



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET  
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1  
Faculté des sciences de la nature et de la vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

**Etude *in silico* de l'interaction du Tétrahydrocannabinol avec le récepteur  
cannabinoïde et la cyclo-oxygénase-2**

Présenté et soutenu publiquement

Le 04/07/2018

Par

BOULOUDANI Housseem Eddine

et

MESSAST Samir

***Jury***

Président du jury : CHIKHI .A

Pr .UFM Constantine

Rapporteur : BENSEGUENIA

Pr .UFM Constantine

Examineur : MOKRANI .E H

MAA. UFM Constantine

Année Universitaire

2017-2018

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail de mémoire de Master, nous tenons à remercier :

Tout d'abord, Monsieur BENSEGUENI ABD RAHMANE Professeur à l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1, l'encadreur de ce mémoire, pour son aide précieuse, ses conseils et pour le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer.

Un merci pour monsieur MOKRANI E H à la faculté des science de la nature et de la vie, université de constantine 1

Nous rendons un vibrant hommage aux membres du jury de ce mémoire qui ont accepté d'évaluer ce travail :

Un merci particulier à notre président de jury, Professeur CHIKHI A, de nous avoir faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de mémoire.

Nous adressons également nos remerciements, à tous nos enseignants, qui nous ont données les bases de la science. nos remerciements s'étendent également à tous les professeurs que nous avons eus durant nos années d'études.

Nous adressons également nos remerciements, à tous nos amis de la promotion pour leur sympathie et leur soutien moral tout le long de ces années d'étude.

Nous remercions également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous

Je dédie ce modeste travail

A mon père qui a toujours sacrifié sa vie pour que

J'atteigne ce niveau-là.

A ma mère qui se brûle pour allumer mon chemin, celle qui a passé sa vie à m'éduquer et à me guider vers la réussite jour après jour

A ma chère sœur

A mon binôme : MESSAST SAMIR

A tous mes amis.

A mon chère encadreur bensegueni A et Mr MokraniM

A tous mes enseignants ainsi que tous mes collègues de ma promotion de master

BOULLOUDANI HOUSSEM EDDINE

Je dédie ce modeste travail

A mon père Youcef qui a toujours sacrifié sa vie pour que

J'atteigne ce niveau-là.

A ma mère Fatiha qui se brule pour allumer mon chemin, celle qui a passé sa vie à m'éduquer et à me guider vers la réussite jour après jour

A ma chère femme Amina

A mon chère frère Mounir

A mes chères sœurs :

Siham et son mari Kamel et leurs enfants : Nada et Adem

Naima et son mari Abdel Ali et leurs enfants: Ayad, Ayhem et Anwar

Fouzia et son mari Mounir et son enfant Aness

A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines

A mon binôme : BOULLOUDANI Housseem Eddine

A mes meilleurs amis.

Abdelhak, Abdelhafide , Nacereddine, Hichem et tous les membres de LRPS CNE et de section biologie

A mon chère encadreur Bensegueni A et Mr Mokrani E H

A tous mes enseignants ainsi que tous mes collègues de ma promotion de master

**MESSAST Samir**

# Table des matières

<i>Introduction</i>	01
<i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	02
<i>Chapitre N° 1 La plante</i>	02
1. Aspect botanique	02
1.2. Synonymes	02
1.3. Description botanique	02
2. Phénotypes	03
2.1. Chanvre cultivé ou « sativa »	03
2.2. Cannabis indica	03
2.3. Chanvre sauvage ou « ruderalis »	04
<i>Chapitre N° 2 Phytocannabinoïdes</i>	05
1. Différentes Classes Phytocannabinoïdes	05
2. Le $\Delta 9$ Tétrahydrocannabinol	06
2.1. Structure	06
2.2. Distribution dans les plantes et ses produits dérivés	06
2.3. Les paramètres pharmacocinétiques du THC	06
2.4. Les récepteurs du THC	07
2.4.1. Le récepteur Cb1	08
2.4.2. Le récepteur Cb2	08
2.5. Métabolisme des cannabinoïdes	09
<i>Chapitre N° 3 Effets bénéfiques et indésirables du THC</i>	12
1. Effets indésirables des médicaments à base de THC	12
1.1. La schizophrénie	12
1.2. La psychose	12
1.3. Effets sur la cognition et la mémoire	13
1.4. Effets sur l'humeur	13
1.5. Effets sur la fonction motrice	14
2. Effets bénéfiques de la médecine basée sur la THC	14
2.1. Effet antiémétique	14
2.2. Régulation de l'appétit	15
2.3. Soulagement de la douleur	16
2.4. La sclérose en plaques et d'autres troubles caractérisés par la spasticité	17
2.5. Régulation du cycle cellulaire et traitement du cancer	17
2.6. Pression intraoculaire élevée	18

