°14 : Structure des inhibiteurs sélectifs du MMP-13 avec des différents radicaux.....	31
Tableau N°15 : Structure des amides (inhibiteurs sélectifs des MMP-13) avec différents radicaux.....	33

Liste des tableaux

Tableau N°16 : Structure des Phenoxyphenyl SAR (inhibiteurs sélectifs des MMP-13) avec différents radicaux	33
Tableau N°17 : Structure d'autres inhibiteurs sélectifs du MMP-13 avec des radicaux différents.....	33
Tableau N°18 : Structure des analogues amides avec différents radicaux.....	34
Tableau N°19 : Structure des inhibiteurs obtenus par remplacement Amides du composé 2u.....	35
Tableau N°20 : Structure des analogues hydrophiles saturés du composé 2r.....	36
Tableau N°21 : Inhibiteurs sélectifs de MMP-13 Pyrimidine dicarboxamides.....	37
Tableau N°22 : Liste des acides aminés du cite actif de la MMP-13.....	41
Tableau N°23 : Résultats de l'activité biologique (pIC_{50}) de 66 inhibiteurs de la MMP-13 et leurs (affinité) obtenus par Surflext.....	48
Tableau N°24 :Les liaisons hydrogène établies par le composé 36 avec le site actif	51
Tableau N°25 : Les liaisons hydrogène établies par le composé 14 avec le site actif.....	54
Tableau N°26 : Résultat de la règle de Lipinski pour les deux inhibiteurs étudiés.....	56
Tableau N°27 : Les scores des meilleurs similaires du composé 14.....	57
Tableau N°28 :Les scores des meilleurs similaires du composé 36.....	57
Tableau N°29 :Les liaisons hydrogène établies par le composé A avec le site actif.....	58
Tableau N°30 :Les liaisons hydrogène établies par le composé E avec le site actif.....	60
Tableau N°31 : Résultats de la règle de Lipinski appliquée aux composés A et E.....	62

Liste des figures

Figure N°1 : Schéma montrant l'évolution de l'articulation, en passant d'un état normal vers un état Arthrosique.....	4
Figure N°2 : Organisation des domaines des MMP humaine.	10
Figure N°3 : Représentation du domaine catalytique archétype des MMP. Constitué de 3 hélices α (en rouge) et de cinq feuillets β (en jaune).....	11
Figure N°4 : Étapes typiques d'un docking.....	38
Figure N°5 : Docking protéine-ligand.....	39
Figure N°6 : Le model en négatif du site actif représenté par le protomol (coloré en vert).	43
Figure N°7 : Résultats en % des RMSD obtenues par Surfex.....	45
Figure N°8 : Superposition de la géométrie des trois ligands des complexes (5CUH 3KWF, 5F37) obtenus par rayon-X (colorés en jaune) et celles calculées par docking moléculaire avec Surfex (colorés en rouge)	46
Figure N°9 : Comparaison entre la géométrie des trois ligands des complexes (4PNZ, 3VJL, 5HDO) obtenus par rayon-X (colorés en jaune) et celles calculées par docking moléculaire avec Surfex (colorés en rouge).....	47
Figure N°10 : Courbe de corrélation entre l'activité biologique (pIC_{50}) de 66 inhibiteurs de la MMP-13 et leurs scores obtenus par Surfex.....	50
Figure N°11 : Structure du composé 36.....	51
Figure N°12 : Structure du composé 14.....	51
Figure N°13 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé 36 avec le site actif de la MMP-13.....	52

Liste des figures

Figure N°14 : Visualisation par VMD de l'emplacement du composé 36 (en orange) dans le site actif de la MMP-13.....	53
Figure N° 15 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé 14 avec le site actif de la MMP-13.....	55
Figure N°16 : Visualisation par VMD de l'emplacement du composé 14 (en jaune) dans le site actif de la MMP-13.....	55
Figure N°17 : Structure du composé A	58
Figure N°18 : Structure du composé E.....	58
Figure N°19 : Analyse visuelle par ViewerLite du mode d'interaction du composé A avec le site actif de la MMP-13.....	59
Figure N°20 : Visualisation par VMD de l'emplacement du composé A(en mauve) dans le site actif de la MMP-13.....	60
Figure N°21: Analyse visuelle par ViewerLite du mode d'interaction du composé E avec le site actif de la MMP-13.....	61
Figure N°22 : Visualisation par VMD de l'emplacement du composé E (en vert) dans le site actif de la MMP-13 par VMD.....	62

Liste des abréviations

Liste des abréviations

2D: Deux dimensions

3D: Trois dimensions

Å: Angström

AGE: Advanced Glycation and Products

COMPs: Cartilage Oligomeric Protein

IC₅₀: Concentration Inhibitrice₅₀

IGF-1: Le facteur de croissance 1 analogue à l'insuline

IL1-β: Interleukine 1 beta

IL6: Interleukine 6

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

Log P: Coefficient de partage octanol/eau.

MEC: Matrice Extracellulaire

MMP-13: Métalloproténase matricielle -13

MMPs: Métallo protéases Matricielle

NO: Monoxyde d'Azote

OSM: Oncostatine M

PDB: Protein Data Bank.

PM: Poids Moléculaire.

RMSD: Root Mean Square Deviation

TGF-β1: Facteur de croissance transformant beta1

TIMP: Inhibiteurs tissulaires métallo protéases

Liste des abréviations

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale alpha

VMD: Visual Molecular Dynamics

ZBG: Zinc-Binding Group

Introduction

Introduction

L'arthrose est une pathologie affectant l'articulation, notamment chez plus de 80% des personnes âgées de plus de 60 ans. Elle est la plus répandue dans le monde, causant un véritable problème de santé publique dans les pays industrialisés et sous-développés dû à l'obésité et au vieillissement, et aussi un problème économique à cause des dépenses pour les handicaps qu'elle génère [1]. Elle conduit à une diminution des « capacités actives », des handicaps moteurs, et l'usage excessif des « soins de santé » ainsi que la diminution d'aisance de vie.

L'arthrose se caractérise par la destruction du cartilage et un remodelage de l'os accompagnée par des symptômes douloureux et de rigidité. Cette maladie ne provoque pas seulement ces effets mais peut être la cause de l'augmentation de mortalité surtout l'arthrose de la hanche ou du genou chez les sujets qui présentant des maladies cardiovasculaires, diabète, cancer ainsi que « l'incapacité de marche » considérés comme des facteurs de risque [2].

En Algérie cette pathologie est très fréquente, ces symptômes peuvent se manifester le plus dès l'âge 40 à 45 ans. Le nombre des personnes atteint de l'arthrose à cet âge est estimé à trois millions [3].

Ceci démontre que cette pathologie présente un vrai problème de santé publique en Algérie d'où l'intérêt que suscite pour nous cette pathologie dans le présent travail.

D'après l'OMS « Organisation Mondiale de la Santé » et « l'American Academy of Orthopaedic Surgeons » en 1994 « L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral » [4], provoquant la destruction du cartilage et le remodelage de l'os qui aboutit à une modification de la structure et la fonction de l'articulation ceci est provoqué, au plan biochimiques par la synthèse de cytokines pro-inflammatoires qui modulent l'expression des métallo protéases matriciels (MMP) dont la MMP-13 qui est responsable de la destruction du constituant majeur du cartilage, le collagène 2 notamment [5]. Chez le sujet sain, cette synthèse est contrôlée par inhibiteurs naturels des MMP : les inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP) qui, dans le cas de l'arthrose s'avèrent inefficaces du fait de l'augmentation du taux des MMP-13 [6].

Introduction

L'inhibition de cette enzyme offre un moyen de s'opposer à l'évolution de l'arthrose évitant les complications de cette maladie déjà décrites.

Plusieurs traitements à base d'inhibiteurs de la MMP-13 ont été établis tels que les peptidomimétiques, l'hydroxamate, non- hydroxamate sulfonamide, ce pendant leur utilisation n'a pas connu un grand succès à cause de l'absence de sélectivité et des effets secondaires générés comme « le syndrome musculo-squelettique » [7].

C'est dans ce contexte que nous orientons notre travail vers la recherche de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de l'enzyme MMP-13 par une approche théorique faisant appel aux méthodes de modélisation des interactions ligand-protéine et d'évaluation des propriétés physico-chimiques.

La première partie de ce travail est consacrée à une analyse bibliographique se rapportant à l'arthrose.

La deuxième partie traite des métallo-protéases matriciels-13(MMP-13) et de leurs inhibiteurs.

La troisième partie décrit le docking moléculaire et ses applications.

Dans la quatrième partie on retrouve le Matériel et Méthodes.

La cinquième partie relate les résultats et discussion.

Une conclusion clôture le travail.

Chapitre 1 :

La pathologie de l'arthrose

1 - Physiopathologie de l'arthrose :

Selon l'OMS, (Organisation Mondiale de la Santé) et « l'American Academy of Orthopaedic Surgeons » en 1994 : « L'arthrose est la résultante des phénomènes mécaniques et biologiques qui déstabilisent l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage et de l'os sous-chondral. Ce déséquilibre peut être initié par de multiples facteurs : génétiques, de croissance, métaboliques et traumatiques. L'arthrose touche tous les tissus de l'articulation diarthrodiale et se manifeste par des modifications morphologiques, biochimiques, moléculaires et biomécaniques des cellules et de la matrice cartilagineuse conduisant à un ramollissement, une fissuration, une ulcération et une perte du cartilage articulaire, une sclérose de l'os sous-chondral avec production d'ostéophytes et de kystes sous-chondraux. Quand elle devient symptomatique, l'arthrose entraîne douleur et raideur articulaires, un éventuel épanchement articulaire avec des degrés variables d'inflammation locale. » [4].

1-1- L'articulation :

L'articulation est une jonction qui joint deux extrémités osseuses et leur assure une mobilité, chacune de ces extrémités est enveloppée par une couche mince constituée de minéraux et de matières organiques appelée cartilage articulaire jouant le rôle d'amortisseur de choc et de lubrification de l'articulation. Les tissus abondants dans l'articulation sont le cartilage et l'os sous-chondrale (voir la figure N° 1) [5].

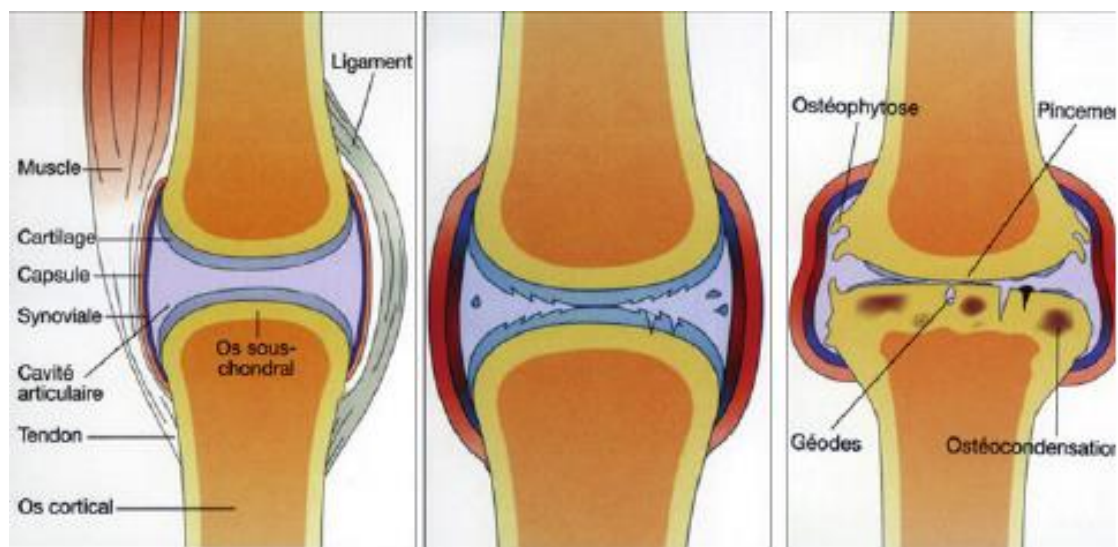
1-1-1- Le cartilage :

C'est un tissu conjonctif non vasculaire, non innervé assurant la protection de l'os sous-chondrale contre le stress traumatique et mécanique. Il est constitué d'un seul type de cellules : les chondrocytes (1% du volume), d'une matrice extracellulaire contenant de l'eau (70-80%), des fibres de collagène 2 (90-95%), collagène type 9 et 11, et de protéoglycanes ou « agrécanes » qui permettent au cartilage de jouer le rôle d'amortisseur de choc en favorisant son hydratation par attraction d'eau telle une « éponge » et en exerçant une pression oncotique. La matrice est renouvelée de façon stable mais très lente. Assurée par les chondrocytes qui ont une fonction anabolique et catabolique [1] [6]. D'autres constituants sont également présents comme l'acide Hyaluronique, et les COMPs (Cartilage Oligomeric Protein) [5].

1-1-2 Le cartilage arthrosique :

Le cartilage arthrosique va subir plusieurs étapes d'usure : ramollissement, fissuration superficielle et finalement une fissure profonde qui conduit à son amincissement ou sa disparition qui laisse apparaître l'os sous-chondrale.

La dégradation du collagène ainsi que la perte des protéoglycanes sont réparées par les chondrocytes qui synthétisent excessivement des fibronéctine et du fibrocartilage 1et 3 non fonctionnels. Ces changements sont à l'origine de la perte des propriétés du cartilage qui minimisent ces capacités de résistance au choc, un déséquilibre anabolisme /catabolisme vert se dernier va s'installer avec production des cytokines pro-inflammatoires et des protéases qui aggravent la lésion du cartilage, avec une inflammation synoviale, et une condensation sous – chondrale qui diminuent la résistance au choc avec formation d'ostéophytes qui se transforment en géodes intra-osseuse avec le temps [1].



Articulation normale

Arthrose débutante

Arthrose évoluée

Figure N°1 : Schéma montrant l'évolution de l'articulation, en passant d'un état normal vers un état Arthrosique.

2- Les facteurs favorables de l'arthrose :

2-1- L'âge :

Les chondrocytes âgés n'assurent plus leur rôle de réparation du cartilage avec l'accroissement de leur apoptoses induite par les radicaux libres causés par le stress mécanique [8]. Ainsi avec l'âge le cartilage est modifié par une « glycosilation spontanée » des protéines : AGE « advanced glycation and products », une diminution de la quantité d'eau et de la taille des protéoglycanes, tous ces modifications vont le fragiliser en perdant sa capacité de résistance aux agressions conduisant au développement de l'arthrose. Ces AGE activent la synthèse des enzymes de dégradation du cartilage à travers des récepteurs chondrocytaires [6].

2-2- Les facteurs génétiques :

Plusieurs études ont montré l'existence des mutations au niveau du gène du procollagène 2 dans quelques chondrodysplasies pendant l'arthrose [1].

2-3- Les facteurs mécaniques :

Plusieurs facteurs mécaniques sont responsables de l'apparition de l'arthrose ; surcharge pondérale (arthrose du genou et hanche), micro traumatismes itératifs chez les sportifs et les professionnels soumis à un risque ainsi qu'une pression déséquilibré exercé sur le cartilage [1]. Ce stress mécanique est à l'origine du changement dans la structure et la qualité de la matrice extracellulaire qui conduit à un comportement anormal des chondrocytes via des récepteurs ($\alpha 5\beta 1$: intégrines) [6], Ce qui aboutit à une diminution de l'anabolisme et augmentation du catabolisme [8].

3- Destruction du cartilage :

les chondrocytes sont les seules cellules assurant l'homéostasie entre le processus anabolique contrôlé par les facteurs de croissance (IGF-1) et (TGF- $\beta 1$) et le processus catabolique contrôlé par les cytokines pro inflammatoires (IL-1 β) et (TNF- α) qui stimulent la synthèse des MMP qui vont dégrader la matrice extracellulaire (MEC). Lors de l'arthrose un déséquilibre anabolisme/catabolisme en faveur de se dernier va s'installer avec accroissement de la synthèse des cytokines pro-inflammatoire ainsi que les facteurs cataboliques [5].

3-1- Facteurs cataboliques:

Plusieurs facteurs sont impliqués dans la réduction du collagène et agrécanes tels que les cytokines, les prostaglandines et les protéases (agrécanases, métalloprotéases) dont les synthèses sont essentiellement assurées par les chondrocytes, les synoviocytes ou les ostéoblastes de l'os sous-chondral [1]. Les protéases sont les premiers responsables de la destruction du cartilage et le remodelage de l'os lors de l'arthrose, ils sont synthétisés par les chondrocytes de façon non maîtrisables. Parmi ces protéases sont à citer les MMPs et essentiellement la MMP-13 qui agit sur la matrice du cartilage pendant l'arthrose [5].

3-1-1 Les métallo protéinases de la matrice (MMPs) :

Les MMPs sont des protéinases à zinc dépendant. Ils se divisent en plusieurs types selon leur substrat : les collagénases, les stromelysines et les gélatinases. Les collagénases qui sont actifs sur la triple hélice du collagène englobent les MMP-1, MMP-8 et MMP-13. Cette dernière est l'enzyme responsable de la dégradation du collagène 2 qui est le constituant essentiel du cartilage du fait de sa grande affinité pour ce dernier. Elle est également sécrétée par les ostéoblastes lors du remodelage de l'os pendant l'arthrose permettant la résorption ostéoclastique nécessitant la destruction du collagène à la surface osseuse [5]. La régulation de l'activité de cette enzyme est assurée par des inhibiteurs naturels « tissue inhibitory of MMP » (TIMP). Lors de l'arthrose la synthèse de ces inhibiteurs augmente en fonction de l'augmentation de la synthèse de la MMP-13 sans pour autant atténuer efficacement l'évolution de cette maladie [6].

3-1-2- Les facteurs inflammatoires :

Interleukine 1 beta (L'IL1-β) est considéré comme un médiateur principal de l'activité des enzymes, il est responsable de l'accroissement de la synthèse des MMP et bloquant la synthèse des inhibiteurs naturels des protéases. Il induit la synthèse des collagènes 1 et 3 et réduit celle du collagène 2. Le TNFα a un rôle synergique avec l'IL1-β, est responsable de la libération du monoxyde d'Azote (NO) (active les MMP, réprime de la synthèse de collagène 2, des agrécanes et induit l'apoptose des chondrocytes), et de la prostaglandine qui provoque l'angiogenèse et l'inflammation par la synthèse de MMP.

Chapitre 01 : La pathologie de l'arthrose

D'autres substances et cytokines pro inflammatoires sont également présentes mais leur rôle n'est pas encore déterminé (adipokines, L'IL6, Le LIF (leukemia inhibitory facteur), l'Oncostatine M (OSM), L'IL17, L'IL18, et l'IL8 [1]).

4- Le traitement pharmacologique de l'arthrose

4-1-Paracétamol :

Un antalgique utilisé pour diminuer la douleur [9].

4-2- Les antalgiques palier 2

Les antalgiques comme la Codéine et Tramadol sont utilisés à la place du paracétamol lorsque ce dernier n'arrive pas à diminuer la douleur [10].

4-3-Les anti- inflammatoires non stéroïdiens (AINS) :

Ils sont utilisés lorsque le paracétamol est insuffisant pendant les poussées inflammatoires mais à des doses minimales. Leur utilisation est restreinte à cause des effets indésirables (ulcère gastro-duodéal) et l'interaction avec d'autres médicaments surtout chez les sujets âgés, Parmi les AINS sont à citer le Diclofenac et le Kétoprofène [9] [10].

4-4-Les médicaments anti arthrosiques symptomatiques d'action lente (AASAL) :

Ces médicaments sont connus comme « traitement de fond de l'arthrose » malgré que leur effet contre l'évolution de la maladie n'a pas été remarquable .Il existe plusieurs compositions : la diacéine (art 50®), à base d'insaponifiable d'avocat et de soja (Piasclédine®), le chondroïtine sulfate (strunctum ®, chondrosulf®), et la glucosamine sulfate [10].

4-5- Les corticoïdes :

Sous forme d'injection locale, les plus utilisés sont: la béthamétasone (Diprostene®), l'acétonide de triamcinolone (Kenacort®), le cortivasol (Altim®), et l'hexacétonide de triamcinolone (Hexatrione®) [10]. L'injection intra- articulaire de l'acide hyaluronique est également utilisée: Synvisc®, Adant®, Sinovial®, Arthrum®, Viscornéal® [11].

4-6-Traitement « chondro- restaurateurs » :

Conçus pour régénérer le cartilage, ils sont encore à l'état expérimental [11].

4-7-La chirurgie :

La chirurgie est utilisée comme un moyen de prévention pour une articulation anormale capable de développer une arthrose ou un moyen drastique lors d'une arthrose qui a progressé menant à un handicap[9].