<b>2.7. Effets anti-inflammatoires</b>	<b>19</b>
<b><i>Chapitre N°04 L'enzyme</i></b>	<b>20</b>
<b>1. Structures des gènes COX-2</b>	<b>20</b>
<b>2. Régulation de l'expression des gènes COX-2</b>	<b>21</b>
<b>3. Structure</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Structure Primaire</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Domaine de liaison à la membrane</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Domaine catalytique</b>	<b>22</b>
<b>3.4. Activité enzymatique</b>	<b>24</b>
<b>4. Mécanismes d'inhibition des cyclo-oxygenases</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Inhibition irréversible des cyclo-oxygénases</b>	<b>25</b>
<b>4.2. Inhibition réversible des cyclo-oxygénases</b>	<b>25</b>
<b><i>Chapitre N° 5 : Docking Moléculaire</i></b>	<b>26</b>
<b>1. Définition</b>	<b>27</b>
<b>2. L'approche combinatoire</b>	<b>27</b>
<b>3. L'approche stochastique</b>	<b>28</b>
<b>4. L'approche déterministe</b>	<b>29</b>
<b>5. Applications</b>	<b>30</b>
<b>6. Programmes utilisés « surflex »</b>	<b>31</b>
<b><i>PARTIE PRATIQUE</i></b>	<b>33</b>
<b><i>1 Matériel et méthodes</i></b>	<b>33</b>
<b>1.1. Matériels</b>	<b>33</b>
<b>1.2. Méthodes</b>	<b>33</b>
<b>1.2.1. Préparation des Ligands</b>	<b>33</b>
<b>1.2.2. Préparation de l'enzyme et de récepteur</b>	<b>34</b>
<b>1.2.2.1 Obtention des structures</b>	<b>34</b>
<b>1.2.2.2. Préparation de l'enzyme</b>	<b>35</b>
<b>1.2.2.3. Préparation de récepteur</b>	<b>35</b>

<b>1.2.3. Génération du protomol</b>	<b>36</b>
<b>1.2.4. Docking Moléculaire</b>	<b>37</b>
<b>1.2.5. Règle de Lipinski</b>	<b>38</b>
<b><i>2 Résultats et discussion</i></b>	<b>40</b>
<b>2.1. Fiabilité du programme Surflex-Dock</b>	<b>40</b>
<b>2.2. Etude des interactions du THC-COX-2 et THC-Cb1</b>	<b>43</b>
<b>2.2.1. Etude des interactions THC-Cb1</b>	<b>44</b>
<b>2.2.2. Etude des interactions THC-COX-2</b>	<b>45</b>
<b>2.3. Les mono et Bi substitutions du THC</b>	<b>47</b>
<b>2.3.1. L'interaction avec composé N°58</b>	<b>55</b>
<b>2.3.1.1. L'interaction avec COX2</b>	<b>55</b>
<b>2.3.1.2. L'interaction avec Cb1</b>	<b>56</b>
<b>2.3.2. L'interaction avec composé N°59</b>	<b>58</b>
<b>2.3.2.1. L'interaction avec COX-2</b>	<b>58</b>
<b>2.3.2.2. L'interaction avec Cb1</b>	<b>59</b>
<b>2.3.3. L'interaction avec composé N°67</b>	<b>61</b>
<b>2.3.3.1. L'interaction avec COX-2</b>	<b>61</b>
<b>2.3.3.2. L'interaction avec Cb1</b>	<b>62</b>
<b>2.4. Règle de Lipinski</b>	<b>64</b>
<b>Conclusion</b>	
<b>Références bibliographiques</b>	

# Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
<b>Figure N° 01</b> : Aspects morphologiques de <i>Cannabis sativa</i> L	<b>04</b>
<b>Figure N° 02</b> : Structure chimique du THC	<b>06</b>
<b>Figure N° 03</b> : Structure moléculaire des récepteurs cannabinoïdes Cb1 et Cb2	<b>08</b>
<b>Figure N° 04</b> : distribution des récepteurs cannabinoïdes	<b>09</b>
<b>Figure N° 05</b> :Structures des principaux cannabinoïdes	<b>10</b>
<b>Figure N° 06</b> :Principales voies métaboliques du $\Delta^9$ -THC chez l'homme	<b>11</b>
<b>Figure N° 07</b> :Représentation schématique des voies de signalisation associées à l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes induite par ses agonistes	<b>18</b>
<b>Figure N°08</b> : Structure des gènes de COX-1 et de COX-2 humains et représentation schématique de leurs transcrits (ARNm)	<b>20</b>
<b>Figure N° 09</b> : Eléments de régulation au niveau des promoteurs des gènes COX-2	<b>21</b>
<b>Figure N°10</b> : Structure de la PGHS-1 ovine	<b>23</b>
<b>Figure N° 11</b> : Interrelations cyclooxygénase - peroxydase et résidus importants	<b>24</b>
<b>Figure N°12</b> : Représentation par VMD de la protéine 3NT1 avec le ligand pdb NPS positionné dans la cavité catalytique	<b>34</b>
<b>Figure N°13</b> : Représentation par VMD du récepteur 5XRA avec le ligand pdb 8D3 positionné dans la cavité catalytique	<b>35</b>
<b>Figure N°14</b> : Protomol généré pour le complexe 3NT1	<b>36</b>
<b>Figure N°15</b> : Protomol généré pour le complexe 5XRA	<b>37</b>
<b>Figure N°16</b> : Représentation de l'interface du serveur Molinspiration pour le calcul des paramètres décrits par Lipinski	<b>39</b>
<b>Figure N°17</b> : Résultats en % obtenus par Surfex à deux intervalles de RMSD (Å)	<b>43</b>
<b>Figure N°18</b> : Représentation du positionnement THC dans le site actif du récepteur des cannabinoïdes	<b>44</b>
<b>Figure N°19</b> : Représentation du positionnement THC dans le site actif du récepteur des cannabinoïdes	<b>45</b>



<b>Figure N°20</b> : Représentation du positionnement THC dans le site actif du cyclooxygénase	<b>46</b>
<b>Figure N°21</b> : Représentation du positionnement THC dans le site actif du cyclooxygénase	<b>46</b>
<b>Figure N°22</b> : Structure de la molécule de base	<b>47</b>
<b>Figure N° 23</b> : Structure des trois meilleurs dérivés du THC	<b>54</b>
<b>Figure N°24</b> : Représentation du positionnement du composé N58 dans le site actif de laCOX-2	<b>55</b>
<b>Figure N°25</b> : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°58 et le site actif de la COX-2	<b>56</b>
<b>Figure N° 26</b> : Représentation du positionnement du composé N°58 dans le site actif de la Cb1	<b>57</b>
<b>Figure N° 27</b> : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°58 et le site actif de la Cb1	<b>57</b>
<b>Figure N° 28</b> : Représentation du positionnement du composé N59 dans le site actif de la COX-2	<b>58</b>
<b>Figure N° 29</b> : Analyse visuelle des liaisons hydrophobes entre le composé N59 et le site actif de la COX-2	<b>59</b>
<b>Figure N° 30</b> : Représentation du positionnement du composé N59 dans le site actif de la Cb1	<b>60</b>
<b>Figure N° 31</b> : Analyse visuelle des liaisons hydrogènes et hydrophobes entre le composé N59 et le site actif de récepteur Cb1	<b>60</b>
<b>Figure N° 32</b> : Représentation du positionnement du composé N°67 dans le site actif de la Cox-2	<b>61</b>
<b>Figure N° 33</b> : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°67 et le site actif de la COX-2	<b>62</b>
<b>Figure N° 34</b> : Représentation du positionnement du composé N°67 dans le site actif de la Cb1	<b>63</b>
<b>Figure N° 35</b> : Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°67 et le site actif de la Cb1	<b>63</b>

## Liste des Tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
<b>Tableau N°1.</b> Paramètres cinétiques du THC chez L'homme	<b>07</b>
<b>Tableau N°2.</b> Résultats de test de fiabilité du programme par le RMSD	<b>40</b>
<b>Tableau N°3.</b> Résultats de la mono substitution	<b>48</b>
<b>Tableau N°4.</b> Résultats de la Bi substitution	<b>51</b>
<b>Tableau N°5.</b> Propriété pharmacocinétiques (ADME) des trois meilleurs composés issues de la mono substitution	<b>64</b>

# Liste des abréviations

**2-AG** : 2-arachidonoylglycérol

**3D**: Trois dimensions.

**Å**: Angström.

**AEA** : Anandamide

**AIED** : Association internationale pour l'étude de la douleur.

**COX** : cyclooxygénase

**CB1** : Récepteur cannabinoïdes 1.

**CB2** : Récepteur cannabinoïdes2.

**CBD**: Cannabidiol.

**GABA**: Gamma-Aminobutyric Acid.

**MBC**: Menthol Borate Cocaine

**NPS** : Net Promoter Score.

**OMS**: Organisation Mondiale De La Sante.

**PDB**: Protein Data Bank.

**RMSD**: Root Mean Square Deviation.

**SEC** : Le système endocannabinoïdes.

**SEP** : La sclérose en plaques.

**SNC** : Système nerveux central.

**THC** : Tétrahydrocannabinol.

**TRPV1** : The transientreceptorpotential cation channelsubfamily v number 1(famille de canaux récepteurs transitoires potentiels).

**UNODC**: Office des Nations Unies contre la drogue et le crime.

**Partie**  
**bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **La plante**

## Introduction

Environ un quart de milliard de personnes dans le monde consomment des stupéfiants selon le rapport mondial sur les drogues publié le 22 juin 2017. Selon l'office national de la lutte contre la drogue en Algérie plus de 400 000 de personnes consomment les drogues.

Les cannabinoïdes sont le type de stupéfiants les plus nocif et représentent un impact négatif sur la santé dû aux troubles liés à la consommation de drogues dans le monde entier.

Ils sont classés stupéfiants par la convention de Genève en 1925 et en Algérie selon la loi de la prévention des stupéfiants et des substances psychotropes et la suppression de leur usage illicite et de leur trafic.

La recherche en biologie ne peut actuellement se passer des outils informatiques pour traiter le flot de données produites et optimiser ses avancées. L'un de ces outils est la modélisation moléculaire et plus précisément l'arrimage moléculaire (plus souvent connu sous le terme anglo-saxon "docking"). L'emploi initial du "docking" moléculaire a été de prédire et reproduire des complexes protéine-ligand [1,2].