Chapitre 2:

La Métalloprotéinase matricielle-13

Les métalloprotéases matricielles (MMP) forment une grande catégorie d'endopeptidases à zinc dépendantes du calcium. Leur rôle est la reconstitution des tissus ainsi que la destruction des constituants de la matrice extracellulaire (MEC) tels que les collagènes, les élastines, la gélatine, et protéoglycanes. Chez l'homme il existe plus de 20 métalloprotéases numérotées de 1 à 28, qui sont classés en: matrilysines, gélatinases, stromelysines, MMP membranaires (MT-MMP) et collagénases [12] [13].

1-La métalloprotéinase -13(collagénase-3) :

La première découverte de l'enzyme humaine MMP-13 a été faite par Freij et al en 1994 à partir d'un cancer. Sa forme structurale est la même que celle des collagénases (MMP-1 et MMP-8). Nommé collagénase-3 ou troisième enzyme des collagénases et également MMP-13 d'après la nomenclature. La synthèse de cette enzyme par les chondrocytes du cartilage humain a été découverte par Rebol et al en (1996) et Mitchell et al en (1996). Elle est régulée et modulée par les cytokines pro inflammatoires L'IL1- β et TNF- α dans l'arthrose [14].

1-1- Structure de la métalloprotéase-13:

La MMP-13 est synthétisée sous forme inactive « proenzyme » renfermant 471 acides aminés. Elle est constituée de plusieurs domaines (voir figure N°2) : un signal peptide hydrophobe, un domaine pro peptide, un domaine catalytique, un domaine « hemopoxine-like », et une région charnière « hinge region » [7] [14].

Enzyme	MMP	Organisation en domaines
Matrilysine	MMP-7	A
Endométhase	MMP-26	A
Collagénase 1	MMP-1	B
Stromélysine 1	MMP-3	B
Collagénase 2	MMP-0	D
Stromélysine 2	MMP-10	B
Métalloélastase	MMP-12	B
Collagénase 3	MMP-13	B
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-19	B
Enomélysine	MMP-20	B
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-27	B
Gélatinase A	MMP-2	C
Gélatinase B	MMP-9	C
Stromélysine 3	MMP-11	D
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-21	D
Epilyse	MMP-28	D
MT1-MMP	MMP-14	E
MT2-MMP	MMP-15	E
MT3-MMP	MMP-16	E
MT5-MMP	MMP-24	E
MT4-MMP	MMP-17	E'
MT6-MMP	MMP-25	E'
<i>pas de nom usuel</i>	MMP-23	F

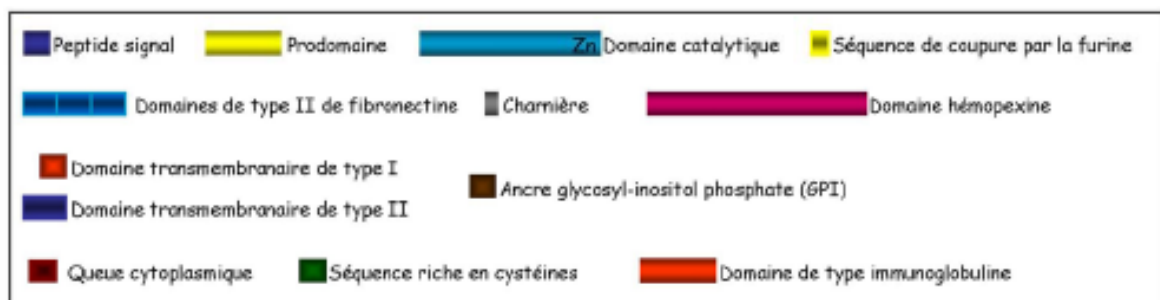


Figure N°2 : Organisation des domaines des MMP humaine.

1-1-1-Le peptide signal :

Ce peptide signal est nécessaire pour orienter le polypeptide après la synthèse vers les voies de sécrétion, c'est une région hydrophobe constitué de 19 résidus [15].

1-1-2- Le pro domaine :

Ce domaine contient 87 acides aminés, il assure la forme inactive de la pro MMP par le résidu cystéine du « cysteine switch » (décrit en 1990 par Van Wart et Birkedal-Hansen) qui interagit avec l'atome de zinc du site catalytique par son atome de soufre bloquant ainsi le site actif. Ce résidu cystéine fait partie d'une séquence PRCG (V/N) PD conservé dans la plupart des MMP (la séquence concernant la MMP-13 est :PRCGVPD) [15][16]. Le déclenchement de l'activation de la pro MMP est assuré par la disparition de ce domaine [17].

1-1-3-Le domaine catalytique :

Ce domaine est formé de 161 acides aminés [15], constitué de 5 feuilles β et 3 hélices α ainsi que des boucles de raccordement. Il possède deux ions de zinc l'un situé dans le site actif et l'autre dans la structure, en plus des ions calcium qui sont essentiels pour la stabilisation de la structure du domaine. Ce dernier renferme un motif associé à la méthionine qui forme une structure appelée boucle de la méthionine [17], le motif contient trois histidines liées au zinc nécessaire pour l'hydrolyse du substrat, est hautement conservé chez d'autres MMP sauf la région de la boucle S1' qui réside entre les résidus 244-255 qui diffèrent en taille et en nature, ce qui a permis la recherche d'inhibiteurs sélectifs en ciblant [7](voir figure N°3).

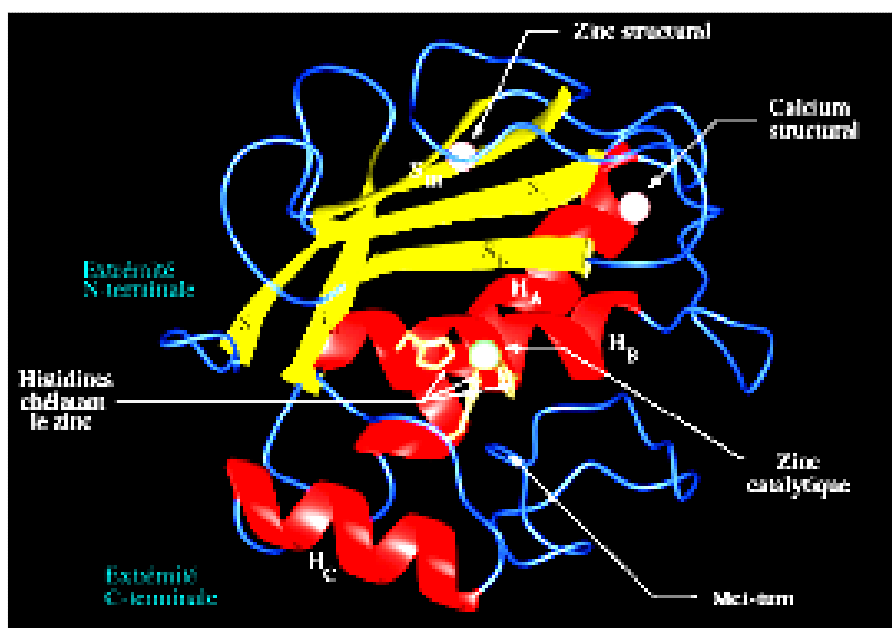


Figure N° 3 : Représentation du domaine catalytique archétype des MMP. Constitué de 3 hélices α (en rouge) et de cinq feuillets β (en jaune).

1-1-4 -La charnière :

C'est une séquence qui relie le domaine catalytique et le domaine haémopexine (c-terminal) [15], pour stabiliser l'enzyme et favoriser la dégradation du substrat [16].

1-1-5- Le domaine type haémopexine :

C'est un domaine qui comprend 204 acides aminés, il a la forme d'un disque ellipsoïdale, ressemblant à la famille des haémopexine, formé d'une hélice de quatre domaines chacun contient quatre brins β antiparallèles et une hélice α [15]. Il a un rôle dans la reconnaissance et le positionnement du substrat [16].

1-2- Les substrats de la MMP-13 :

Le substrat spécifique de la MMP-13 est le collagène type II, constituant principal du cartilage. Cette enzyme a une capacité de dégradation du collagène 2 à 10 fois plus que la MMP-1 et 5 fois moins efficace sur le collagène I et III. Outre le collagène type II la MMP-13 peut dégrader d'autres constituants de la matrice extracellulaire (MEC) tels que les collagènes types IV, IX, X, et XIV, la gélatine, la fibronéctine, et l'aggrécane [14].

1-3-Activation et inhibition de la MMP-13 :

La MMP-13 est synthétisée sous forme inactive (proenzyme), son activation se fait soit par auto-protéolyse, soit par clivage protéolytique du prodomaine latent. Dans l'organisme les enzymes capables d'activer la pro MMP-13 sont : les MMP-2(gélatinases), les MMP-14(MT1-MMP) et la MMP-3 .Le domaine haemopexine-like (c-terminal) est nécessaire pour l'activation du MMP-13.La MMP-13 active est inhibée par l' α 2 macroglobuline (protéine sécrétée par le foie et présente dans le sérum et le liquide synoviale), et par des inhibiteurs tissulaires métalloproteases (TIMP) de façon stœchiométrique (TIMP-1, TIMP-2, et TIMP-3) [14] [18]. .

En plus de sa liaison au TIMP pour son inhibition, la MMP-13 peut se lier à des récepteurs spécifiques situés sur les ostéoblastes et les fibroblastes. Elle a un rôle important dans la croissance et la reconstitution osseuse mais son expression est limitée pendant ce processus ainsi que dans l'âge adulte [18].

Dans les situations normales la MMP13 n'est pas exprimée dans la plupart des tissus adultes humains. Son hyper expression est lié à plusieurs pathologies tels que l'arthrite, l'arthrose, les maladies dégénératives et le cancer [16].

Chapitre 02:La métalloprotéinase matricielle-13

L'inhibition de cette enzyme est un procédé thérapeutique prometteur qui ouvre la voie de la recherche d'inhibiteurs sélectifs de la MMP-13 en épargnant les autres MMP [14].

La mise en évidence de plusieurs inhibiteurs de la MMP-13 a été établie. On peut citer les peptidomimétiques, l'hydroxamate, le non-hydroxamate dont l'utilisation en tant que traitement de l'arthrose n'a pas été efficace à cause de l'absence de sélectivité ainsi que des effets secondaires qu'ils induisent comme l'effet douloureux avec raidissement appelé le syndrome musculo-squelettique [7].

Chapitre 3 :

Les inhibiteurs de la MMP-13

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

L'expression des MMP-13 par les chondrocytes dans le cartilage ostéoarthritique humain et son activité de dégradation du collagène de type II (le principal élément structural du cartilage articulaire), suggèrent que cette enzyme joue un rôle essentiel dans l'étiologie de l'arthrose, donc l'inhibition de MMP-13 peut fournir un paradigme de traitement efficace de cette maladie.

L'enzyme MMP-13 peut alors être considérée comme une cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouveaux médicaments à base d'inhibiteurs sélectifs et plus efficaces [19].

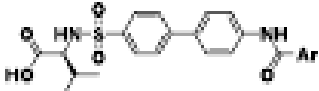
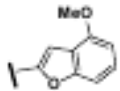
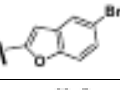

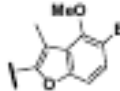

La quasi-totalité des inhibiteurs de la MMP-13 connus à ce jour sont basés soit sur leur liaison au zinc (ZBG) ou à la cavité S1' hydrophobe de l'enzyme [20].

1-Les inhibiteurs avec un groupe de liaison au zinc (ZBG) :

Ce type d'inhibiteurs possède un groupement chélateur de zinc qui va se lier au zinc du site actif de l'enzyme [15].

On retrouve plusieurs familles structurales (voir tableau 1 à 11).

Tableau N° 1 : Les acides carboxyliques phényl sulfonamide [19].

Structure	Radical		IC ₅₀
	Ar		
			2,3nM
			0,61nM
			0,4nM
			2,3nM
			9,5nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13


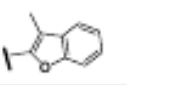
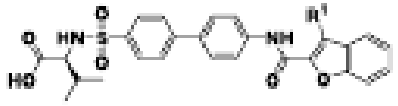

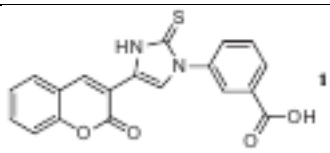
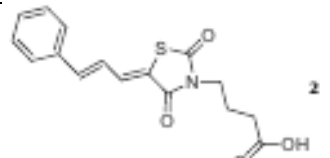
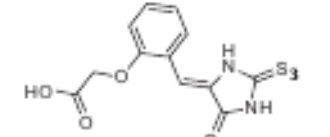
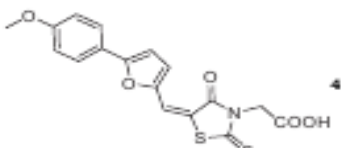
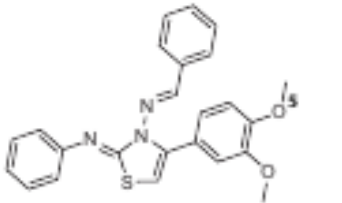
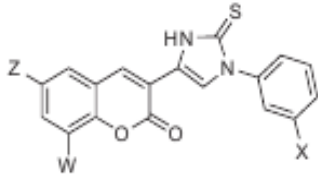
			3,0nM
			5,9nM
	R ⁷		
	H		2,4nM
	CH ₃		5,9nM
	CH ₂ -CH ₃		55nM
	Ph		220nM
	R ₂	R ₃	
4	OMe	Br	2,3nM
13	OMe	I	2,1nM
14	OMe	Cl	1,9nM
15	OMe	CH ₂ OH	7,8nM
16	OMe	Me	4,9nM
17	OMe	CN	3,0nM
18	OMe	Et	3,8nM
19	OH	COMe	3,2nM
20	OH	Et	7,1nM
21	OCH ₂ Ph	Et	67nM
22	O(i-Pr)	ET	27nM

Tableau N°2: structure des inhibiteurs (N-isopropoxy-arylsulfonamide-based hydroxamate) des MMP-13 avec différents radicaux [20] .

Structure	Radical	IC ₅₀
		14μM
		22μM
		67μM

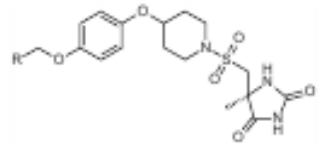
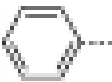
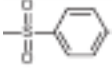
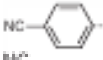



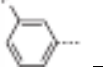






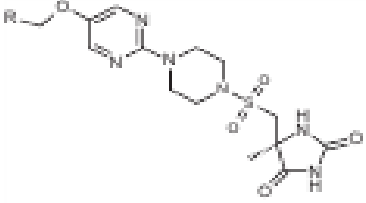
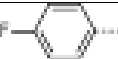

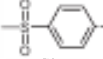

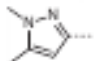
Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

		120 μ M
		140 μ M
	W=H Z=H X=COOH	14+/-1,4 μ M
1a	W=H Z=H X=H	177+/-14 μ M
1c	W=OCH3 Z=H X=COOH	5,2+/-1,1 μ M
1d	W=H Z=OCH3 X=COOH	3,2+/-0,2 μ M
1e	W=OH Z=H X=COOH	5,5+/-1,1 μ M
1f	W=H Z=Cl X=COOH	2,6+/-0,6 μ M
1g	W=OCH3 Z=Cl X=COOH	4,9+/-0,6 μ M
1h	W=OCH3 Z=CH2CH=CH 2 X=COOH	4,9+/-0,8 μ M

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

Tableau N°3: inhibiteur de MMP-13

Dans ce type d'inhibiteurs les chercheurs ont changé le groupement hydroxamate des inhibiteurs historique par un groupe de liaisons Hydantoïne du zinc [21].

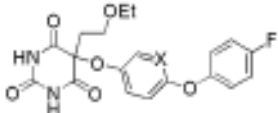
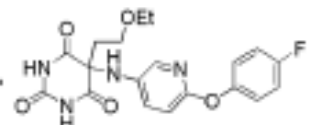
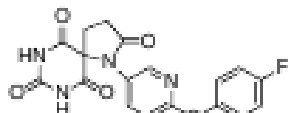

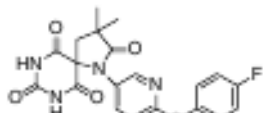
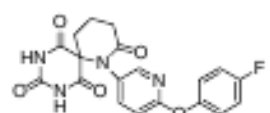
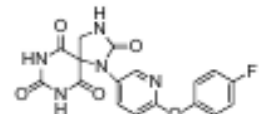
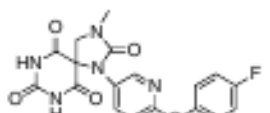
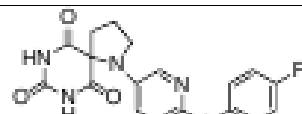
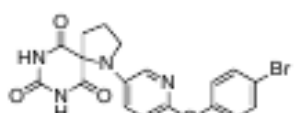
Structure	Radical	IC ₅₀
	 4a	1,4nM
		1,4nM
		0,69nM
		1,8nM
		2,7nM
		3,6nM
		0,88nM
		1,9nM
		2,9nM
		4,7nM
		5,3nM
		1,6nM
		0,82nM
		
		14nM
		3,3nM
		13,8nM
		544,6nM
		1080nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

5f		73297329nM
5g		47,3nM
5h		31,5nM
5i		17,7nM
5j		2,8nM
5k		3,8nM
5l		5,1nM
5m		8,3
3a	CF3	21nM
3b	Cl	11,5nM
3c	2,4-DI-Cl	6980nM
3d	F	28,9nM
3e	OET	18,2nM
3f	OCF3	59,1nM
3g	OSO2Me	53,8nM
3h	OCH2-CF3	8,5nM
3i	3-OCH2-CF3	1617nM
3j	OCH2-CH2-CF3	5,4nM
3k	OCH2-CF2-CF3	2,6nM
3l	OCH2-CH2-CHF2	1,2nM
3m	OCF2-CHF2	4,7nM
3n	OCF2-CF3	9,8nM
3o	On-Pr	71,2nM
3p	CH2OMe	178nM
3q	CH2-SO2-Me	1051nM
3r	CH2-4-pyridyl	8445nM

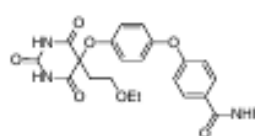
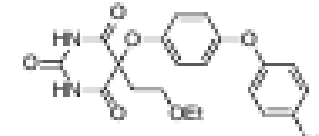







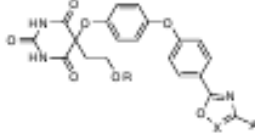
Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

Tableau N°4 : Spirocycliques linkers inhibiteur du MMP-13[22].

Structure	Radical	IC ₅₀
		
1	X=C	0,6nM
2	X=N	8,9nM
		2,9nM
3		
		3,49nM
4		
		138nM
5		
		7,33nM
6		
		11,7nM
7		
		15,1nM
8		
		12nM
9		
		1,57nM
10a		
		0,6nM
10b		

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

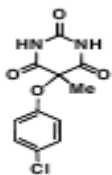
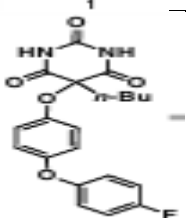
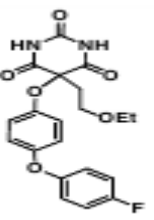
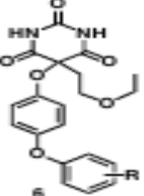
Tableau N° 5 : Les inhibiteurs de MMP-13 à base de pyrimidinetrione [23].