L'objectif de ce travail est d'effectuer un docking moléculaire entre une protéine (enzyme ou récepteur) et un ligand qui est un inhibiteur dans le cas de l'enzyme. Il s'agit la d'une approche "in silico" de la biologie traditionnelle qui complète les approches classiques "in situ" (dans le milieu naturel), "in vivo" (dans l'organisme vivant) et "in vitro" (en éprouvette).

Dans un premier temps nous allons réaliser un test de fiabilité du programme de docking surflex.

Dans l'étude réalisée ici la protéine est une cyclo-oxygénase-2 (COX-2) enzyme permettant la formation des prostanoïdes (prostaglandine et thromboxanes) à partir de l'acide arachidonique, une autre protéine utilisée dans ce travail est le récepteur membranaire couplé à la protéine G retrouvé principalement dans cerveau et la moelle épinière impliqué dans les effets psychotrope des cannabinoïdes c'est le Cb1. Le ligand est le cannabinoïde le plus abondant et le plus présent dans la plante de cannabis c'est le -9-tétrahydrocannabinol qui peut jouer un rôle bénéfique anti-inflammatoire en inhibant de l'enzyme COX-2 mais aussi un rôle néfaste stupéfiant par activation du récepteur Cb1.

Par cette étude, nous tenteras de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux de la liaison entre les cibles protéiques et le ligand afin d'améliorer le rôle bénéfique et diminuer l'effet néfaste du THC en faisant appel à la méthode d'arrimage moléculaire.

## Chapitre 1 : La Plante *Cannabis sativa* L.

### 1.1. Aspect botanique

Le cannabis est un genre botanique qui rassemble des plantes annuelles de la famille des Cannabaceae. Ce sont toutes des plantes originaires d'Asie centrale ou d'Asie du Sud.

Le cannabis est généralement considéré comme une plante mono spécifique (*Cannabis sativa* L.), divisée en plusieurs sous espèces (*C. sativa* ssp. *sativa*, *C. sativa* ssp. *indica*, *C. sativa* ssp. *ruderalis*, *C. sativa* ssp. *spontanea*, et *C. sativa* ssp. *kafiristanca*) [3]. Cependant, les distinctions chimiques et morphologiques selon lesquelles le cannabis a été divisé en ces sous-espèces ne sont souvent pas très claires, semblent modifiables en fonction de l'environnement et varient de manière continue. Dans la plupart des cas, il suffit d'appliquer le nom de *Cannabis sativa* à toutes les plantes de cannabis que l'on rencontre [3].

Dans la plante les molécules les plus importants quantitativement sont le delta -9 Tétrahydrocannabinol et le Cannabidiol (CBD).

#### 1.1.2. Synonymes

Il existe de nombreux noms locaux ou vernaculaires et divers synonymes pour nommer le cannabis, et il n'est pas du registre de ce manuel de les fournir tous. Parmi ceux-ci, on retiendra: chanvre, marie-jeanne, beuh, gandia, herbe, chenevis pour n'en nommer que quelques-uns [4].

#### 1.1.3. Description Botanique

Même si le cannabis est parmi les espèces de plantes les plus anciennement cultivées et largement diffusés dans l'histoire humaine, sa taxonomie est encore en discussion [5].

Le cannabis était autrefois placé avec les orties dans la famille des Urticaceae ou avec les mûres dans la famille des Moraceae. Aujourd'hui, les houblons (*Humulus*) sont jugés les plus proches du cannabis et sont maintenant les seuls représentants de la famille des Cannabineae [4]. Certains botanistes plaident en faveur d'une classification polytypique du cannabis, et distinguent trois espèces différentes qui sont géographiquement isolés : *Cannabis sativa*, *Cannabis indica*, et *Cannabis ruderalis* [6].

La plupart des scientifiques considèrent toutefois que le cannabis est une espèce mono spécifique constituée de souches différentes qui finissent par appartenir à une même espèce :

*Cannabis sativa* L. Ces différentes souches ou sous-espèces, comprennent : *C. sativa*ssp. *sativa*, *C. sativa*ssp. *indica*, *C. sativa*ssp. *ruderalis*, *C. sativa*ssp. *spontanea*, et *C. sativa*ssp. *Kafiristanca* [3].

Le cannabis est une plante annuelle à fleurs dioïques. Les plantes à étamines (males) sont généralement plus grandes mais moins robustes que les plantes à pistils (femelles). Les tiges sont droites et peuvent varier entre 0,2 et 6 m de hauteur. Cependant, la plupart des plantes n'atteignent que 1 à 3 m. Le degré de ramification, tout comme la hauteur des plantes, dépend de facteurs environnementaux et héréditaires ainsi que de la méthode de culture (**Figure1**)

De plus ces différentes sous espèces peuvent se croiser. C'est les raisons pour lesquelles le nom En conséquence, les plantes appartenant à différentes sous espèces sont souvent difficiles à distinguer les unes des autres. *Cannabis sativa* est souvent appliqué à toutes les plantes de cannabis [4].