Structure	Radical			IC ₅₀
	R	X	Ar	
	R			
	-Ph			0,84nM
	-CH ₂ Ph			8,0nM
	-CH ₂ -(2-F-Ph)			1,1nM
	-CH ₂ -(3-F-Ph)			0,85nM
	-CH ₂ -(4-F-Ph)			3,4nM
	-2-pyridyl			3,9nM
	-3-Pyridyl			0,4nM
	-CH ₂ -(2-Pyridyl)			6,1nM
	-CH ₂ -(3-Pyridyl)			2,6nM
	R			
				1,7nM
				2,4nM
				3,4nM
				1,6nM
				7,5nM
				12nM
				15nM
	R	X	Ar	
18	Et	N	2-F-Ph	3,3nM
19	Et	N	3-F-Ph	7,8nM
20	Et	N	4-F-Ph	6,1nM
21	Et	N	2-Pyridyl	1,0nM
22	Et	N	3-Pyridyl	2,0nM
23	Et	N	4-Pyridyl	0,54nM
24	Me	CH	2-F-Ph	1,4nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

25	Et	CH	2-F-Ph	0,93nM
26	Me	CH	3-F-Ph	0,46nM
27	Et	CH	3-F-Ph	0,36nM
28	Me	CH	4-F-Ph	0,57nM
29	Et	CH	4-F-Ph	0,68nM
30	Me	CH	2-CN-Ph	0,73nM
31	Et	CH	2-CN-Ph	0,88nM
32	Me	CH	3-CN-Ph	0,63nM
33	Et	CH	3-CN-Ph	0,53nM
34	Me	CH	4-CN-Ph	0,36nM
35	Et	CH	4-CN-Ph	0,45nM
36	Et	CH	2-Pyridyl	1,0nM
37	Et	CH	3-Pyridyl	0,34nM
38	Et	CH	4-Pyridyl	0,40nM

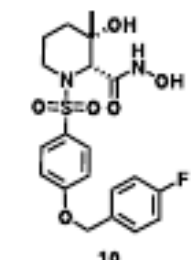
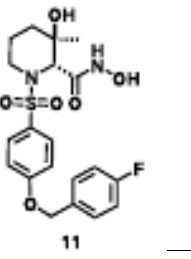
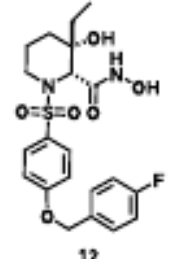
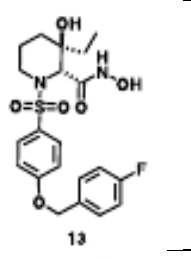
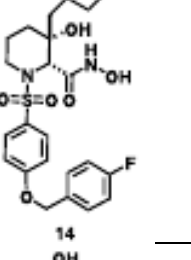
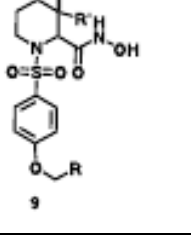
Tableau N°6 : Les puissants inhibiteurs de MMP-13 à base de pyrimidinetrione[24].

Structure	Radical	IC ₅₀
		390nM
		2,0nM
		0,87nM
	R	
3	4-Fluoro	0,87nM
7	3-fluoro	9,2nM
8	2-Fluoro	3,1nM
9	4-Chloro	1,4nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

10	3-Chloro	53nM
11	2-Chloro	150nM
12	4-Methyl	2,1nM
13	3-Methyl	19nM
14	2-Methyl	3,1nM
15	4-Bromo	0,87nM
16	4-Trifluoromethyl	5,0nM
17	4-tert-Butyl	190nM
18	4-Ph	1,7nM
19	4-Methoxy	28nM
20	4-Methanesulfonyl	140nM
21	4-Cyano	5,9nM
22	4-H2NCO-	19nM
23	4-MeNHCO-	6,0nM
24	4-Me2NCO-	56nM
		1,4nM
		18nM
		0,54nM
		1,0nM
		3,1nM
		3,6nM
		3,1nM
		0,95nM
		3,8nM
		4,1nM
		0,61nM
		3,9nM
		15nM
		8,0nM

Tableau N° 7 : Hydroxamates pipécolique 3OH 3-méthyl [25].

Structure	Radical		IC ₅₀
 <p>10</p>			6,5nM
 <p>11</p>			3,7nM
 <p>12</p>			3,6nM
 <p>13</p>			1,6nM
 <p>14</p>			4,9nM
 <p>9</p>	R	R'=(3R)Me	
15	2-Fluorophenyl	R'=(3R)Me	0,49nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

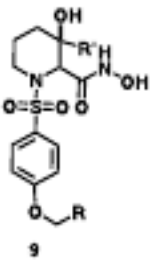
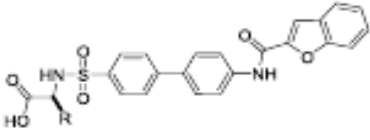
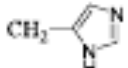
16	3-Fluorophenyl	R'=(3R)Me	1,5nM
17	4-Fluorophenyl	R'=(3R)Me	3,7nM
18	2-Chlorophenyl	R'=(3R)Me	1,0nM
19	3-Chlorophenyl	R'=(3R)Me	2,5nM
20	2-Methylphenyl	R'=(3R)Me	0,65nM
21	2-Methoxyphenyl	R'=(3R)Me	18nM
22	2-Cyanophenyl		9,7nM
23	2-Methyl-3-fluorophenyl	R'=(3R)Me	3,2nM
24	2-Methyl-4-fluorophenyl	R'=(3R)Me	2,9nM
25	2-Methyl-5-fluorophenyl	R'=(3R)Me	2,5nM
26	2-Chloro-4-fluorophenyl	R'=(3R)Me	0,9nM
27	2-Fluoro-4Chlorophenyl	R'=(3R)Me	0,87nM
	R	R'=(3R)Me	
	Pirydin-4-yl	R'=(3R)Me	2nM
	Pirazynyl	R'=(3R)Me	7,4nM
	4-isoquinolinyl	R'=(3R)Me	18nM
	4-quinolinyl	R'=(3R)Me	4,1nM
	2-Chloro-pirydinyl	R'=(3R)Me	0,43nM
	2-Meyhyl-3pyridinyl		1,5nM

Tableau N°8 : Des puissants inhibiteurs de MMP-13 [26].

Structure	Radical	IC ₅₀
		
	H	22nM
	isobutyl	1,3nM
	CH ₂ CONH ₂	2,53nM
	isobutyl	2,19nM
	CH ₂ CH	4,5nM
		8,1nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

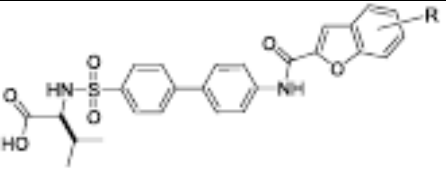
		
2	H	1,3nM
11	7-OMe	20,2nM
12	5-cl	0,6nM
13	5-OMe	0,66nM
14	5-NO2	0,7nM
15	5-NH2	1,5nM
16	5-NHCOCH3	0,98nM
17	5-NHSO2CH3	0,43nM
18	5-NHSO2Ph	3,4nM
19	4-OMe	2,33nM
20	4-OBn	3,45nM
21	4-OCH(CH3)CO2H	14,9nM

Tableau N°9 : Phényl sulfamides carboxylate MMP-13 inhibiteurs [27].

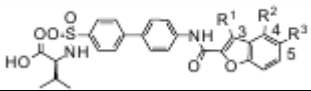
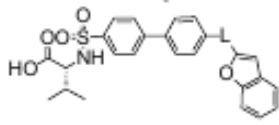


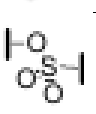

Structure	Radical			IC ₅₀
	R1	R2	R3	
				
	H	H	H	2,4nM
	Me	OMe	Br	2,3nM

Tableau N°10 : Les inhibiteurs obtenus après modification de liaison amide [27].

Structure		IC ₅₀
		
3		2,8nM
4		467nM
5		2,0nM
6		1,1nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13







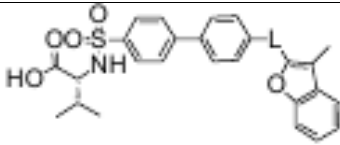



7		1,2nM
8		0,5nM
9		1,1nM
10		1230nM
11		242nM
12		329nM

Tableau N° 11 : Les inhibiteurs dérivés de benzofuranne en C3-méthylé [27].

Structure	Radical	IC ₅₀
	L	
13		17nM
14		1,2nM
15		3,9nM

2-Les inhibiteurs sélectifs de la MMP-13 sans groupe de liaison au zinc:

Dans ce type d'inhibition l'atome de zinc n'est pas impliqué dans l'interaction avec l'inhibiteur, où se dernier va se lier à la cavité S1' de l'enzyme. La littérature a décrit plusieurs types d'inhibiteurs (tableau 12 à 21).

L'interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur va provoquer un changement de conformation de la boucle S1' de l'enzyme, ainsi que La sélectivité de ces inhibiteurs est due a la présence d'un résidu glycine dans la boucle S1' de l'enzyme lui permettant de prendre une conformation particulière favorisant la liaison de l'inhibiteur, ce résidu est absent chez les autre MMP se qui explique la selectivité de ce type d'inhibiteurs envers la MMP-13 [15].


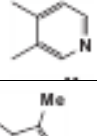
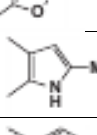
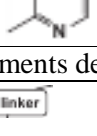

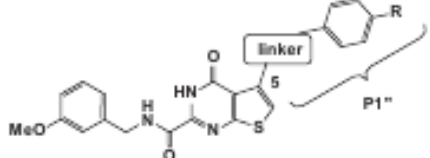









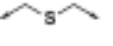





Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

Notre travail s'inscrit dans la même démarche à savoir la recherche d'inhibiteurs sélectifs pour l'enzyme MMP-13.

Tableau N°12: Thiéno [2,3-d] pyrimidine-2-carboxamides portant un carboxybenzène groupe en position 5: Très puissant, sélectif, et disponible par voie orale [28].

Structure	Radicaux		IC ₅₀	
effet de la variation du segment de liaison à l'intérieur de la 3,4-dihydroquinazolin-4-one				
	Linker	R1	R2	
		H	H	12+/- 1,5nM
		Me	H	29+/- 3,4nM
		H	Me	26+/- 3,1nM
		H	Me	220+/- 25nM
Les différents dérivés				
	A			
				1,1+/- 0,043nM
				1,2+/- 0,069nM
				3,1+/- 0,29nM
				12+/- 1,6nM
				14+/- 2,2nM
				16+/- 2,1nM
				24+/- 3,7nM
				29+/- 5,2nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

			65+/-10nM
			200+/-38nM
			760+/-95nM
			1,100+/-220nM
			3,2+/-300nM
Un dérivé avec plusieurs segments de liaison « linkers »			
		R	
26a		H	0,19+/-0,021nM
26d		F	0,13+/-0,016nM
26c		CH2OH	0,032+/-0,031nM
26d		CH2OMe	0,080+/-0,0063nM
26e		CN	0,018+/-0,0032nM
26a		CONH2	0,015+/-0,0013nM
26b		CONHMe	0,029+/-0,0012nM
26c		COOH	0,0069+/-0,00078nM
26d		H	0,66+/-0,075nM
26f		H	39+/-8,3nM
32a		H	0,028+/-0,0033nm
32c		COOH	0,005+/-0,0006nM
29a		H	0,018+/-0,0038nM
29c		COOH	0,0022+/-0,00073nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

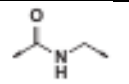
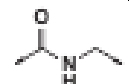


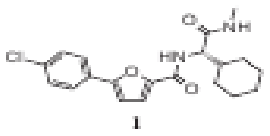
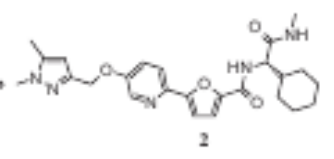
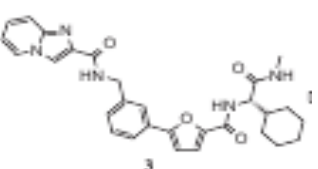
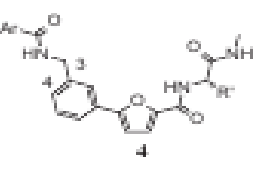
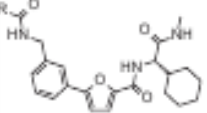


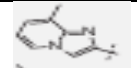




















35a		H	0,026+/- 0,0022nM
35c		COOH	0,0077+/- 0,00095nM
41		H	0,053+/- 0,0075nM
38		COOH	0,021+/- 0,0018nM

Tableau N° 13 : Structure des inhibiteurs sélectifs du MMP-13 avec des différents radicaux [29].

Structure	Radical		IC ₅₀
 1			430nM
 2			4nM
 3			100nM
 4			5nM
 5			
3			100nM
5			3300nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

6			110nM
7			140nM
8			75nM
9			11nM
10			180nM
11			330nM
12			310nM
13			24nM
14			72nM
15			14nM
16			8nM
17			8nM
18			42nM
19			31nM
20			10nM
21			4nM
22			9nM
23			100nM
24			29nM
25			27nM
26			3nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

27			7nM
	R	R'	
22			9nM
28			6nM
29			28nM
30			2nM
31			25nM
27			7nM
32			9nM
33			36nM
34			2nM
35			5nM

Tableau N° 14 : Structure des inhibiteurs sélectifs du MMP-13 avec des différents radicaux [30].

Structure	Radical		IC ₅₀
	Ar		
1			430nM
2			620nM
5			63nM
6			57nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

7			31nM
8			180nM
9			88nM
10			17nM
	R	X	
1	cl	CH	430nM
12	cl	N	245nM
13	MeC(=o)NH-	CH	1550nM
14	MeNHC(=o)-	CH	6000nM
15	MeSO ₂ NH-	CH	460nM
16	MeNHSO ₂ -	CH	480nM
17	H ₃ C-	CH	290nM
19	MeO-	CH	220nM
20	EtO-	N	32nM
	R		
20			32nM
24			6nM
25			40nM
26			6nM
27			25nM
28			2nM
29			4nM

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

Tableau N° 15 : Structure des amides (inhibiteurs sélectifs des MMP-13) avec différents radicaux [31].

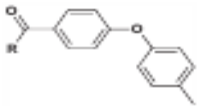

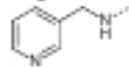

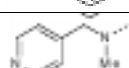



Structure	Radical	pIC ₅₀
	R	
3		5
4		4,6
6		4,6
7		4,3
9		4,3
10		4,5
12		4,6

Tableau N° 16 : Structure des Phenoxyphenyl SAR (inhibiteurs sélectifs des MMP-13) avec différents radicaux [31].

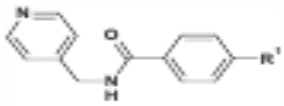


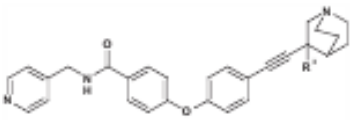
Structure	Radical	pIC ₅₀
	R'	
14	OPh	4,6
15	Ph	4,4
18		4,7
21		5,3

Tableau N° 17 : Structure d'autres inhibiteurs sélectifs du MMP-13 avec des radicaux différents [31].

Structure	Radical	pIC ₅₀
		
23	(R/S)-OH	9,6
24	(S)-OH	7,1

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

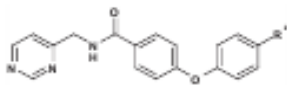

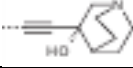

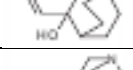

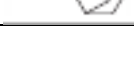

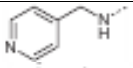
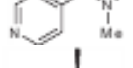
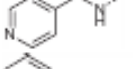
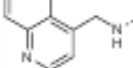
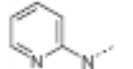
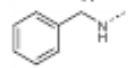
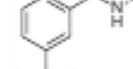
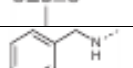
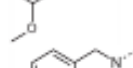
25	(R)-OH R''	6,5
		
26		7
27		6,4
28		5,6
29		6,6
30		5,5
31		6,3

Tableau N°18: Structure des analogues amides avec différents radicaux [32].

Structure	Radical	pIC ₅₀
		
2a		7,1
2b		6,6
2C		7,9
2D		7,7
2E		6,5
2F		7,2
2g		7,5
2h		7,1
2i		7,2

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

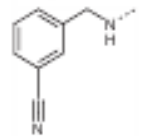
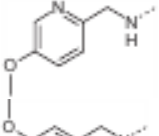
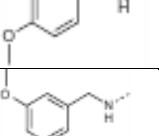
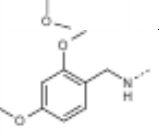
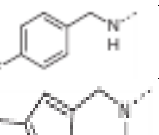
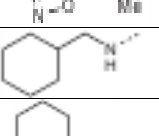
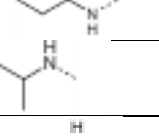
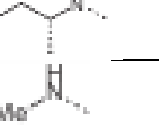
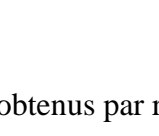
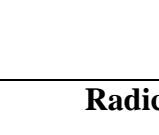

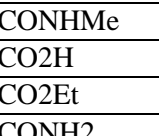
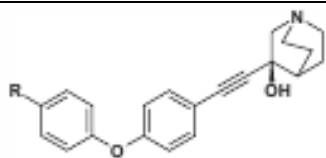
2j		7,2
2k		7,5
2l		8,0
2m		7,3
2n		7,4
2o		7,0
2p		7,1
2q		7,0
2r		7,6
2s		7,0
2t		7,3
2u		6,7

Tableau N° 19 : Structure des inhibiteurs obtenus par remplacement Amides du composé 2u [32].

Structure	Radical	pIC ₅₀
		
	CONHMe	6,7
	CO2H	5,3
	CO2Et	6,0
	CONH2	6,2
	CONMe2	5,8
	CONHOMe	5,6

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

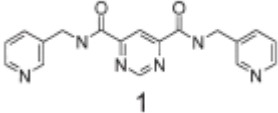
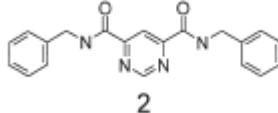
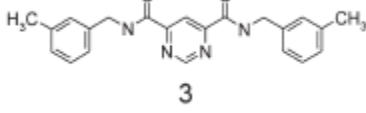
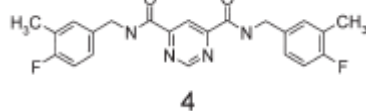
	NHSO ₂ Me	5,6
	SOMe	6,4
	SO ₂ Me	6,5
	SO ₂ NHMe	7,0

Tableau N°20 : Structure des analogues hydrophiles saturés du composé 2r [32].

Structure	Radical	pIC ₅₀
14		7,1
15		7,3
16		7,4
17		7,6
18		7,3
19		7,1
20		7,0
21		7,4
22		8,0
23		7,1

Chapitre 03 : Les inhibiteurs de la MMP-13

Tableau N°21 : Inhibiteurs Selectifs De Mmp-13 Pyrimidine Dicarboxamides [33].

Structure	IC ₅₀
 1	6600nM
 2	400nM
 3	72nM
 4	8nM

Chapitre 4:

Docking Moléculaire

1-Docking moléculaire :

La modélisation de la structure d'un complexe protéine-ligand est très importante pour la compréhension des interactions entre un ligand et sa protéine, et donc la conception de nouveaux médicaments.

Les ligands sont de petites molécules destinées à inhiber l'activité d'une protéine, qui est dans le cas du présent travail, une enzyme.

Le docking est un procédé très utile qui étudie l'interaction potentiel de la structure d'un complexe moléculaire en tenant compte des interactions potentielles qui établissent la petite molécule dans le site de liaison de protéine [34].

Le docking permet de déterminer les modes de liaison ou les conformations possibles d'un ligand à un récepteur et de calculer l'énergie de liaison ou l'énergie du complexe permettant de donner une estimation sur l'affinité de liaison entre deux molécules, ceci a pour but de déterminer quel ligand candidat interagira le mieux avec une protéine cible donnée [35].

La figure si dessous montre les différentes étapes du docking moléculaire.

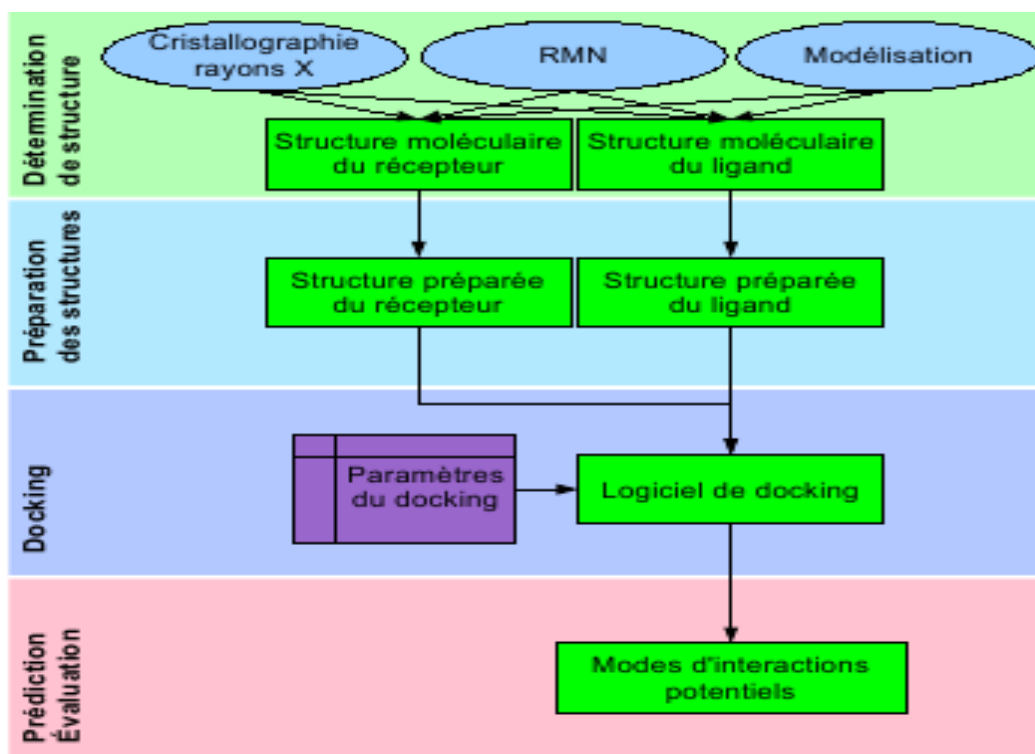


Figure N°4 : Étapes typiques d'un docking.

Chapitre 04: Le docking moléculaire

Dans notre travail nous allons utiliser le programme Surflex version 1.3(2005) pour réaliser le docking moléculaire, ce programme est un algorithme de docking rapide capable d'aligner les ligands dans un environnement constitué d'acides aminés avec une bonne précision.

Pour réaliser le docking en utilisant ce logiciel, il faut suivre 3étapes:

- Déterminer la manière d'identifier le site actif soit à partir d'un ligand soit à partir du récepteur.
- Construire une pseudo-molécule (protomol) qui va être la cible de différents ligands.
- Réalisation du docking d'un ou de plusieurs ligands.

Le résultat obtenu est sous la forme de 10 meilleures conformations représentées par des scores.

Classiquement, on juge la qualité du docking en mesurant le RMSD (*Root Mean Square Deviation*) sur les atomes entre la pose obtenue en docking, et la pose observée expérimentalement si elle existe [36].

Dans notre travail le coefficient de corrélation linéaire sera l'autre critère dont on tiendra compte pour juger de la fiabilité du programme utilisé.

L'image ci-dessous montre un exemple d'une étude par docking moléculaire d'une enzyme et d'un inhibiteur [34].

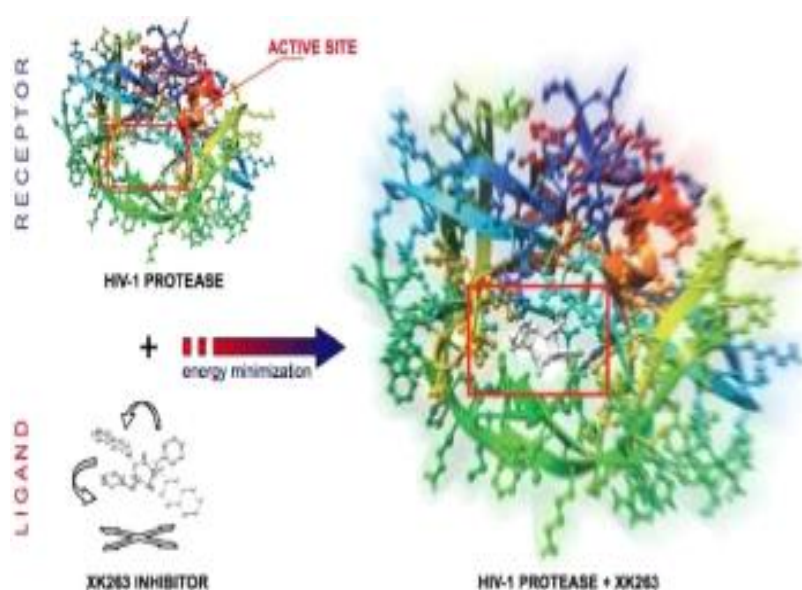


Figure N°5 : Docking protéine-ligand.

Chapitre 5:

Matériel et Méthodes

1-Matériel :

1-1-Micro-ordinateur :

Dans notre étude nous avons utilisé un micro-ordinateur avec une mémoire de 3GB, un processeur (intel(R)core (TM)2Duo CPU 2.10GHZ) et un système d'exploitation windows7 version 2009.

1-2- logiciels (programmes) :

Nous avons fait appel à plusieurs programmes pour réaliser le présent travail.

Pour le docking moléculaire nous avons utilisé le programme surflex version 1.3 (2005). Le deuxième logiciel utilisé est « Titan » qui nous a permis de construire la structure tridimensionnelle des ligands (inhibiteurs) obtenus à partir de la littérature et sauvegardés sous format pdb après avoir minimisé leur énergie intramoléculaire. Nous avons utilisé un troisième programme qui est le VMD (Visual Molecular Dynamics) version 1.9.1 (2012) permettant de visualiser la structure de l'enzyme et des ligands. Le programme Open Babel (2.0.2) nous a permis de convertir les fichiers en plusieurs formats (mol2, mol, pdb,.....). Ainsi nous avons utilisé le logiciel Excel pour tracer la courbe de corrélation entre l'activité biologique (pIC_{50}) de 66 inhibiteurs testés [29] [30] [31] [32] et leurs scores obtenus par surflex. Enfin un dernier programme a été utilisé dans cette étude pour visualiser les interactions établies entre les inhibiteurs et le site actif de notre enzyme. Il s'agit de ViewerLite (4.2).

2-Méthodes :

2-1- Préparation des molécules pour le docking moléculaire :

2-1-1- Préparation de l'enzyme (récepteur) :

L'enzyme cible que nous avons utilisée dans notre travail est la MMP-13 dont la structure tridimensionnelle a été téléchargée à partir de la Protein Data Bank (pdb) sous le code 830C [37]. La structure de l'enzyme existe sous forme de complexe (lié à un inhibiteur) définie par cristallographie avec résolution de 1.60Å. L'enzyme étant constituée de 2 chaînes (A et B), la chaîne B a été éliminée pour permettre une utilisation plus aisée de l'enzyme lors du docking moléculaire. Les molécules d'eau et l'inhibiteur présents dans la chaîne A ont également été éliminés et la structure de l'enzyme est enregistrée sous le format. pdb par le VMD. Ce dernier

Chapitre 05: Matériel et méthodes

est ensuite converti au format .mol2 que reconnaît Surfex , par le programme Open Babel2.0.2. Enfin grâce à une analyse visuelle avec le programme VMD, nous avons pu définir les acides aminés de la cavité de l'enzyme capable de se lier avec le ligand en sélectionnant ceux qui sont dans son voisinage le plus proche situés à une distance de 6Å. Le fichier obtenu est enregistré dans un fichier.pdb.

Dans le tableau N°22, nous retrouvons la liste des acides aminés du site actif de la MMP-13 telle qu'elle a été déterminée par le programme VMD.

Tableau N°22 : Liste des acides aminés du site actif de la MMP-13.

N°	Les acides aminés du site actif
1	GLY183
2	LEU184
3	LEU185
4	ALA186
5	HIS187
6	ALA188
7	ASN215
8	LEU218
9	VAL219
10	ALA220
11	HIS222
12	GLU223
13	HIS226
14	HIS232
15	PRO236
16	GLY237
17	ALA238
18	LEU239
19	MET240
20	PHE241
21	PRO242
22	ILE243

23	TYR244
24	THR245
25	TYR246
26	THR247
27	PHE252
28	MET253
29	LEU254
30	PRO255

2-1-2- Préparation des ligands:

Nous avons utilisé 66 inhibiteurs obtenus de la littérature [29] [30] [31] [32]. Dont la géométrie 3D a été construite avec le logiciel «Titan» et ensuite sauvegardés dans des fichiers sous format pdb après avoir minimisé leur énergie intramoléculaire.

2-1-3- Génération du protomol:

Le docking moléculaire a été réalisé par le programme Surflex en suivant plusieurs étapes.

Nous avons déterminé le site actif représenté par le pl-protomol.mol2 (voir figure N°6) avec un inhibiteur .pdb et la protéine. mol2 par la commande suivante :

```
surflex-dock proto inhibiteur.pdb protein.mol2 pl
```

Ainsi nous avons utilisé une autre commande pour la détermination du pl- protomol de notre enzyme : MMP-13 (elle a le même rôle que la précédente) mais en utilisant la protéine .mol2 et la liste de cavité de l'enzyme MMP-13 :

```
surflex-dock -proto_thresh 0.5 -proto_bloat 2 resproto list_cavité _proteine .text  
protéine.mol2 p1.
```

2-2 - Le docking moléculaire :

Cette étape a été réalisée par l'utilisation des ligands au format pdb et la protéine au format mol2 et le pl-protomol format mol2 ,elle nous a permis d'avoir les dix meilleures conformations des ligands au niveau du site actif de l'enzyme d'après leurs affinité représenté

Chapitre 05: Matériel et méthodes

par des scores (final 0 à final-9) au format mol2, le meilleur score pris en considération :final-0. Pour cette étape nous avons utilisé la commande suivante :

surfex-dock dock inhibiteur.pdb pl-protomol.mol2 protein.mol2

Pour le test RMSD nous avons utilisé en plus une troisième commande :

surfex-dock oprms final-0.mol2 ligand.mol2

Nécessaire Pour optimiser la position d'une molécule qui a été simulé par rapport à celle du ligand expérimental et le calcul du RMSD.

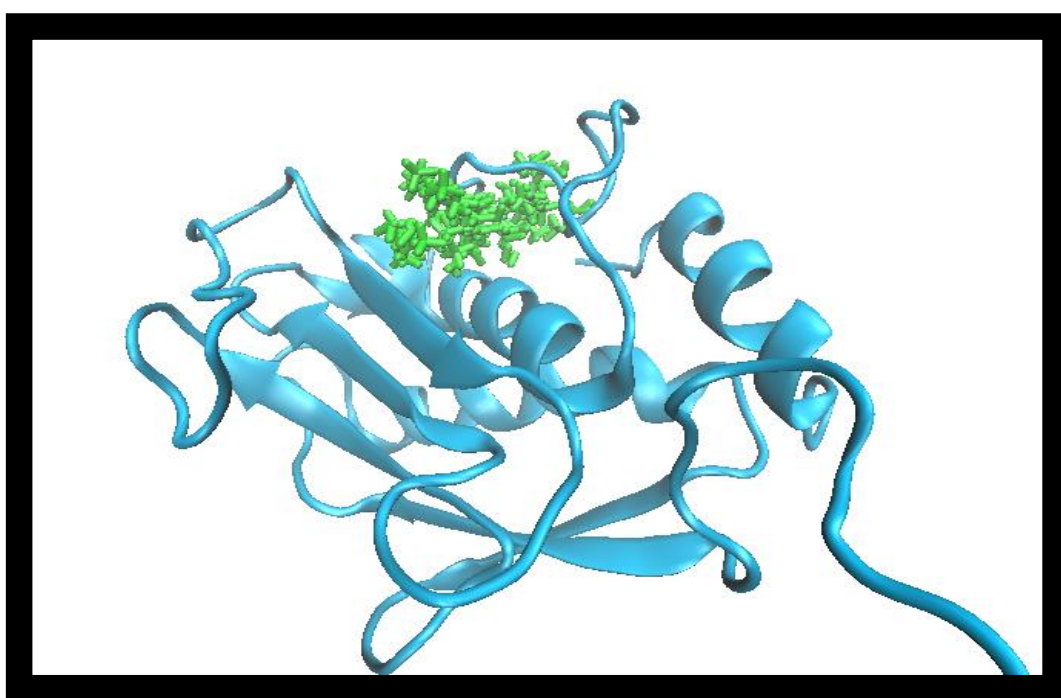


Figure N°6 : Le model en négatif du site actif représenté par le protomol (coloré en vert).

2-3- Analyse visuelle des résultats :

Le programme Surfex ne permet pas de faire l'analyse visuelle, pour cela on fait appel à ViewerLite 4.2 pour visualiser les interactions hydrophobes et hydrogènes que peut établir chaque inhibiteur avec le site actif de l'enzyme. Le programme VMD nous a également aidé à visualiser les résultats du RMSD et le mode de liaison des inhibiteurs dans le site actif.

2-4- La règle de 5 de Lipinski :

C'est une règle qui permet d'évaluer les propriétés physico-chimiques d'une molécule afin de prédire sa biodisponibilité par voie orale. Cette règle énoncée par Lipinski en 1997[38] est basée sur cinq critères :

- 1- Un poids moléculaire inférieur à 500 daltons.
- 2- Le nombre des groupements donneurs d'hydrogène ne dépasse pas 5.
3. Le nombre des groupements accepteurs d'hydrogène ne dépasse pas 10.
4. Un coefficient de partage octanol/eau ($\log P$) entre -2 et 5.
5. Le nombre de liaisons rotatives inférieur à 15.

Pour être retenue, une molécule doit répondre à au moins 3 de ces critères.

Tous ces paramètres ont été calculés, à partir de la structure 2D des composés étudiés, en utilisant le serveur Molinspiration [39].

Chapitre 6:

Résultats et discussion

1-Evaluation de la fiabilité du programme Surflex :

Afin de nous assurer de la méthode de docking moléculaire utilisée pour la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme MMP-13, nous avons jugé utile d'évaluer d'abord la performance du programme Surflex par deux tests : le RMSD et le coefficient de corrélation linéaire.

1-1- Le RMSD (*Root Mean Square Deviation*):

L'efficacité d'un programme à prédire le positionnement exact d'un ligand dans le site actif est évaluée par la déviation quadratique moyenne ou RMSD de la position du ligand simulée par le programme Surflex par rapport à celle déterminée expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB. La prédiction est jugée correcte lorsque la valeur du RMSD obtenue est $\leq 2\text{\AA}$. Ce test a été réalisé sur une centaine de complexe protéine-ligand [40] choisis arbitrairement à partir de la PDB. Après avoir séparé la protéine de son ligand les 2 fichiers sont enregistrés séparément afin de reconstituer de nouveau le complexe par docking moléculaire et de calculer le RMSD entre la meilleure conformation du ligand générée par surflex (finale 0) et la conformation expérimentale de référence issue de la PDB. Les résultats des 100 complexes sont représentés dans l'Annexe 1.

La représentation graphique en pourcentage, des résultats du RMSD est donnée par la figure N°7

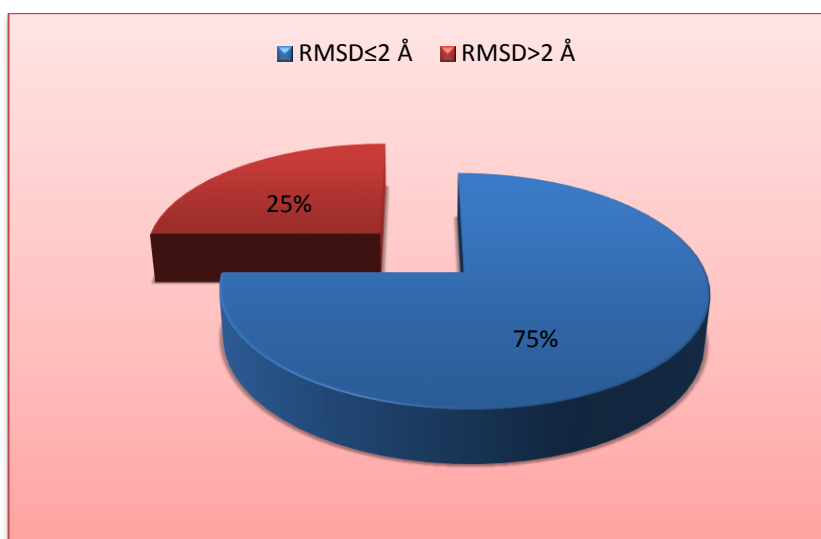


Figure N°7 : Résultats en % des RMSD obtenus par Surflex.

Chapitre 06: Résultats et discussion

Les résultats du graphe montrent que 75% des valeurs RMSD sont \leq à 2Å alors que 25% sont $>$ à 2 Å. La reproduction des données expérimentales dans de telles proportions, montre que surflex conformément aux travaux de Kellenberger et al (2004) (avec 54% des RMSD \leq 2Å) et chikhi A et bensegueni A (2008) (avec 63% des RMSD \leq 2Å) [40] [41] est un programme de docking moléculaire très performant.

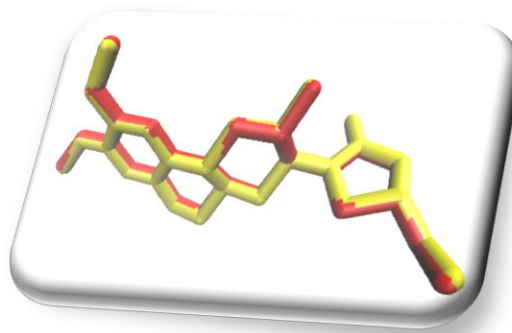
1-2- Analyse visuelle:

L'analyse visuelle par VMD permet une meilleure appréciation des résultats de RMSD obtenus avec Surflex.

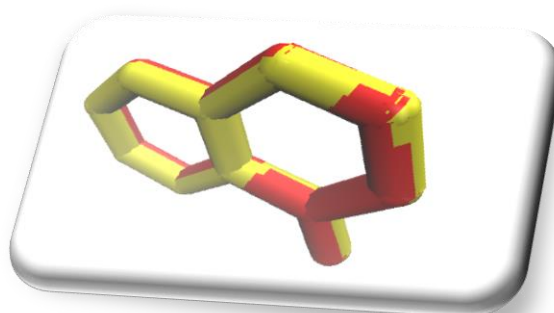
Pour cela nous avons choisi 3 complexes dont les résultats de docking moléculaire \leq 2Å et 3 complexes dont les RMSD sont $>$ à 2Å (voir figures 8 et 9) :



5CUH (RMSD=0.032Å)



3KWF (RMSD=0.072Å)



5F37 (RMSD=0.039Å)

Figure N° 8 : Superposition de la géométrie des trois ligands des complexes (5CUH 3KWF, 5F37) obtenus par rayon-X (colorés en jaune) et celles calculées par docking moléculaire avec Surflex (colorés en rouge).

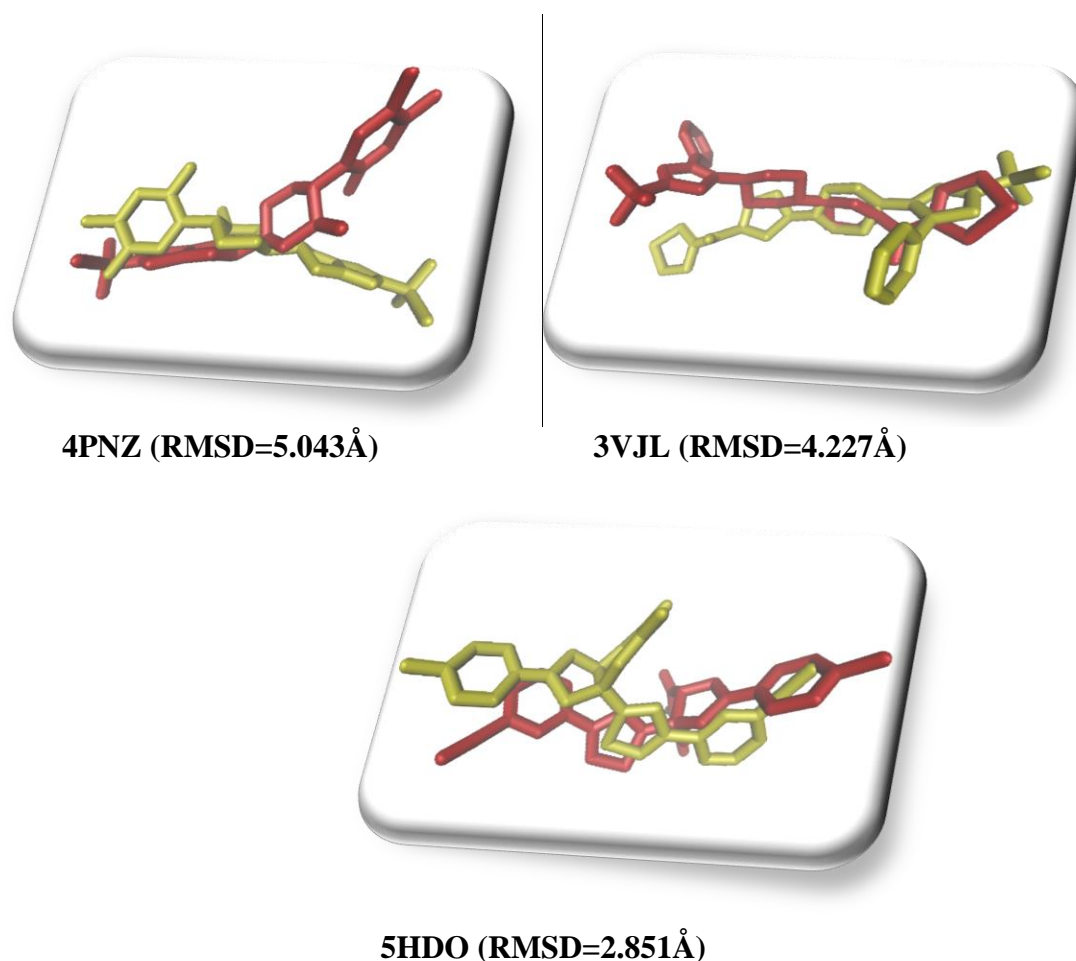


Figure N° 9 : Comparaison entre la géométrie des trois ligands des complexes (4PNZ, 3VJL, 5HDO) obtenus par rayon-X (colorés en jaune) et celles calculées par docking moléculaire avec Surflex (colorés en rouge).