## 1.2. Phénotypes

### 1.2.1. Chanvre cultivé ou « *sativa* »

Ce phénotype dit *Cannabis sativa* L. est synonyme de *Cannabis sativa* subsp. *sativa*. C'est une plante appelée dans le langage commun selon son usage chanvre cultivé ou *sativa*[7]. Elle provient des régions équatoriales. Elle atteint en quelques mois une hauteur de plusieurs mètres et jusqu'à plus de 6 mètres. Les folioles de ses feuilles sont fines et la plante est peu ramifiée.

### 1.2.2. *Cannabis indica*

Le phénotype *Cannabis indica* Lam est couramment appelée chanvre indien [8]. La plante est originaire des régions himalayennes du nord de l'Inde sa concentration en principes actifs dépend du climat et de l'environnement dans lesquels la plante a évolué [9]. Elle se caractérise physiquement par des pales larges, une ramification assez importante et une stature moyenne qui ne dépasse jamais les 3 mètres, sa tige est souple et presque pleine.



### 1.2.3. Chanvre sauvage ou « ruderalis »

Le phénotype *Cannabis ruderalis* est appelé couramment chanvre sauvage [6]. Elle supporte des climats assez froids et des conditions environnementales difficiles, sa stature est petite ne dépassant pas les 1 m de hauteur et n'est pratiquement pas ramifiée, souvent à tige unique. Sa teneur en THC n'excède pas les 0,5 %.



A- Inflorescence de la plante mâle 7 Fleur à pistil mettant en évidence l'ovaire (à étamines) (section longitudinale)  
 B- Plante femelle (à pistil) fructifère 8 Graine (akène\*) avec bractée  
 01- Fleur à étamines 9 Graine sans bractée  
 02 - Étamine (anthère et filament court) 10 Graine (vue latérale)  
 03- Étamine 11 Graine (coupe transversale)  
 04- Grains de pollen 12 Graine (coupe longitudinale)  
 05- Fleur à pistils avec bractée 13 Graine sans péricarpe (pelée)  
 06- Fleur à pistils sans bractée

07- Fleur à pistil mettant en évidence (l'ovaire section longitudinale)  
 08-Graine (akène) avec bractée  
 09-Graine sans bractée  
 10-Graine (vue latérale)  
 11-Graine (coupe transversale)  
 12-Graine (coupe longitudinale)  
 13-Graine sans péricarpe (pelée)

**Figure 1.** Aspects morphologiques de *Cannabis sativa* L.

# **Chapitre 2**

## **Phytocannabinoïdes**

## Chapitre 2 : Phytocannabinoïdes

### 2.1. Différentes Classes Phytocannabinoïdes

Cannabis sativa est une plante de avec une composition unique: environ 400 à 500 composés ont été détectés exclusivement dans cette plante. Parmi eux, environ 70 à 80 composés sont des terpeno-phénol nommés collectivement Phytocannabinoïdes [7].

Ces phytocannabinoïdes sont des métabolites secondaires de la plante. Ils induisent différentes réponses corporelles associées à la consommation du cannabis [9]. Ces phytocannabinoïdes doivent être distingués des endocannabinoïdes (présents chez l'homme et les animaux) et les cannabinoïdes synthétiques (fabriqués) [9].

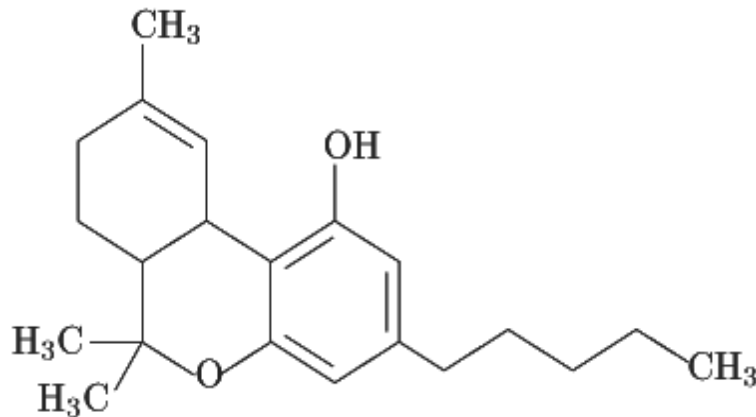
Sur la base de leur structure chimique, [10] les cannabinoïdes végétaux sont divisés en dix catégories. Les principaux constituants du cannabis sont le delta -9 Tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) qui nous intéresse dans cette étude et le Cannabidiol (CBD) [11]. Le  $\Delta^9$ -THC est plus connu pour ses propriétés psychotropes, agissant sur les deux types de récepteurs CB1 et CB2 du SEC. Les deux sous-groupes, le cannabinoïde (CBN) et le cannabichromène (CBC) sont soupçonnés d'avoir des effets semblables à ceux du  $\Delta^9$ -THC [11]. Le CBD, d'autre part, est non psychotrope et a une faible affinité avec les deux types de récepteurs, mais se présente comme un puissant antagonistes des Cb1 et Cb2 agonistes [11]. Les composés tels que CBN et cannabigerol (CBG) sont aussi des constituants non psychotropes du cannabis. Les plantes de cannabis contiennent à l'état frais (non-séchées) les cannabinoïdes sous forme d'acides carboxyliques, qui peuvent être ensuite transformés par décarboxylation après chauffage pour obtenir l'état actif  $\Delta^9$ -THC [11]. Comme mentionné précédemment, il existe d'extraordinaire variété de plantes de cannabis, tant dans leur composition chimique que dans leurs morphologies, ceci dépend de la souche, des conditions environnementales, et des méthodes de culture [3, 4,5]. De manière générale, le  $\Delta^9$ -THC et le CBD sont les principaux constituants.

Les raisons de cette synthèse unique et du stockage des Phytocannabinoïdes sont inconnues, mais selon une hypothèse, ils participent à des événements physiologiquement pertinents tels que une défense contre les pathogènes (CBD, CBG, et leurs acides sont des antibiotiques puissants) et contre les herbivores (via leurs actions psychotropes) [8].

## 2.2. Le $\Delta^9$ Tétrahydrocannabinol

### 2.2.1. Structure

Le  $\Delta^9$ -tétrahydrocannabinol (THC)  $C_{21}H_{30}O_2$  à l'origine des propriétés psychoactives du chanvre, Cette molécule, caractérisée du genre *Cannabis* dérivé du benzopyrane, non azotés (il ne s'agit pas d'alcaloïdes), porteur d'une fonction phénol.



**Figure 2.** Structure chimique du THC.

### 2.2.2. Distribution dans les plantes et ses produits dérivés

La teneur en THC varie en fonction de la partie de la plante [12]:

- 10 à 12 % dans les fleurs à pistils
- 1 à 2 % dans les feuilles
- 0,1 à 0,3 % dans les tiges

< 0,03 % dans les racines.

La teneur en THC peut varier de 4 à 21 %, selon les conditions de culture et les méthodes de production, alors que l'extraction à partir de résine et/ou de sommités fleuries peut donner de l'huile de cannabis ayant une concentration de THC allant jusqu'à 60 % [13].

### 2.2.3. Les paramètres pharmacocinétiques du THC

Les cannabinoïdes vont subir une métabolisation dans l'organisme. Ils sont caractérisés par une forte lipophile expliquant leur tropisme pour les tissus riches en lipides et leur important volume de distribution (**Tableau 1**).

**Tableau 1.** Paramètres cinétiques du THC chez l'homme [14].

	<b>Inhalation</b>	<b>Ingestion</b>
<b>Résorption (%)</b>	10 à 50	1 à 10
<b>Pic plasmatique (min)</b>	7 à 8	45
<b>Pic plasmatique moyen (ng/mL).</b>	Usage isolé: 8 à 10	2 à 4
	Usage chronique: 50 à 200	2 à 3
<b>Effet maximum (min)</b>	20 à 30	
<b>Volume de distribution (L/kg)</b>	5 à 15	
<b>Liaison protéique (%)</b>	99	
<b>Métabolisme</b>	Presque total (99% de la dose de THC) hépatique par systèmes microsomaux, avec hydroxylation en alcools variés (dont certains psycho actifs) réduits par des déshydrogénases	
<b>Élimination (%)</b>	Fécale : 30 à 50% en trois jours, avec cycle entérohépatique. Urinaire : 10 à 15% en trois jours, avec filtration rénale et réabsorption. (les 20% demeurant dans l'organisme sont éliminés en deux à trois mois chez un usager chronique)	
<b>Demi-vie</b>	Usage isolé : 20 à 60 heures	
	Usage chronique : 20 à 30 heures	

#### 2.2.4. Les récepteurs du THC

En 1987, il a été démontré pour la première fois que la plupart des effets attribués aux cannabinoïdes sont dus à leur liaison à des récepteurs spécifiques. Les récepteurs cannabinoïdes identifiés à ce jour (**Figure 03**), sont de type I (**Cb1**) et de type II (**Cb2**), et se situent principalement sur les membranes des cellules du cerveau et de la moelle épinière. Ils sont également présents sur les cellules du cœur, de l'intestin, des poumons, des voies urinaires, de l'utérus, des testicules, des glandes internes, de la rate et des globules blancs (**Figure 04**). Selon l'endroit où se trouvent ces récepteurs, leur activation va provoquer des effets très différents, par exemple une inhibition des voies nerveuses véhiculant la douleur, une inhibition du processus inflammatoire, une modification de la perception du temps, un sentiment d'euphorie et d'autres effets [15].

### 2.2.4.1. Le récepteur CB1

En 1990, Matsuda et coll. ont publié le séquençage du premier récepteur du cannabis chez le rat, c'est un récepteur membranaire classique (comportant 473 acides aminés) à sept traversées, interagissant avec les protéines G et comportant plusieurs sites potentiels de glycosylation [16]. Le récepteur Cb1 est retrouvé principalement dans le cerveau et la moelle épinière, et en petites quantités dans quelques organes périphériques : utérus, gonade, cœur, rate [17].