1-3- Test du coefficient de corrélation linéaire :

Il s'agit du deuxième moyen permettant de tester la fiabilité du programme Surflex. Ce test consiste à déterminer le degré de corrélation entre deux valeurs, en l'occurrence l'activité biologique de l'inhibiteur ou pIC_{50} et son affinité pour l'enzyme.

Le coefficient de corrélation est calculé en traçant la courbe de régression linéaire entre les scores (affinité) obtenus par docking moléculaire et les pIC_{50} de **66** inhibiteurs cités dans la littérature[**29**][**30**][**31**][**32**](voir Annex2).

Les pIC_{50} ont été calculés par le serveur Sanjev's Lab [**42**][**43**].

Chapitre 06: Résultats et discussion

Les résultats des scores (affinités) des inhibiteurs étudiés ainsi que leurs pIC_{50} sont représentés dans le tableau N°23 (classés par leur affinité décroissante):

Tableau N°23 : Résultats de l'activité biologique (pIC_{50}) de 66 inhibiteurs de la MMP-13 et leurs scores (affinité) obtenus par Surfex.

Numéro	Nom de l'inhibiteur	IC ₅₀ (nM)	pIC ₅₀	Score (affinité)	Références
1	Composé 36	2nM	8.698	5.16	[30]
2	Composé 14	4nM	8.397	5.12	[29]
3	Composé 24	31nM	7.508	5.08	[30]
4	Composé 59	/	7.0	4.93	[32]
5	Composé 2	100nM	7	4.91	[29]
6	Composé 60	/	7.1	4.88	[32]
7	Composé 62	/	7.4	4.87	[32]
8	Composé 47	/	7.5	4.84	[32]
9	Composé 5	11nM	7.958	4.81	[29]
10	Composé 50		7.0	4.76	[32]
11	Composé 30	460nM	6.337	4.64	[30]
12	Composé 23	63nM	7.200	4.63	[30]
13	Composé 28	245nM	6.610	4.63	[30]
14	Composé 12	42nM	7.376	4.59	[29]
15	Composé 17	27nM	7.568	4.58	[29]
16	Composé 16	29nM	7.537	4.57	[29]
17	Composé 27	17nM	7.769	4.52	[30]
18	Composé 49	/	7.0	4.50	[32]
19	Composé 51	/	7.3	4.48	[32]
20	Composé 22	620nM	6.207	4.47	[30]
21	Composé 20	36nM	7.443	4.38	[29]
22	Composé 11	140nM	6.853	4.36	[29]
23	Composé 9	24nM	7.619	4.30	[29]
24	Composé 6	180nM	6.744	4.26	[29]
25	Composé 37	4nM	8.397	4.26	[30]
26	Composé 45	/	6.5	4.26	[32]
27	Composé 65	/	7.0	4.21	[32]
28	Composé 61	/	7.3	4.18	[32]
29	Composé 19	9nM	8.045	4.17	[29]
30	Composé 35	40nM	7.397	4.17	[30]
31	Composé 56	/	5.6	4.15	[32]
32	Composé 13	31nM	7.508	4.14	[29]
33	Composé 21	5nM	8.301	4.14	[29]
34	Composé 18	25nM	7.602	4.13	[29]
35	Composé 66	/	7.1	4.13	[32]
36	Composé 15	100nM	7	3.98	[29]
37	Composé 25	180nM	6.744	3.95	[30]
38	Composé 48	/	7.0	3.91	[32]
39	Composé 7	330nM	6.481	3.87	[29]

Chapitre 06: Résultats et discussion

Numéro	Nom de l'inhibiteur	IC50 (nM)	pIC50	Score (affinité)	Références
40	Composé 55		6.2	3.84	[32]
41	Composé 1	430nM	6.366	3.80	[29]
42	Composé 44	/	5.5	3.79	[31]
43	Composé 46	/	7.5	3.79	[32]
44	Composé 4	140nM	6.853	3.75	[29]
45	Composé 43	/	5.3	3.74	[31]
46	Composé 31	480nM	6.318	3.69	[30]
47	Composé 33	220nM	6.657	3.66	[30]
48	Composé 26	88nM	7.055	3.65	[30]
49	Composé 57	/	5.6	3.65	[32]
50	Composé 63	/	7.3	3.63	[32]
51	Composé 10	72nM	7.142	3.62	[29]
52	Composé 64	/	7.1	3.54	[32]
53	Composé 54	/	6.0	3.49	[32]
54	Composé 53	/	5.3	3.46	[32]
55	Composé 29	1550nM	5.809	3.43	[30]
56	Composé 52	/	6.7	3.43	[32]
57	Composé 42	/	4.7	3.39	[31]
58	Composé 38	/	5	3.38	[31]
59	Composé 8	310nM	6.508	3.31	[29]
60	Composé 41	/	4.6	3.31	[31]
61	Composé 32	290nM	6.537	3.28	[30]
62	Composé 34	6nM	5.221	3.18	[30]
63	Composé 39	/	4.6	3.12	[31]
64	Composé 58	/	6.5	3.10	[32]
65	Composé 40	/	4.3	3.04	[31]
66	Composé 3	3300nM	5.481	2.83	[29]

L'analyse par régression linéaire de ces 2 variables (pIC₅₀ et score) a permis d'obtenir la représentation graphique suivante avec un coefficient de corrélation de 0.68 (voir figure N°10).

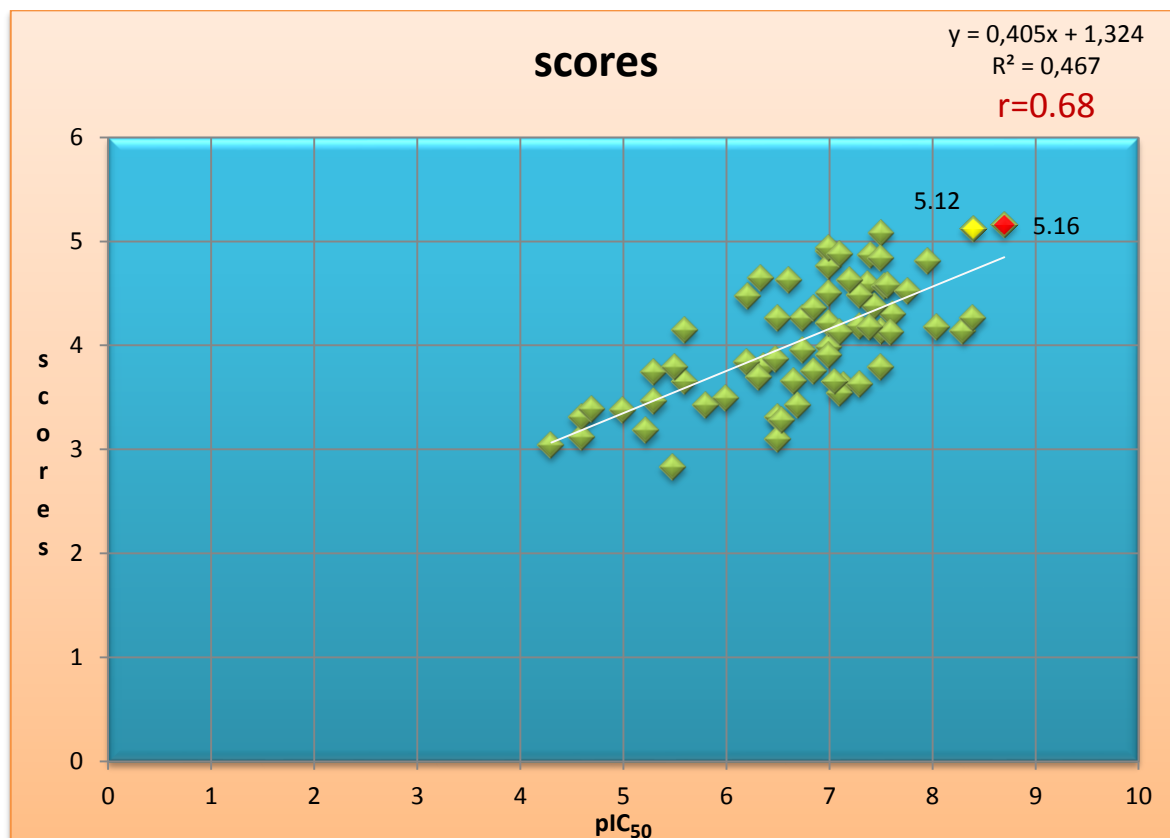


Figure N° 10 : Courbe de corrélation entre l'activité biologique (pIC₅₀) de 66 inhibiteurs de la MMP-13 et leurs scores obtenus par Surfex.

Une telle valeur du coefficient (r) montre, en accord avec les travaux de Chikhi A et Bensegueni A (2010) (avec des coefficients $r = 0.83$, $r = 0.90$, $r = 0.84$) [44] et Bouchrit H et al (2014) (avec des coefficients $r = 0.76$, $r = 0.64$) [45], qu'il existe une corrélation entre les 2 variables pIC₅₀ et affinité.

1-4- Conclusion:

Les résultats des RMSD et du coefficient de corrélation montrent que Surfex est un programme de docking fiable qui peut être utilisé en toute confiance pour réaliser le présent travail qui consiste à rechercher des inhibiteurs plus puissants de la MMP-13.

2-Analyse visuelle des interactions entre les inhibiteurs et les acides aminés du site actif de la MMP-13 :

Afin d'élucider le mode d'interaction des inhibiteurs avec le site actif de la MMP-13, nous avons choisi les 2 composés présentant les plus faibles IC₅₀ avec des meilleurs scores.

Chapitre 06: Résultats et discussion

Il s'agit des composés 14 ($IC_{50}=4nM$, score=5.12) et 36 ($IC_{50}=2nM$, score=5.16) (voir tableau N°22) dont les structures sont représentées dans les figures N°11 et N°12.

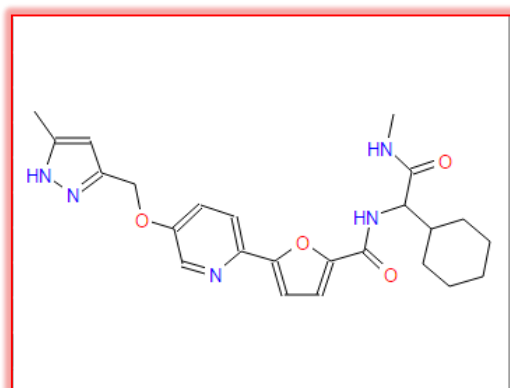


Figure N°11 : Structure du composé 36.

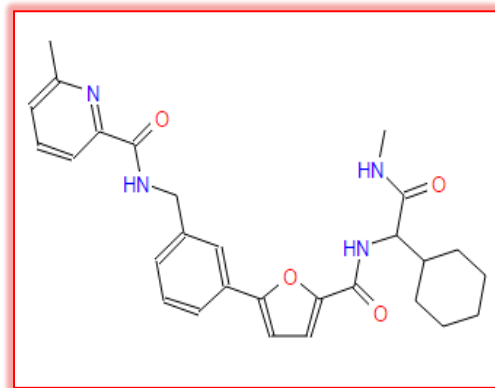


Figure N°12: Structure du composé 14.

2-1-Etude des interactions du composé 36:

Le mode d'interaction du composé 36 avec la MMP-13 calculé par docking moléculaire avec Surflex nous a donné le meilleur score d'affinité avec une valeur égale à 5.16 parfaitement corrélée avec sa forte activité biologique exprimée par un IC_{50} avec la plus faible valeur expérimentale (2nM).

L'analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction de ce composé montre qu'il est bien placé dans le site actif de la MMP-13 où il établit 7 liaisons hydrogène (voir figure N°13). Ces liaisons sont regroupées dans le tableau N°24.

Tableau N°24 : Les liaisons hydrogène établies par le composé 36 avec le site actif.

Les liaisons hydrogène	Inhibiteur	Résidus du site actif	Distance
1	L'oxygène du carbonyle de la liaison amide reliant les cycles furane et hexane.	Le groupement α amine du résidu LEU185.	(O...HNLEU185; d=1.71Å)
2	L'oxygène du carbonyle de la liaison amide reliant les cycles furane et hexane.	Le groupement α amine du résidu ALA186.	(O...HNALA186;d=2.22Å)
3	L'azote du cycle lié au furane.	L'oxygène du groupement α carbonyle du résidu PHE 241.	(N...CO PHE24;d=2.89Å)

Chapitre 06: Résultats et discussion

Les liaisons hydrogène	Inhibiteur	Résidus du site actif	Distance
4	L'azote du cycle lié au furane.	L'hydrogène du groupement α amine du résidu ILE 243.	(N...HN ILE243 ; d=3.10Å)
5	L'azote du cycle situé à l'extrémité.	Le groupement α carbonyle du résidu THR245.	(N...CO THR245;d=3.12Å)
6	L'oxygène du carbonyle de la deuxième liaison amide du cycle hexyl.	L'hydrogène du groupement α amine du résidu TYR244.	(O...HN TYR244;d=2.44Å)
7	Le H de NH de la deuxième liaison amide au voisinage du cycle hexyl.	Le groupement α carbonyle du résidu GLY183.	(NH...OC Gly18;d=2.18Å)

Le composé 36 est par ailleurs stabilisé dans le site actif de la MMP-13 par d'autres interactions de type hydrophobe avec les résidus :LEU239 , PRO242 ,HIS 222,VAL 219 ,THR 247 ,PHE252 ,LEU 218.

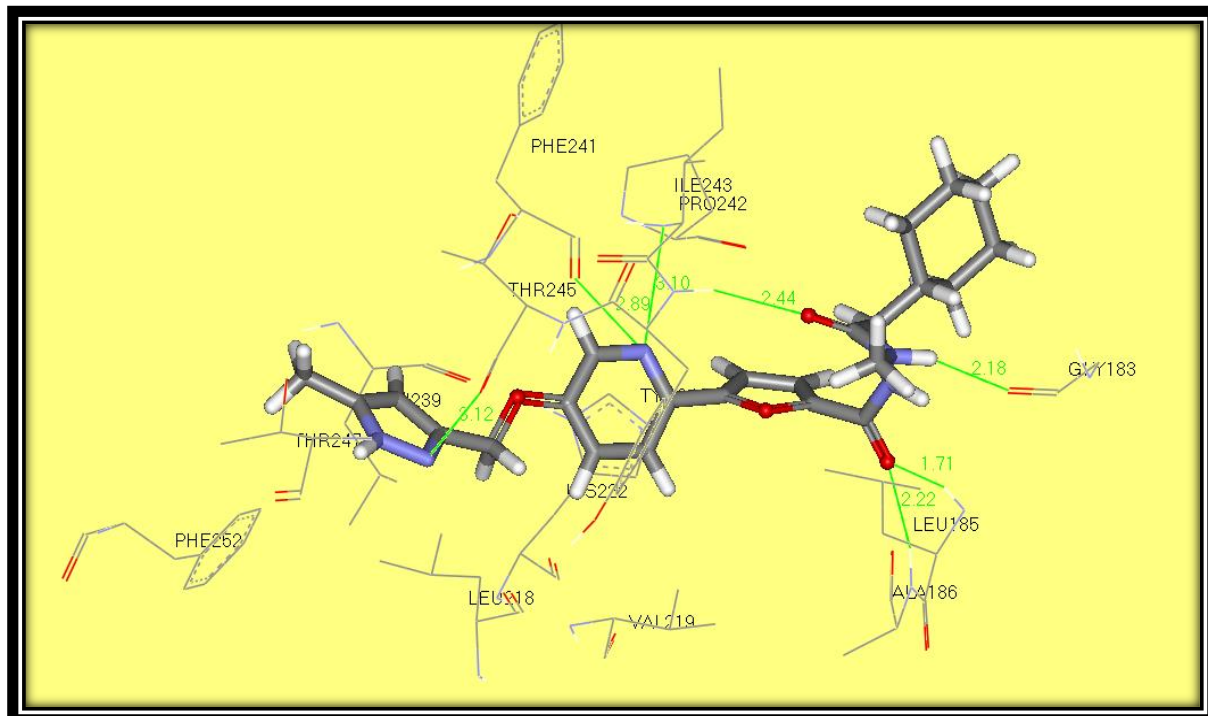


Figure N° 13 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé 36 avec le site actif de la MMP-13.

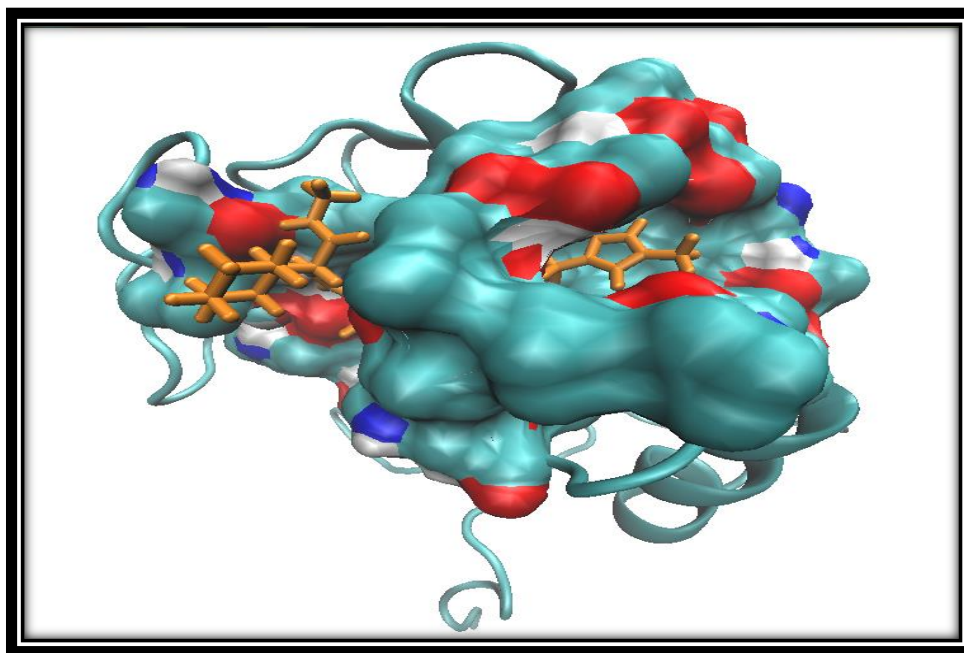


Figure N°14 : Visualisation par VMD de l'emplacement du composé 36 (en orange) dans le site actif de la MMP-13.

2-2- Etude des interactions du composé 14 :

Le composé 14 bien que son IC_{50} soit doublement supérieur (4nM) à celui du composé 36, présente un score d'affinité équivalent soit d'une valeur égale à 5.12.

L'analyse visuelle par ViewerLite du mode d'interaction du composé 14 avec la MMP-13 montre qu'il est entouré par différents acides aminés hydrophobes dont HIS222, PHE252, ILE243, THR247, TYR244, LEU218. Cinq liaisons hydrogène interviennent pour stabiliser davantage cet inhibiteur dans la cavité de l'enzyme (voir figure 15), qui sont regroupées dans le tableau N° 25.

Chapitre 06: Résultats et discussion

Tableau N°25 : Les liaisons hydrogène établies par le composé 14 avec le site actif.