La liaison de l'anandamine (AEA) au récepteur Cb1 entraîne une inhibition de l'adénylcyclase via la protéine Gi et une activation des MAP kinases via les sous unités  $\beta\delta$ . De plus, les cannabinoïdes modulent les canaux potassiques dans l'hippocampe et les canaux calciques dans le ganglion cervical supérieur [18].

### 2.2.4.2-Le récepteur CB2

Munro et coll [19] ont découvert dans une lignée monocyttaire, un deuxième type de récepteur de cannabis (Cb2), présent sur les globules blancs des animaux et de l'homme, et qui serait impliqué dans les effets immunosuppresseurs du cannabis. Possédant 44% d'identité de séquences en aminoacides avec le récepteur Cb1, il est absent du système nerveux central, se retrouvant principalement au niveau sanguin : lymphocytes B, « Natural killer » monocytes,34 lymphocytes T. Comme ils le font au niveau des récepteurs Cb1, les cannabinoïdes agissent, via le récepteur Cb2, en inhibant l'adénylcyclase et en activant la cascade des MAP kinases. [18]

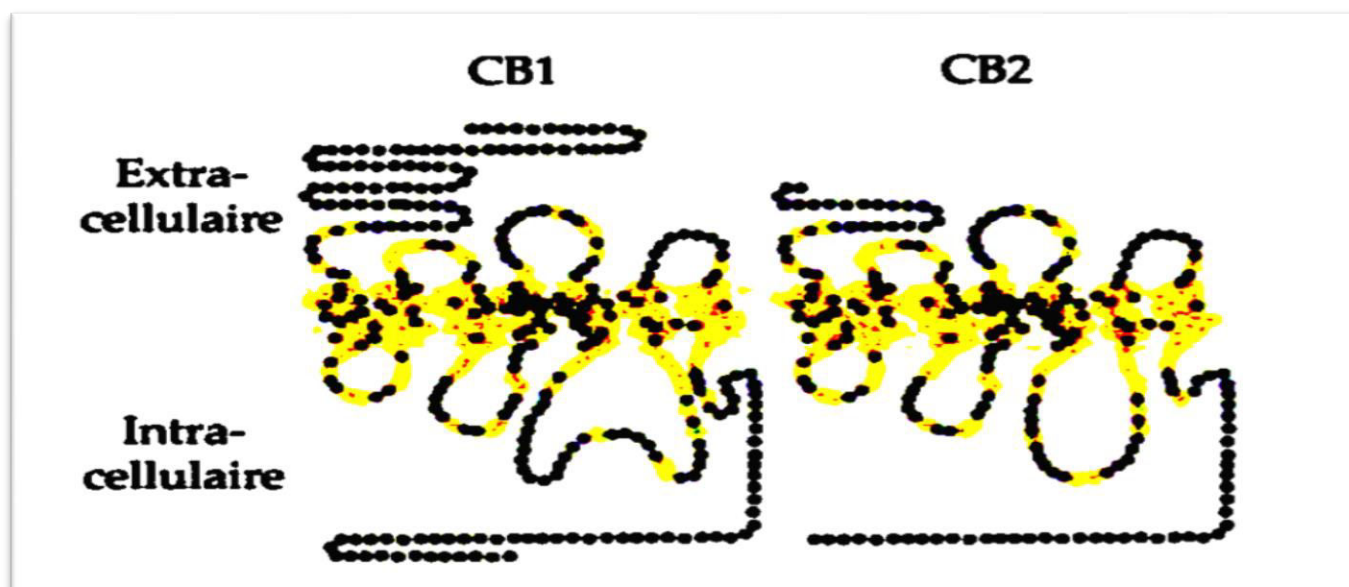
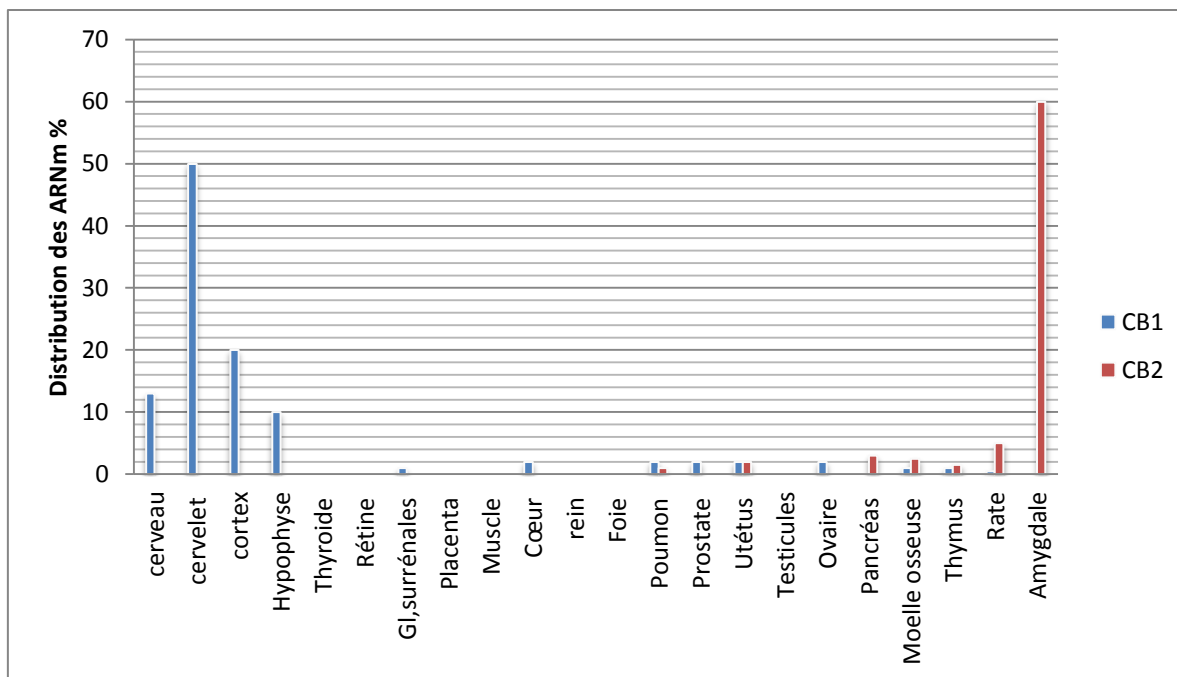