Les liaisons hydrogène	Inhibiteur	Résidus du site actif	Distance
1	H du N formant la liaison amide avec le cycle furane.	Le groupement α carbonyle du résidu LEU239.	(NH...O=CLEU239;d=2.25Å)
2	H du N de la nouvelle liaison amide introduit dans la molécule (par rapport au composé 36).	Le groupement α carbonyle du résidu PRO242.	(NH...O=C PRO242;d=2.00Å)
3	H du N d'une autre liaison amide située entre le cycle hexyle et l'extrémité méthyle terminal.	Le groupement α carbonyle du résidu ALA238.	(NH...O=C ALA238;d=2.16Å)
4	L'oxygène du carbonyle de la liaison amide située à l'extrémité CH3 terminal.	L'hydrogène de la fonction hydroxyle latérale du résidu THR245.	(O...HO THR245 ; d=1.99Å)
5	L'oxygène du carbonyle reliant les cycles furane et hexane.	L'hydrogène de la fonction α -NH2 du résidu THR245.	(O...HN THR245 ; d=1.84Å)

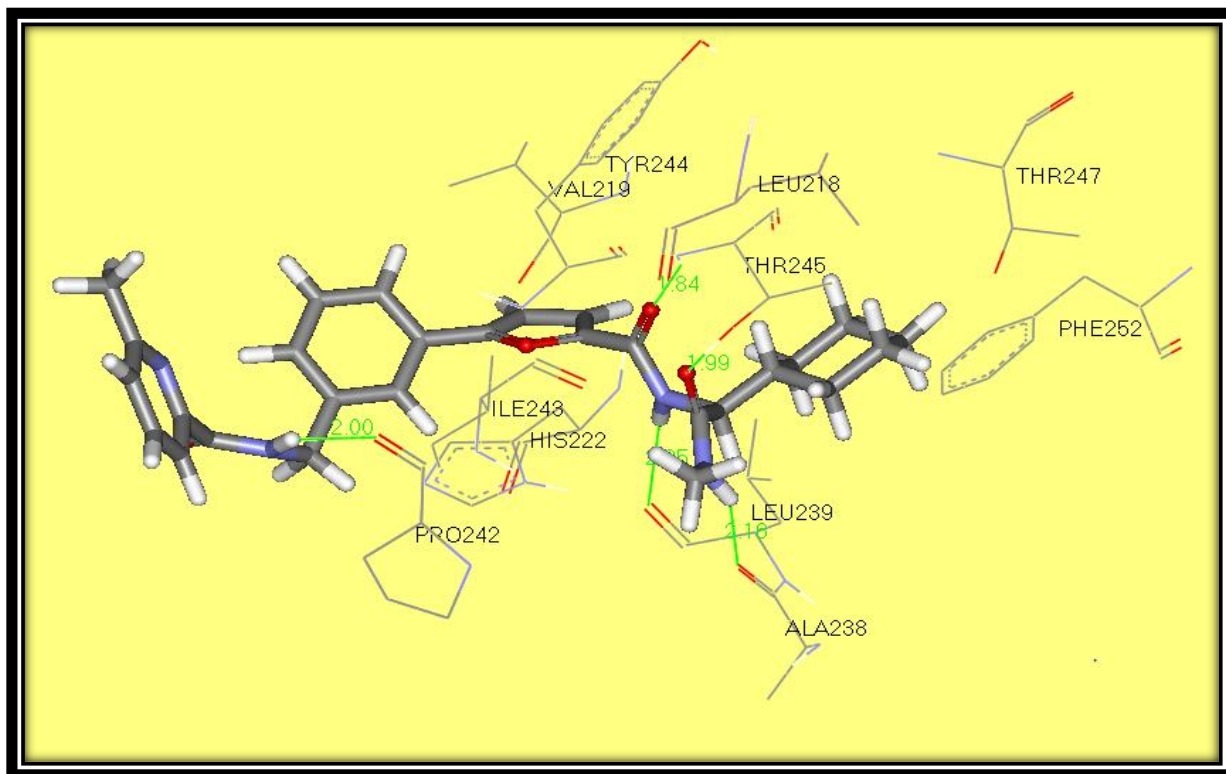


Figure N° 15 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé 14 avec le site actif de la MMP-13.

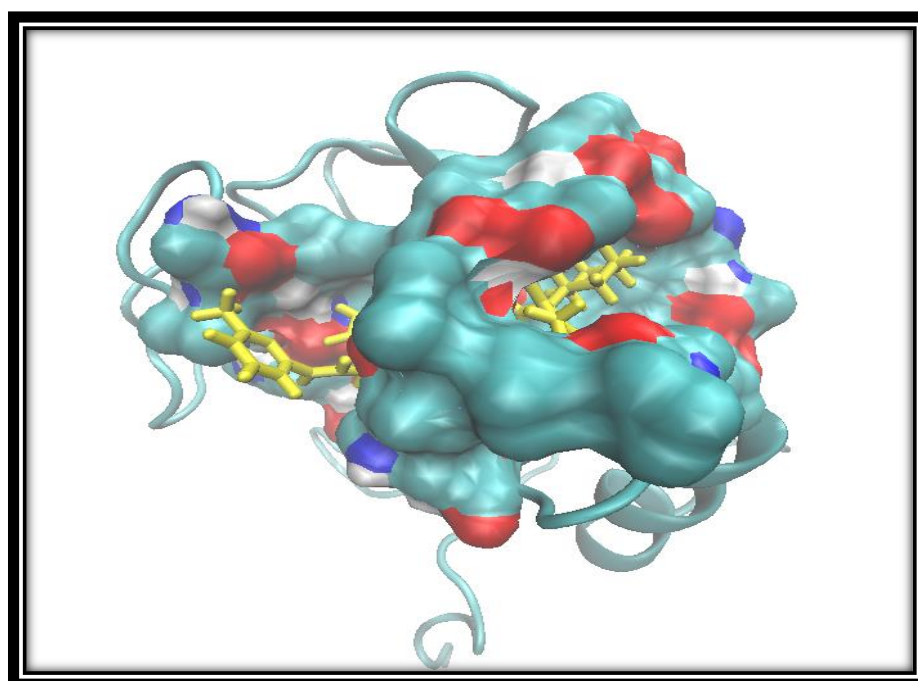


Figure N°16: Visualisation par VMD de l'emplacement du composé 14 (en jaune) dans le site actif de la MMP-13.

2-3- Application de la règle de Lipinski :

C'est un « filtre ADME » basé sur les critères de Lipinski pour estimer les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion des composés qui peuvent être potentiellement actifs comme médicaments. L'application de cette règle sur les 2 inhibiteurs étudiés va nous permettre d'évaluer leur activité biologique.

Tableau N° 26: Résultat de la règle de Lipinski pour les deux inhibiteurs étudiés.

Critères	Composé 36	Composé 14
Poids Moléculaire (MW)	451.53	488.59
Donneurs d'hydrogène	3	3
Accepteur d'hydrogène	9	8
Liaisons rotatives	8	8
Log P : coefficient de partage octanol/eau.	3.21	3.14

D'après les résultats du tableau 26, les deux composés étudiés respectent bien la règle de Lipinski, donc peuvent avoir une activité biologique et une biodisponibilité orale conformément aux travaux de Lipinski et al (1997) [38].

2-4- Conclusion:

Après l'étude par docking moléculaire effectuée sur les deux composés 36 et 14 les scores obtenus ainsi que l'analyse visuelle de leur interaction au site actif confirment les données expérimentales qui se résument par leur pouvoir inhibiteur envers la MMP-13 avec une très faible IC_{50} .

3-Recherche de nouveaux inhibiteurs de la MMP-13 :

3-1 Le docking moléculaire d'un ensemble de composés :

Dans le but d'améliorer le pouvoir inhibiteur des composés 36 et 14 nous avons réalisé le docking moléculaire avec le Surflex de plusieurs composés téléchargés à partir de la banque *PUBCHEM*. Sur la base de leurs structures chimiques la banque nous a proposée 234 similaires (95 similaires du composé 36 et 139 similaires du composé 14) avec une similarité de 90%.

Chapitre 06: Résultats et discussion

Le docking moléculaire nous a permis de sélectionner 8 composés (Voir Annexe 3) avec les meilleurs scores (affinités) (voir Tableaux N°27 et N°28).

Tableau N°27 : Les scores des meilleurs similaires du composé 14.

	Nom du composé	N° CID	scores
A	6-methyl-N-[4-[5-[[3-methyl-1-(methylamino)-1-oxobutan-2-yl]carbamoyl]furan-2-yl]phenyl]pyridine-2-carboxamide	76807337	5.69
B	N-[[3-[5-[[1-cyclohexyl-2-(methylamino)-2-oxoethyl]carbamoyl]furan-2yl]phenyl]methyl]pyridine-2-carboxamide	75148296	5.54
C	N-[1-cyclohexyl-2-(methylamino)-2-oxoethyl]-5-[4-[[3-methylpyridin-2-yl)methylamino]methyl]phenyl]furan-2-carboxamide	91134567	5.49
D	N-[4-[5-[[1-(1S)-1-cyclohexyl-2-[[2-(2R)-1-methoxypropan-2-yl]amino]-2-oxoethyl]carbamoyl]furan-2-yl]phenyl]-6-methylpyridine-2-carboxamide	46207416	5.43

Tableau N°28 : Les scores des meilleurs similaires du composé 36.

	Nom du composé	N° CID	scores
E	(2S)-2-[amino-[5-[5-[(6-methylpyridin-2-yl)methoxy]pyridin-2-yl]furan-2-carbonyl]amino]-2-cyclohexyl-N-methylacetamide	117813931	5.40
F	3-(furan-2-yl)-N-(4-(pyridin-3-yloxy)but-2-yn-1-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide;	90578797	5.38
G	N-[(S)-(3-hydroxycyclobutyl)-pyridin-2-ylmethyl]-5-(5-methylfuran-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide	100300447	5.35
H	N-[(3-hydroxycyclobutyl)-pyridin-2-ylmethyl]-5-(5-methylfuran-2-yl)-1H-pyrazole-3-carboxamide	91796136	5.32

Chapitre 06: Résultats et discussion

D'après les résultats des 2 tableaux, il ressort que les scores corrélés avec affinité des 8 similaires des 2 composés 14 et 36 sont légèrement améliorés.

Il faut souligner que le composé 14, bien que présentant un pouvoir inhibiteur plus faible que le composé 36, *PUBCHEM* a fourni de meilleurs similaires en se basant sur sa structure.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'interaction de ces similaires, il nous a semblé judicieux de faire uniquement l'analyse visuelle du meilleur similaire de chaque inhibiteur, c'est-à-dire les composés A et E dont les structures sont représentées dans les figures N°17 et N°18.

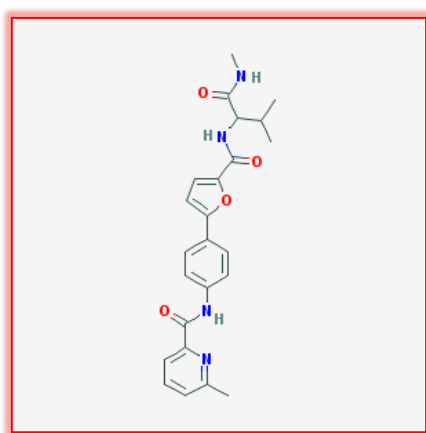


Figure N°17: Structure du composé A.

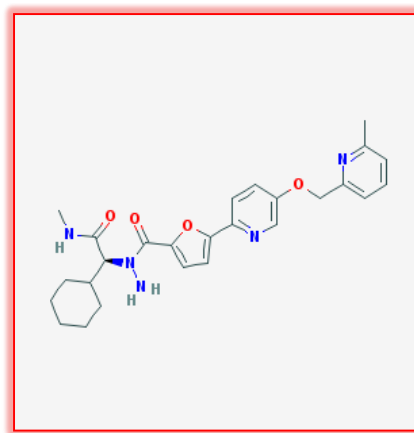


Figure N°18: Structure du composé E.

Comme le montre la figure N° 19 le composé A établit quatre liaisons hydrogène regroupées dans le tableau N°29.

Tableau N°29 : Les liaisons hydrogène établies par le composé A avec le site actif.

Les liaisons hydrogène	Inhibiteur	Résidus du site actif	Distance
1	Le H du NH de la liaison amide reliant le cycle hexane et le cycle situé à l'extrémité	Le groupement α carbonyle du résidu LEU239.	(NH...OC LEU239;d=1.90Å)
2	L'oxygène du carbonyle de la liaison amide reliant le cycle hexane et le cycle situé à l'extrémité	L'hydrogène du groupement α amine du résidu THR245.	(O...HN THR245 ;d=2.02Å)
3	L'oxygène du carbonyle de la liaison amide au voisinage du cycle furane	L'hydrogène du groupement α amine du résidu LEU185.	(O...HN LEU185; d=1.76Å)

Chapitre 06: Résultats et discussion

Les liaisons hydrogène	Inhibiteur	Résidus du site actif	Distance
4	L'oxygène du carbonyle de la liaison amide au voisinage du cycle furane	L'hydrogène du groupement α amine du résidu ALA186	(O...HN ALA186; d=2.47Å)

Ainsi cet inhibiteur est stabilisé par d'autres liaisons hydrophobes avec les acides aminés PRO242, HIS222, TYR244, PHE252, VAL219, ILE243, PRO255, LEU254, LEU218.

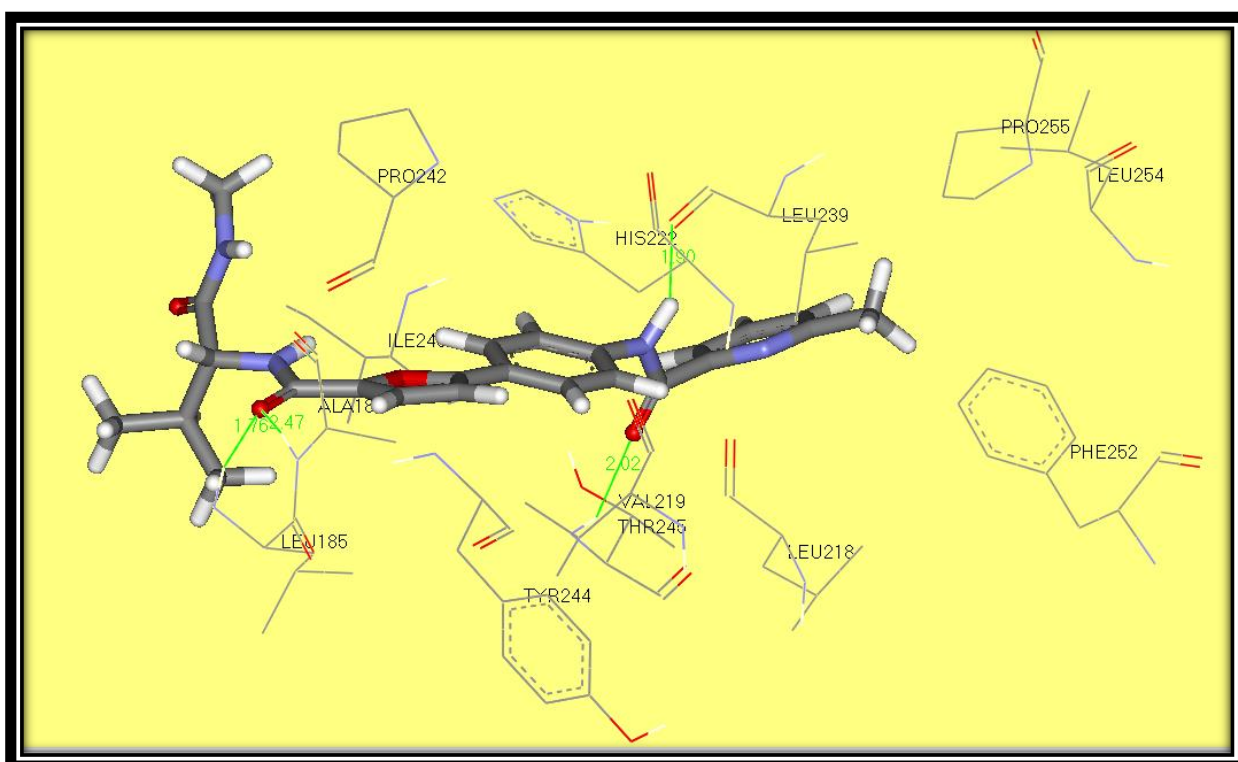


Figure N°19 : Analyse visuelle par ViewerLite du mode d'interaction du composé A avec le site actif de la MMP-13.

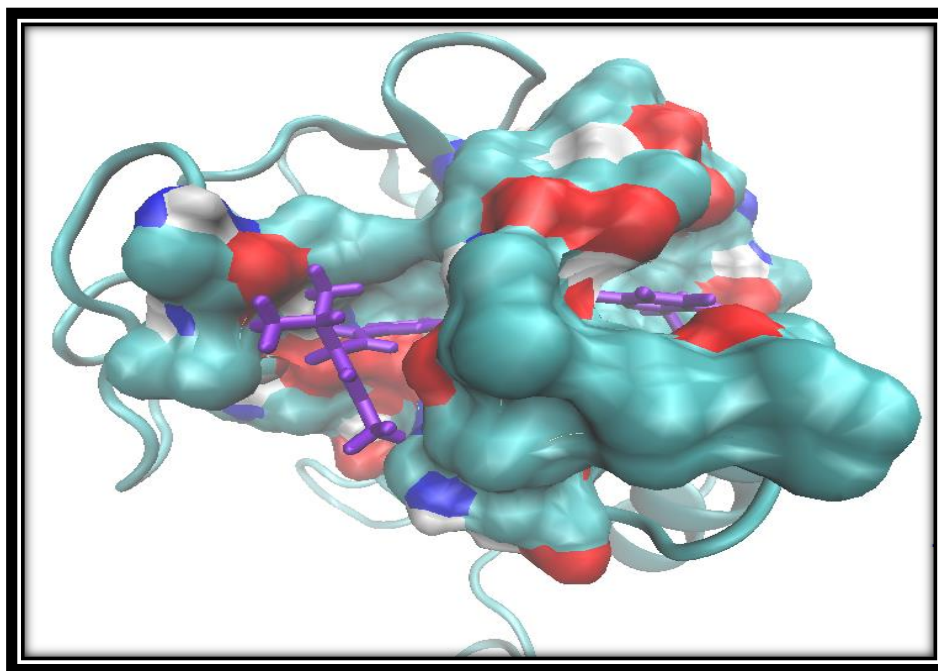


Figure N°20 : Visualisation par VMD de l'emplacement du composé A(en mauve) dans le site actif de la MMP-13.

Concernant le composé E avec son score de 5.40 montre la présence de 3 liaisons hydrogène qui sont regroupées dans le tableau N°30.

Tableau N°30 : Les liaisons hydrogène établies par le composé E avec le site actif.

Les liaisons hydrogène	Inhibiteur	Résidus du site actif	Distance
1	Le H du NH de la liaison amide situé à l'extrémité CH3 terminale.	La fonction hydroxyle latérale du résidu PRO242.	(NH...O PRO242;d=2.16Å)
2	Le H du NH2 lié a la liaison amide situé à proximité du cycle furane.	La même fonction hydroxyle latérale du résidu PRO242	(NH...O PRO242;d=2.02Å)
3	L'atome d'oxygène du carbonyle de la liaison amide situé à proximité du cycle furane.	Le H de la fonction α amine du résidu LEU185	(O...HN LEU185;d=1.96Å)

Chapitre 06: Résultats et discussion

Ainsi ce composé est stabilisé dans le site actif de la MMP-13 par d'autres liaisons hydrophobes avec les résidus HIS222, TYR244, THR245, THR247, LEU239, ILE243, PHE252, LEU218, MET253, PRO255, VAL219 (voir figure N°21).

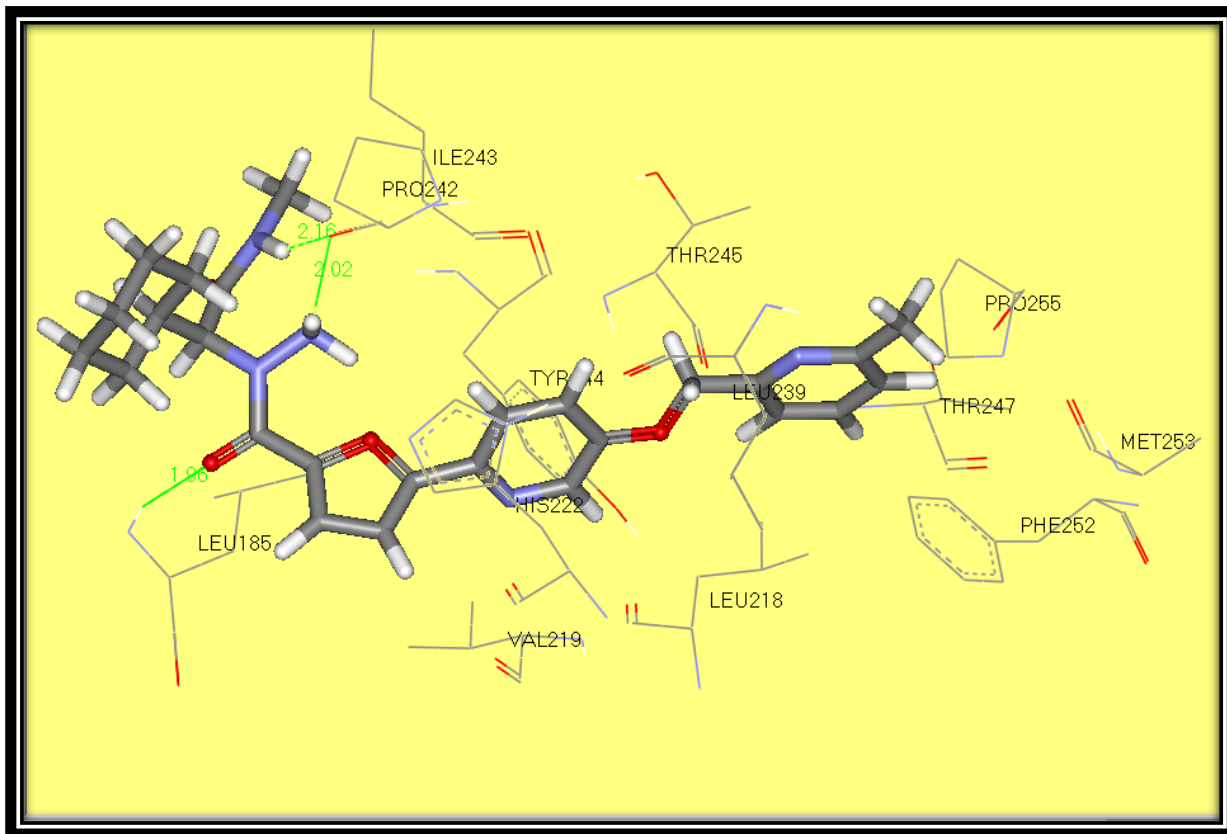


Figure N°21 : Analyse visuelle par ViewerLite du mode d'interaction du composé E avec le site actif de la MMP-13.

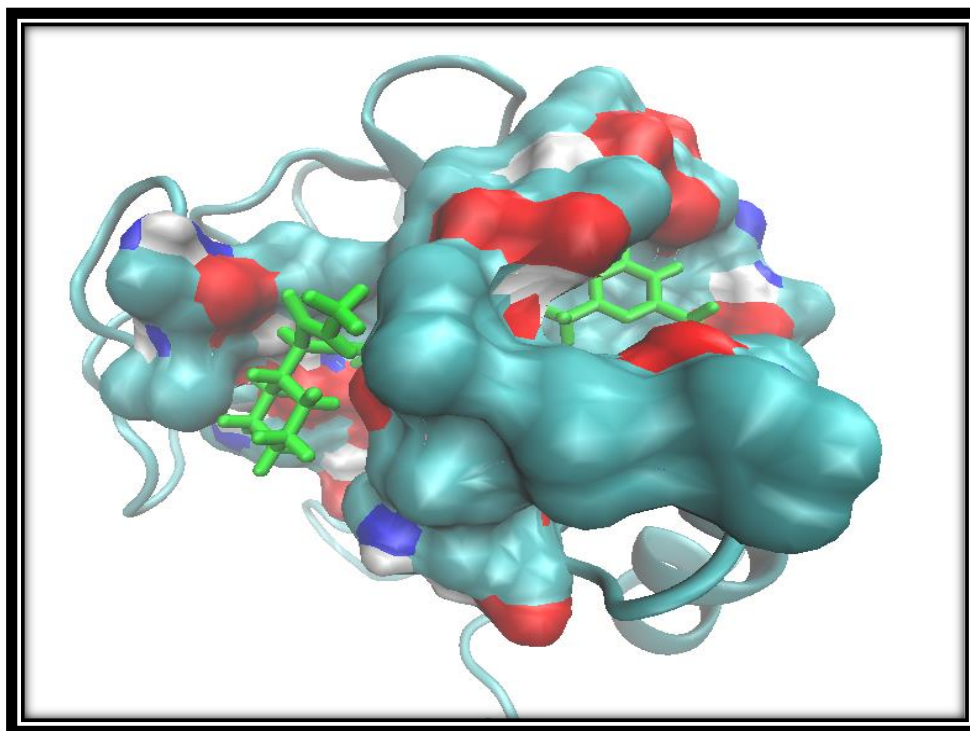


Figure N°22 : Visualisation par VMD de l'emplacement du composé E (en vert) dans le site actif de la MMP-13.

3-2 Application de la règle de Lipinski :

Dans le but de savoir si les deux similaires A et E sont des composés qui peuvent présenter une bonne biodisponibilité par voie orale, il était nécessaire de calculer leurs propriétés physico-chimiques en appliquant la règle de Lipinski.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°27.

Tableau N° 31 : Résultats de la règle de Lipinski appliquée aux composés A et E.

Critères	Composé A	Composé E
Poids Moléculaire (MW)	434.50	477.56
Donneurs d'hydrogène	3	3
Accepteur d'hydrogène	8	9
Liaisons rotables	7	8
Log P : coefficient de partage octanol/eau.	2.3	2.88

Chapitre 06: Résultats et discussion

Selon Lipinski (1997), une mauvaise absorption ainsi qu'une mauvaise perméabilité peuvent être rencontrés pour tout composé ne respectant pas au moins 3 de ces 5 règles [38]. Les composés A et E répondent positivement aux cinq critères de la règle de Lipinski et peuvent, de ce fait, être considérés comme potentiellement actifs. Leur coefficient de partage octanol/eau leur confère des propriétés d'hydro solubilité et de lipophile nécessaires pour telles qu'ils peuvent franchir facilement toute barrière aqueuse ou lipidique pour atteindre leur site d'action.

Conclusion

Conclusion

Conclusion :

Notre travail avait pour objectif de proposer de nouveaux inhibiteurs de la MMP-13 qui est considérée comme une bonne cible thérapeutique pour le traitement de la maladie de l'arthrose.

Pour cela, nous avons utilisé le programme de docking moléculaire Surflex, tout d'abord nous avons testé la performance de ce programme par deux tests : le premier consiste à calculer le RMSD (Root Mean Square Déviation) entre la meilleure conformation du ligand simulé par le Surflex et celle obtenue par cristallographie au niveau de la PDB. 100 complexes ont été téléchargés à partir de la PDB et testés. Le deuxième critère était la détermination du coefficient de corrélation linéaire entre les pIC50 expérimentales et les scores d'affinité de 66 inhibiteurs tirés de la bibliographie. les résultats des RMSD montrent que 75% des valeurs sont \leq a 2Å. L'analyse visuelle par viwerlite montre qu'il existe une bonne superposition entre la géométrie des ligands calculée par Surflex et celle obtenue expérimentalement. L'analyse par régression linéaire donne un coefficient de corrélation égale à 0.68 qui consolide les résultats des RMSD.

A la lumière de ces résultats nous concluons que le programme Surflex est considéré performant et peut être utilisé dans la recherche de nouveaux inhibiteurs de la MMP-13 sans trop de risque d'erreurs.

En deuxième lieu nous avons étudié les modes d'interactions des deux meilleurs inhibiteurs parmi les 66 ceux présentant les plus faibles IC50 (2nM, 4nM). ces 2 composés (N° 36 et 14) ont donné les meilleurs scores d'affinités respectivement de 5.16 et 5.12.

Dans le but de rechercher de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la MMP-13, nous avons testé ; par docking moléculaire avec Surflex, 234 composés proposés par la banque *PUBCHEM* en nous basant sur la structure des deux composés sélectionnés (36 et 14).

Parmi les 234 similaires analysés par le programme Surflex , deux composés appelés A et E ont donné des scores d'affinités meilleurs que les composés de départ (14 et 36) 5.69 et 5.40 et sont , de ce fait, considérés comme des nouveaux inhibiteurs de la MMP-13 biologiquement plus actifs.

Conclusion

La dernière étape de notre travail consistait à appliquer la règle de cinq de Lipinski pour nous renseigner sur les propriétés pharmacodynamiques ADME de ces inhibiteurs. Les résultats obtenus sont positifs car les deux composés A et E ont parfaitement respecté les 5 critères de la règle de Lipinski. Leur utilisation comme médicaments potentiels ne posera aucun problème de biodisponibilité par voie orale.

Les résultats théoriques obtenus *in silico* doivent être complétés et confirmés par des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo*.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] N. Khaldoun, A. Abdessamad, A. Dalila, A. Ladjouze-Rezig . Physiopathologie de l'arthrose. *Revue Marocaine de Rhumatologie* . 2012 ;**22** :4-9.
- [2] M. C. Hochberg . Arthrose : nouvelles approches. *Medicographia*115. 2013;**35**:139-144 .
- [3] 8èmes journées nationales de rhumatologie : Trois millions d'Algériens atteints d'arthrose <http://www.algeria.com/forums/health-science/24242-trois-millions-d'Algeriens-atteints-d'arthrose.html> consulté le 09/03/2016.
- [4] Médecine des Arts Arthrose.<http://www.medecine-des-arts.com/+Arthrose+.html> consulté le 17/02/2016.
- [5] R. El Bikai . L'étude de l'interaction entre les chondrocytes et le collagène modifié par le 4-Hydroxynonéal : Implication dans le développement de l'arthrose. Département de Pharmacologie, Université de Monterial, Janvier 2010.
- [6] L. Laadhara, M. Zitounia, M. Kalle-Sellamia, M. Mahjouba , S. Sellamib, S. Makni Physiopathologie de l'arthrose. Du cartilage normal au cartilage arthrosique : facteurs de prédisposition et mécanismes inflammatoires. *Revue de medecine interne* .2007; **28**: 531–536.
- [7] S. Kalva, K. Saranyah, P. Rathi Suganya, M. Nisha, Lilly M. Saleena .Potent inhibitors precise to S1' loop of MMP-13, a crucial target for osteoarthritis. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2013; **44**: 297–310.
- [8] X. Chevalier. Progrès dans l'arthrose. *Revue du Rhumatisme*. 2007 ; **74** : 59-64.
- [9] I. AGARBI. Mazouz. Perception et prise en charge de l'arthrose le point de vue des médecins généralistes .Thèse pour doctorat en médecine université paris 7, 2010.
- [10] S. Haid , S. Slimani, F. Rahal , A. Abdessemed1, A. Ladjouze-Rezig. Traitement médicamenteux de l'arthrose. *Revue Marocaine de Rhumatologie*. 2012; **22**: 30-5.
- [11] B. Petitdant, P. Gouilly . L'arthrose: pour en savoir plus. *Kinesithérapie Revue* .2007; **66** :24- 7.

Références bibliographiques

- [12] Rajeshwar P. Verma , C. Hansch. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical biological functions and (Q)SARs . *Bioorganic & Medicinal Chemistry*.2007; **15**:2223–2268
- [13] S. Krizkova, O. Zitka, M. Masarik, V. Adam, M. Stiborova, T. Eckschlager, Grace J. Chavis, R.Kizek . Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. *Analytical Chemistry*. 2011; **30**: 1819–1832.
- [14] G. Tardif , P. Reboul ,J.P- Pelletier, J. Martel-Pelletier. Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3).*Mod Rheumatol* .2004; **14**:197–204.
- [15] A. David. Protéomique fonctionnelle des Métalloprotéases Matricielles (MMPs) dédiée à la détection des formes actives de MMPs dans des protéomes complexes. Thèse Pour obtenir le grade de DOCTEUR 2007.
- [16] L. Aureli, M.Gioia, I. Cerbara, S. Monaco, G. F-Fasciglione, S.Marini, P. Ascenzi, A. Topai , M. Coletta . Structural Bases for Substrate and Inhibitor Recognition by Matrix Metalloproteinases . *Current Medicinal Chemistry* .2008, **15**: 2192-2222.
- [17] O. Zitka, J. Kukacka, S. Krizkova, D. Huska, V. Adam, M. Masarik, R. Prusa , R. Kizek. Matrix Metalloproteinase .*Current Medicinal Chemistry*. 2010; **17**: 3751-3768.
- [18] T. Klein, R. Bischoff. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* .2011; **41**:271–290.
- [19] Jianchang Li, T. S. Rush, Wei Li, D. DeVincentis, Xuemei Du, Yonghan Hu, J.R. Thomason, J.S. Xiang, J. S. Skotnicki, S. Tam, K. M. Cunningham, P.S. Chockalingam, E. A. Morrisb and J. I. Levinc. Synthesis and SAR of highly selective MMP-13 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005; **15** :4961–4966.
- [20] V. La Pietra, L. Marinelli 1, S. Cosconati , F. Saverio Di Hideaki Leva , E. Nuti d, S. Santamaria , I. Pugliesi , M. Morelli , F. Casalini , A.Rossello ,C. La Motta , S. Taliani d R. Visse , Nagase , F. da Settimo ,E. Novellino ,Identification of novel molecular scaffolds for the design of MMP-13 inhibitors:A first round of lead optimization. *European Journal of Medicinal Chemistry* . 2012 ; **47**: 143-152.

Références bibliographiques

- [21] C. De Savi , D .Waterson , A. Pape , S. Lamont , E. Hadley , M. Mills , K. M. Page , J . Bowyer, R. A. Maciewicz . Hydantoin based inhibitors of MMP13—Discovery of AZD6605 *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2013; **23**: 4705–4712.
- [22] K. D. Freeman-Cook, L. A. Reiter, M. C. Noe, A. S. Antipas, D. E. Danley, K. Datta, J. T. Downs, Sh. Eisenbeis, J. D. Eskra, D. J. Garmene, E.M. Greer, R. J. Griffiths, R. Guzman, J. R. Hardink, F. Janat, Ch. S. Jones, G. J. Martinelli, P. G. Mitchell, E. R. Laird, J. L. Liras, L.L. Lopresti-Morrow, J.Pandit, D. Reilly, D.Robertson, M. L. Vaughn-Bowser, L. A. Wolf-Gouveia and S. A. Yocuma . Potent, selective spiropyrrolidine pyrimidinetrione inhibitors of MMP-13. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007 ; **17** :6529–6534.
- [23] L. A. Reiter, K.D. Freeman-Cook, Ch. S. Jones, G. J. Martinelli, A. S. Antipas, M. A. Berliner, K. Datta, J. T. Downs, J. D. Eskra, M. D. Forman, E. M. Greer, R. Guzman, J.R. Hardink, F. Janat, N. F. Keene, E. R. Laird, J. L. Liras, L. L. Lopresti-Morrow, P.G. Mitchell, J. Pandit, D. Robertson, D.Sperger, M. L. Vaughn-Bowser, D. M. Wallera and Sue A. Yocuma . Potent, selective pyrimidinetrione-based inhibitors of MMP-13 .*Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* . 2006;**16**: 5822–5826.
- [24] J. A. Blagg, M. C. Noe, L. A. Wolf-Gouveia, L. A. Reiter, E. R. Laird, Sh.P. Chang, D. E. Danley, J.T. Downs, N. C. Elliott, J. D. Eskra, R.J. Griffiths, J. R. Hardink, A. I. Haugeto, Ch.S. Jones, J. L. Liras, L. L. Lopresti-Morrow, P. G. Mitchell, J.Pandit, R. P. Robinson, Ch. Subramanyam, M. L. Vaughn-Bowser and S. A. Yocum. Potent pyrimidinetrione-based inhibitors of MMP-13 with enhanced selectivity over MMP-14. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .2005; **15**: 1807–1810.
- [25] M.C. Noe, V. Natarajan, Sh.L. Snow, L. A. Wolf-Gouveia, P. G. Mitchell, L. Lopresti-Morrow, L.M. Reeves, S.A. Yocum, I. Otterness, M. A. Bliven, T. J. Carty, J. T. Barberia, F.J. Sweeney, J. L. Liras and Marcie Vaughn. Discovery of 3-OH-3-methylpipercolic hydroxamates: Potent orally active inhibitors of aggrecanase and MMP-13. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .2005; **15**: 3385–3388.

Références bibliographiques

- [26] J. Wu, T; S. Rush, R. Hotchandani, X. Du, M. Geck, E.Collins, Zh.Xu, J.Skotnicki, J. I. Levinb and F. E. Lovering . Identification of potent and selective MMP-13 inhibitors . *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .2005; **15**: 4105–4109.
- [27] Y. Hu, J. S. Xiang, M. J. DiGrandi, X. Du, M. Ipek, L. M. Laakso, J. Li, W. Li, T. S. Rush, J. Schmid, J. S. Skotnicki, S. Tam, J. R. Thomason, Q. Wangc and J.I. Levin. Potent , selective, and orally bioavailable matri metalloproteinase-13 inhibitors for the treatment of osteoarthritis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005; **13**: 6629–6644.
- [28] H. Nara , K.Sato, T. Naito, H. Mototani, H.i Oki, Y. Yamamoto, H. Kuno, T.Santou, N. Kanzaki, J. Terauchi, O. Uchikawa, M. Kori . Thieno[2,3-d]pyrimidine-2-carboxamides bearing a carboxybenzene group at 5-position: Highly potent, selective, and orally available MMP-13 inhibitors interacting with the S1'' binding site . *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2014; **22**: 5487–5505.
- [29] D. A.Gao , Z. Xiong , A. Heim-Riether , L. Amodeo , E. M.August , X. Cao , L.Ciccarelli , B.K. Collins , K. Harrington , K.Haverty , M. Hill-Drzewi , X.Li , Sh.Liang , S. M. Margarit , N. Moss , N. Nagaraja , J. Proudfoot , R.Roman , S.Schlyer , L. S. Keenan , S.Taylor , B. Wellenzohn , D. Wiedenmayer , J. Li , N. A. Farrow. SAR studies of non-zinc-chelating MMP-13 inhibitors: Improving selectivity and metabolic stability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .2010; **20**: 5039–5043.
- [30] A. Heim-Riether , S. J. Taylor , Sh. Liang , D.Amy G. , Z. Xiong , E. M. August , B. K. Collins , B. T. Farmer, K. Haverty , M.Hill-Drzewi , H.Junker , S. M. Margarit , N. Moss , T. Neumann , J. R. Proudfoot , L. S. Keenan , R. Sekul , Q.Zhang , J. Li , N. A. Farrow. Improving potency and selectivity of a new class of non-Zn-chelating MMP-13 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.2009; **19**: 5321–5324.
- [31] Ch. De Savi, A. D. Morley , A. Ting, I. Nash, K. Karabelas, Ch. M. Wood, M.James, S. J. Norris, G. Karoutchi, N. Rankine, G. Hamlin, Ph.A. MacFaul, D. Ryan, S.V. Baker, D. Hargreaves, S. Gerhardt. Selective non zinc binding inhibitors of MMP13. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .2011 ; **21**: 4215–4219.

Références bibliographiques

- [32] Ch. De Savi , A. D. Morley , I. Nash , G. Karoutchi , K. Page , A. Ting , S. Gerhardt. Lead optimisation of selective non-zinc binding inhibitors of MMP13. Part 2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2012; **22** : 271–277.
- [33] C.K. Engel, B. Pirard, S. Schimanski, R. Kirsch, J. Habermann, O. Klingler, V. Schlotte, K. U. Weithmann, and K. Ulrich Wendt. Structural Basis for the Highly Selective Inhibition of MMP-13 .*Chemistry & biology*.2005;**12**:181–189.
- [34] F. Louacheni. Développement d'un portail web pour le criblage virtuel sur la grille de calcul . <http://www.memoireonline.com/>. Master 2 Informatique 2013.
- [35] A. Grosdidier. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie 2007.
- [36] A. Chikhi .Calcul et modélisation des interactions peptide deformylase –substances antibactériennes a l'aide de technique de docking (amarrage) moléculaire (2007).
- [37] Protein Data Bank. [En ligne] www.rcsb.org/pdb/home/home.do . Consulté le 20/02/2016
- [38] C. A. Lipinski, F.Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* .1997; **23**: 3-25.
- [39] Calculation of Molecular Properties and Prediction of Bioactivity <http://www.molinspiration.com/> en ligne consulté le 03/05/2016.
- [40] E .Kellenberger , J.Rodrigo ,P. Muller , D.Rognan .Comparative Evaluation of Eight Docking Tools for Docking and Virtual Screening Accuracy. *Proteins: Structure,Function, and Bioinformatics*. 2004; **57**: 225-242.

Références bibliographiques

[41] A Chikhi ,A Bensegueni . Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Freeware. *Journal of Computer Science & Systems Biology* .2008 ; **1**: 081-086.

[42] [http ://www.sanjeevslab.org/tools.html](http://www.sanjeevslab.org/tools.html) en ligne consulté le 20/03/2016

[43] C .Selvaraj, S. Kumar Tripathi, K. konda Reddy and Sanjeev .K.Singh. Tool development for Prediction of pIC50 values from the IC50values - A pIC50 value calculator. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* .2011; **5**: 1104-1109.

[44] A. Chikhi, A. Bensegueni .In Silico Study of the Selective Inhibition of Bacterial Peptide Deformylases by Several Drugs. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*.2010; **3**: 061-065.

[45] H. Boucherit , A Chikhi, A.Bensegueni, A Merzoug, K.S Hioual, E h Mokrani. Theoretical study of the interactions involved in the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase by several molecules. *Computational Biology and Bioinformatics* .2014;**2**(5):63-73.

Annexes

Annexes 1

Liste des 100 complexes utilisés pour tester le programme Surfex par RMSD.

N°	Code complexe	ligand	RMSD
1	1EL3	I48	1.943
2	2YIG	5EL	1.312
3	3KEC	3KE	2.043
4	3LJZ	LA3	2.340
5	4Y2J	49G	0.532
6	3WV1	WHH	2.291
7	3WV3	WLL	1.712
8	74AB	3W4	3.276
9	4Y2P	3C5	2.065
10	4LQG	CTW	2.190
11	4MPW	2AJ	2.263
12	4MPX	2AV	2.108
13	4MQA	X00	2.154
14	4OEW	5IO	2.835
15	4OGB	2SR	0.787
16	4OME	DGQ	1.873
17	4PF7	2QW	1.837
18	4PFC	2QX	1.456
19	4R7L	SHH	1.063
20	4UF4	O2V	1.063
21	4W1O	3GJ	0.941
22	4XCU	3KQ	1.546
23	4WTU	3UT	0.518
24	4WY1	3VO	0.077
25	4WZV	E40	1.737
26	4XCT	N73	0.277
27	5AXP	4LK	1.540
28	5AXQ	4LP	1.183
29	5B25	4QJ	2.48
30	5BOT	4UM	0.967
31	5BOY	4UE	2.874
32	5BPA	4XF	2.093
33	5C1W	4XS	0.112
34	5C2A	4Y2	1.442
35	5C2E	4Y1	1.738
36	5C28	4XV	1.100
37	5C29	4XY	1.179
38	5CUH	LTQ	0.032
39	5DH4	5AV	1.450
40	5DH5	5AY	2.101
41	5EZX	5T5	0.278
42	5EZZ	5T6	2.358
43	5F00	5T8	0.354

Annexes

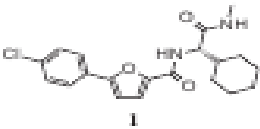
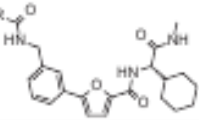









N°	Code complexe	ligand	RMSD
44	5F03	5TA	2.624
45	4Y2S	49P	0.096
46	5HDO	60Y	2.851
47	5HDU	60W	2.387
48	5HDV	60V	0.133
49	5HDX	60U	0.253
50	5HE7	60X	0.109
51	5ANS	RX8	1.822
52	5ANT	RJE	0.885
53	5EYC	5SZ	1.799
54	5EYD	5T1	0.562
55	4D4M	BKV	1.424
56	5F2S	5TZ	0.123
57	5F32	5V7	0.910
58	5F37	N5J	0.039
59	5F3C	5U8	2.632
60	5DQC	5E7	2.269
61	4MP2	PV1	0.096
62	4MP7	PFT	1.681
63	4MPC	PV2	1.755
64	4MPE	PV8	1.158
65	4MPN	PV0	1.399
66	3W2T	LFZ	1.783
67	4GE2	75A	1.775
68	4GE5	A89	1.801
69	3VJL	W94	4.227
70	3VJM	W61	1.634
71	3KWF	B1Q	0.072
72	4OQ6	2UV	1.037
73	4JP4	AZ4	1.365
74	4L2L	1V6	1.919
75	4IXU	381	1.464
76	4PNZ	2UH	5.043
77	4MS6	28T	1.005
78	4BZR	K2C	1.266
79	4CIA	6KZ	1.499
80	4CIB	NAG	0.075
81	4JZ1	F4D	1.551
82	3W6N	GNH	0.987
83	3W6O	GCP	2
84	4N8D	2KS	2.118
85	4N8E	2KV	1.716
86	5DOR	B1T	1.228
87	5HDO	60Y	2.851
88	5HDX	60U	0.253
89	4LKO	1WH	0.683
90	4HTX	19F	1.712

Annexes

N°	Code complexe	ligand	RMSD
91	4LXK	1YT	0.873
92	4BVB	AR6	1.252
93	4BVE	PEG	0.955
94	4BVH	QAD	1.432
95	4ZX4	4TL	1.123
96	5HX8	66P	1.901
97	5CSX	54J	1.714
98	5I3O	IDV	2.415
99	3QPU	POP	0.749
100	4A5S	N7F	1.662

Annexe 2

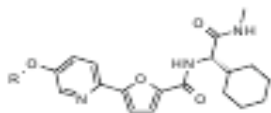
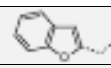



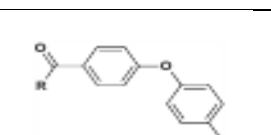


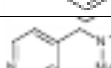

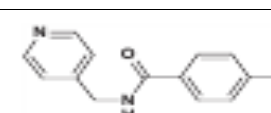


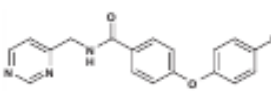


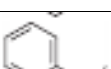
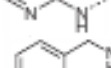
Structure de 66 inhibiteurs testés par SurfleX

[Radicale	IC ₅₀	Référence
 Composé 01		430nM	[29]
 Composé 02		100nM	[29]
Composé 03		3300nM	[29]
Composé 04		140nM	[29]
Composé 05		11nM	[29]
Composé 06		180nM	[29]
Composé 07		330nM	[29]
Composé 08		310nM	[29]
Composé 09		24nM	[29]
Composé 10		72nM	[29]

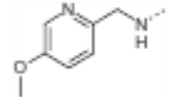
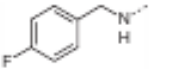
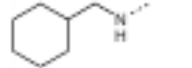



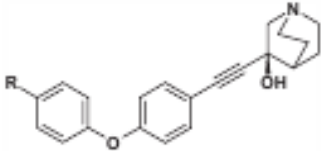
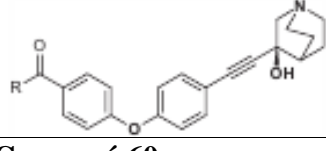
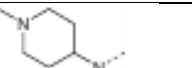
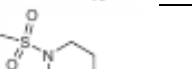
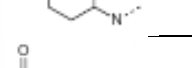
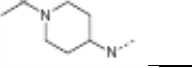

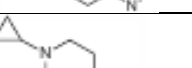
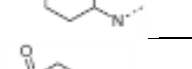
Annexes

Composé 11			14nM	[29]
Composé 12			42nM	[29]
Composé 13			31nM	[29]
Composé 14			4nM	[29]
Composé 15			100nM	[29]
Composé 16			29nM	[29]
Composé 17			27nM	[29]
	R	R'		
Composé 18			25nM	[29]
Composé 19			9nM	[29]
Composé 20			36nM	[29]
Composé 21			5nM	[29]
	Ar			
Composé 22			620nM	[30]
Composé 23			63nM	[30]
Composé 24			31nM	[30]
Composé 25			180nM	[30]
Composé 26			88nM	[30]
Composé 27			17nM	[30]
	R	X		[30]
Composé 28	cl	N	245nM	[30]

Annexes

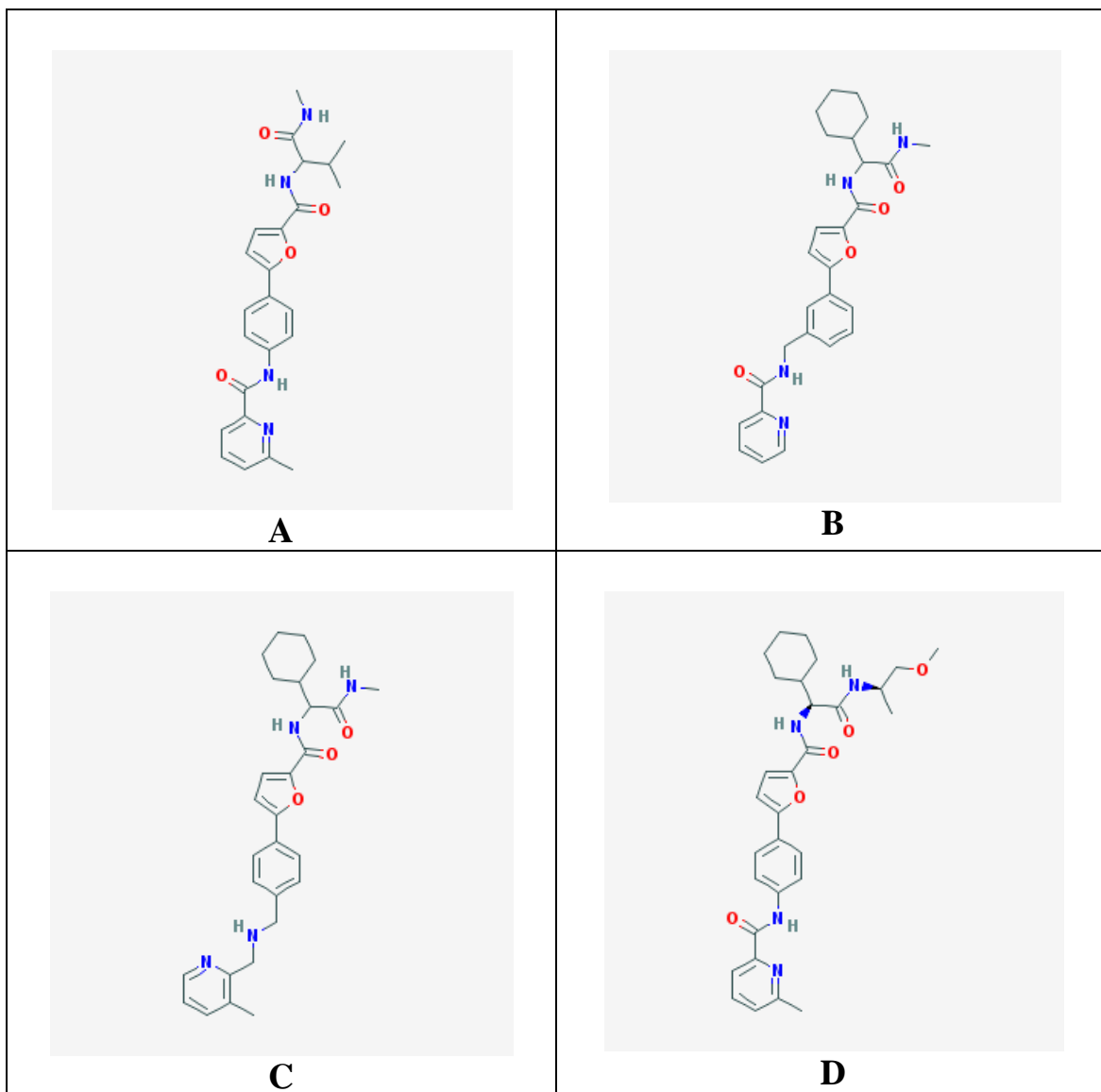
Composé 29	MeC(=o)NH-	CH	1550nM	[30]
Composé 30	MeSO ₂ NH-	CH	460nM	[30]
Composé 31	MeNH ₂ SO ₂ -	CH	480nM	[30]
Composé 32	H ₃ C-	CH	290nM	[30]
Composé 33	MeO-	CH	220nM	[30]
	R			[30]
Composé 34			6nM	[30]
Composé 35			40nM	[30]
Composé 36			2nM	[30]
Composé 37			4nM	[30]
	R		pIC ₅₀	
Composé 38			5	[31]
Composé 39			4,6	[31]
Composé 40			4,3	[31]
Composé 41			4,6	[31]
	R'			
Composé 42			4,7	[31]
Composé 43			5,3	[31]
				
Composé 44			5,5	[31]
				
Composé 45			6,5	[32]
Composé 46			7,5	[32]

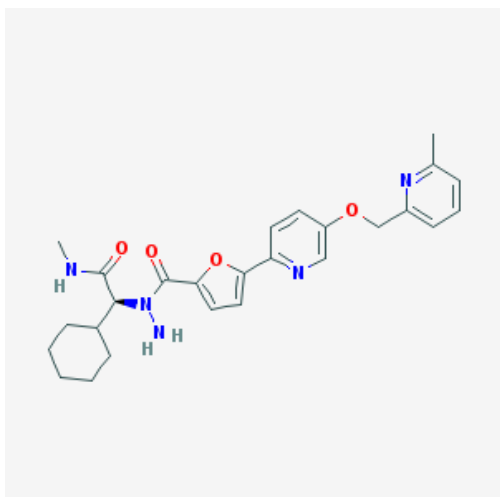
Annexes

Composé 47			7,5	[32]
Composé 48			7,0	[32]
Composé 49			7,0	[32]
Composé 50			7,0	[32]
Composé 51			7,3	[32]
Composé 52			6,7	[32]
				
Composé 53	CO ₂ H		5,3	[32]
Composé 54	CO ₂ Et		6,0	[32]
Composé 55	CONH ₂		6,2	[32]
Composé 56	CONHOMe		5,6	[32]
Composé 57	NHSO ₂ Me		5,6	[32]
Composé 58	SO ₂ Me		6,5	[32]
Composé 59	SO ₂ NHMe		7,0	[32]
				[32]
Composé 60			7,1	[32]
Composé 61			7,3	[32]
Composé 62			7,4	[32]
Composé 63			7,3	[32]
Composé 64			7,1	[32]
Composé 65			7,0	[32]
Composé 66			7,1	[32]

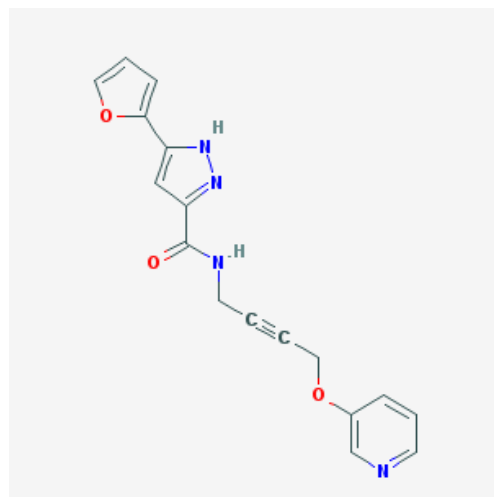
Annexe 3

Structure des 8 meilleurs similaires

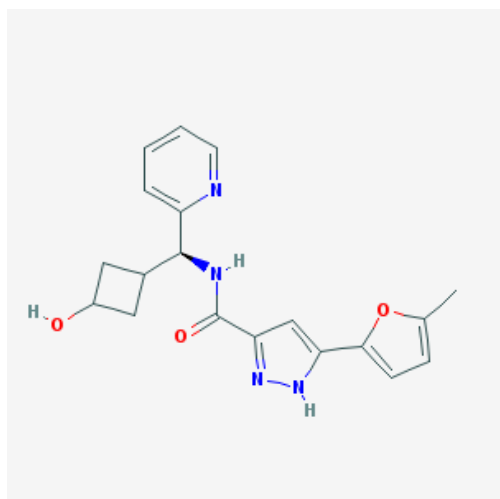




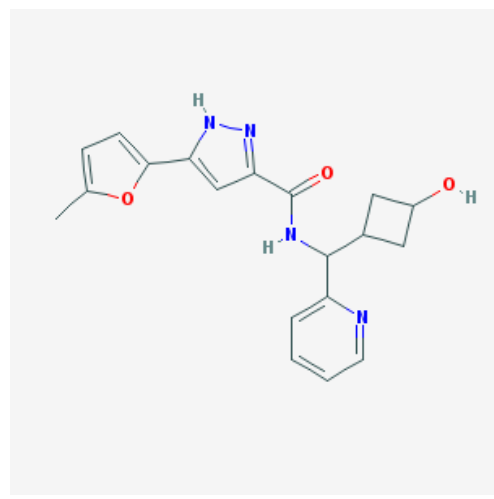
E



F



G



H

Résumé

Résumé

Résumé :

La modélisation moléculaire des interactions inhibiteur-protéine est une méthode utilisée en chimie pharmaceutique, pour la recherche des nouveaux médicaments en utilisant des programmes de docking moléculaire qui permettent de tester des milliers de molécules pour une cible déterminé.

Dans notre travail nous avons fait appel au programme surflex pour la recherche *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la MMP-13 ; une enzyme cible pour le traitement de la maladie de l'arthrose.

Les résultats du RMSD ($75\% \leq 2\text{\AA}$) accompagnés par une analyse visuelle, ainsi qu'un coefficient de corrélation de 0.68 ont montré la fiabilité du programme Surflex.

Le docking a été réalisé sur 234 molécules (similaires des meilleurs inhibiteurs ; composé 14 et composé 36 avec des scores de 5.12 et 5.16) proposée par la banque de données *PubChem*. D'après les résultats, nous avons sélectionné le composé A (CID 76807337) et le composé E (CID 117813931) présentant les meilleurs scores de 5.69 et 5.40 comme des nouveaux inhibiteurs théoriques plus puissants pour la MMP-13.

L'application de la règle de Lipinski sur ces 2 composés a permis l'évaluation de leurs propriétés pharmaco-dynamiques ADME qui sont apparus positifs.

Mots clés : Surflex, docking moléculaire, arthrose, MMP-13, inhibiteur, scores, Lipinski.

Abstract:

The molecular modeling of inhibitor-protein interactions is a method used in pharmaceutical chemistry for the research of new drugs using molecular docking programs that can test thousands of molecules for a specific target. In our work a surflex program was used for the research of the MMP-13 new more powerful inhibitors in silico; a target enzyme for the treatment of osteoarthritis disease. The results of the RMSD (75% $\leq 2\text{\AA}$) accompanied by a visual analysis as well as a correlation coefficient of 0.68 showed the reliability of Surflex program. The docking was performed on 234 molecules (similar inhibitors; compound 14 and compound 36 with the scores 5.12 and 5.16 respectively) proposed by the PubChem database. From the obtained results, compound A (CID 76807337) and Compound E (CID 117 813 931) with the highest scores of 5.69 and 5.40 respectively were selected as new more powerful theoretical inhibitors for MMP-13. The application of the Lipinski rule on these two compounds allowed the evaluation of their pharmacodynamic properties ADME that appeared positive.

Keywords: Surflex, molecular docking, osteoarthritis, MMP-13 inhibitor, scores, Lipinski.

الملخص:

النمذجة الجزيئية للتفاعلات (بروتين- مثبط) هو وسيلة تستخدم في الكيمياء الصيدلانية لاكتشاف أدوية جديدة باستخدام برامج الإرساء الجزيئية التي تسمح باختبار آلاف الجزيئات من اجل إنزيم مستهدف.

وقد استخدمنا في عملنا برنامج سيرفلاكس (surflex) من اجل البحث عن مثبطات جديدة فعالة لأنزيم MMP-13، الذي يعتبر إنزيم مستهدف في علاج هشاشة العظام . أثبتت نتائج RMSD ($2\text{Å} \leq 75\%$) مصحوبة بتحليل بصرية بالإضافة إلى معامل الارتباط يساوي 0.68 كفاءة برنامج surflex .

بتطبيق النمذجة الجزيئية على 234 جزيئه (شبيهة المثبطين الفعالين المركب 14 و المركب 36 بحصيلة تقدر ب 5.12 و 5.16) المقترحة من طرف قاعدة البيانات *PubChem* من النتائج المتحصل عليها قمنا باختيار المركبين: المركب A (CID76807337) والمركب E (CID117 813 931) اللذين أعطيا أفضل جاذبية محسنة للإنزيم مقدره ب 5.69 و 5.40 كمثبطات نظرية فعالة للإنزيم MMP-13.

تطبيق قاعدة ليبينسكي (Lipinski) على المركبين A و E أعطت نتائج ايجابية للخصائص ADME.

الكلمات المفتاحية برامج الارساء الجزيئية، سيرفلاكس، ، MMP-13 ، مثبط ، حصيلة ، ليبينسكي.

Simulation par docking moléculaire des interactions enzyme-inhibiteur : cas de la MMP-13

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en
Biochimie Moléculaire et Santé

Résumé :

La modélisation moléculaire des interactions inhibiteur-protéine est une méthode utilisée en chimie pharmaceutique, pour la recherche des nouveaux médicaments en utilisant des programmes de docking moléculaire qui permettent de tester des milliers de molécules pour une cible déterminée.

Dans notre travail nous avons fait appel au programme surflex pour la recherche *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la MMP-13 ; une enzyme cible pour le traitement de la maladie de l'arthrose.

Les résultats du RMSD ($75\% \leq 2\text{\AA}$) accompagnés par une analyse visuelle, ainsi qu'un coefficient de corrélation de 0.68 ont montré la fiabilité du programme Surflex.

Le docking a été réalisé sur 234 molécules (similaires des meilleurs inhibiteurs ; composé 14 et composé 36 avec des scores de 5.12 et 5.16) proposée par la banque de données *PubChem*. D'après les résultats, nous avons sélectionné le composé A (CID 76807337) et le composé E (CID 117813931) présentant les meilleurs scores de 5.69 et 5.40 comme des nouveaux inhibiteurs théoriques plus puissants pour la MMP-13.

L'application de la règle de Lipinski sur ces 2 composés a permis l'évaluation de leurs propriétés pharmaco-dynamiques ADME qui sont apparus positifs.

Mots clés : Surflex, docking moléculaire, arthrose, MMP-13, inhibiteur, scores, Lipinski.

Laboratoire de recherche :

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr. CHIKHI A. (Pr. Université des Frères Mentouri Constantine).

Rapporteur : Mr. BENSEGUENI A. (Pr. Université des Frères Mentouri Constantine).

Examineur : Mr. MOKRANI E.H. (M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine).

Date de soutenance : 05/06/2016