Figure 03. Structure moléculaire des récepteurs cannabinoïdes CB1 et CB2



1

**Figure 04. Distributions des récepteurs cannabinoïdes.**

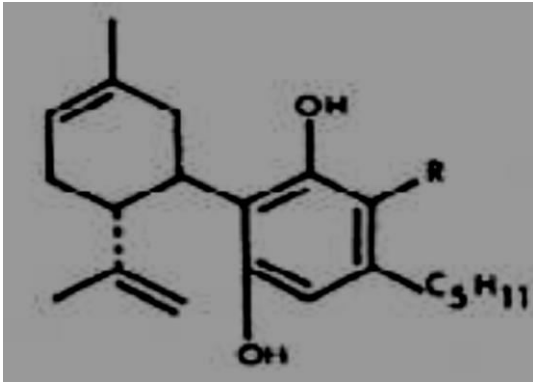
### 2.2.5. Métabolisme du THC

Au départ, on trouve une substance banale dans le règne végétal : le limonène ou l'essence de Citron. Le chanvre a une manière bien spécifique d'utiliser ce limonène, il le combine à un acide organique, l'acide olivétolique, pour former un corps original : l'acide cannabidiolique.

À partir de celui-ci, s'enclenche une série de réactions chimiques qui conduisent à des phénols cycliques comprenant 21 atomes de carbone, successivement le Cannabidiol, puis le Tétrahydrocannabinol. [20,21].

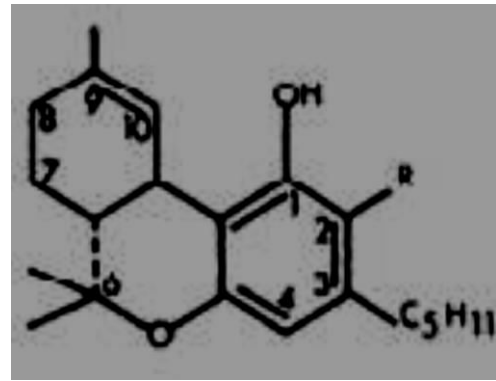
Dans la plante, les cannabinoïdes sont synthétisés sous forme carboxylée (Acides tétrahydrocannabinoliques, acide cannabidiolique...) et sont donc majoritairement présents sous cette forme (**Figure 05**). Ces dérivés d'acide sont instables et facilement convertis sous leur forme neutre par la chaleur, particulièrement lorsque le cannabis est fumé ou cuit en réparation culinaire.

Contrairement aux formes acides, ionisées et non liposolubles, les formes neutres sont non ionisées et donc liposolubles, elles traversent dès lors facilement la barrière, hémato encéphalique pour atteindre le cerveau, siège des effets psychotropes de la drogue.



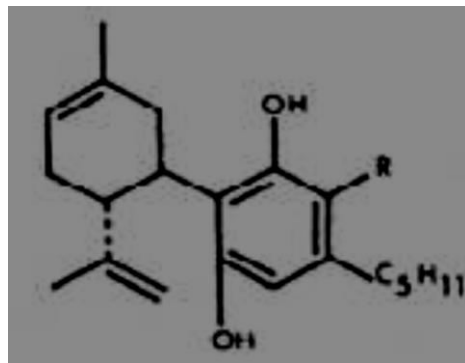
R = H cannabidiol (CBD)

R = COOH acide cannabidiolique (CBDA)  
(non psychotropes)



R = H  $\Delta^9$  tétrahydrocannabinol ( $\Delta^9$  THC)  
(psychotrope majeur)

R = COOH  $\Delta^9$  acide tétracannabiolique  
( $\Delta^9$  THCA)  
(Inactif mais donnant du THC dans la fumée)



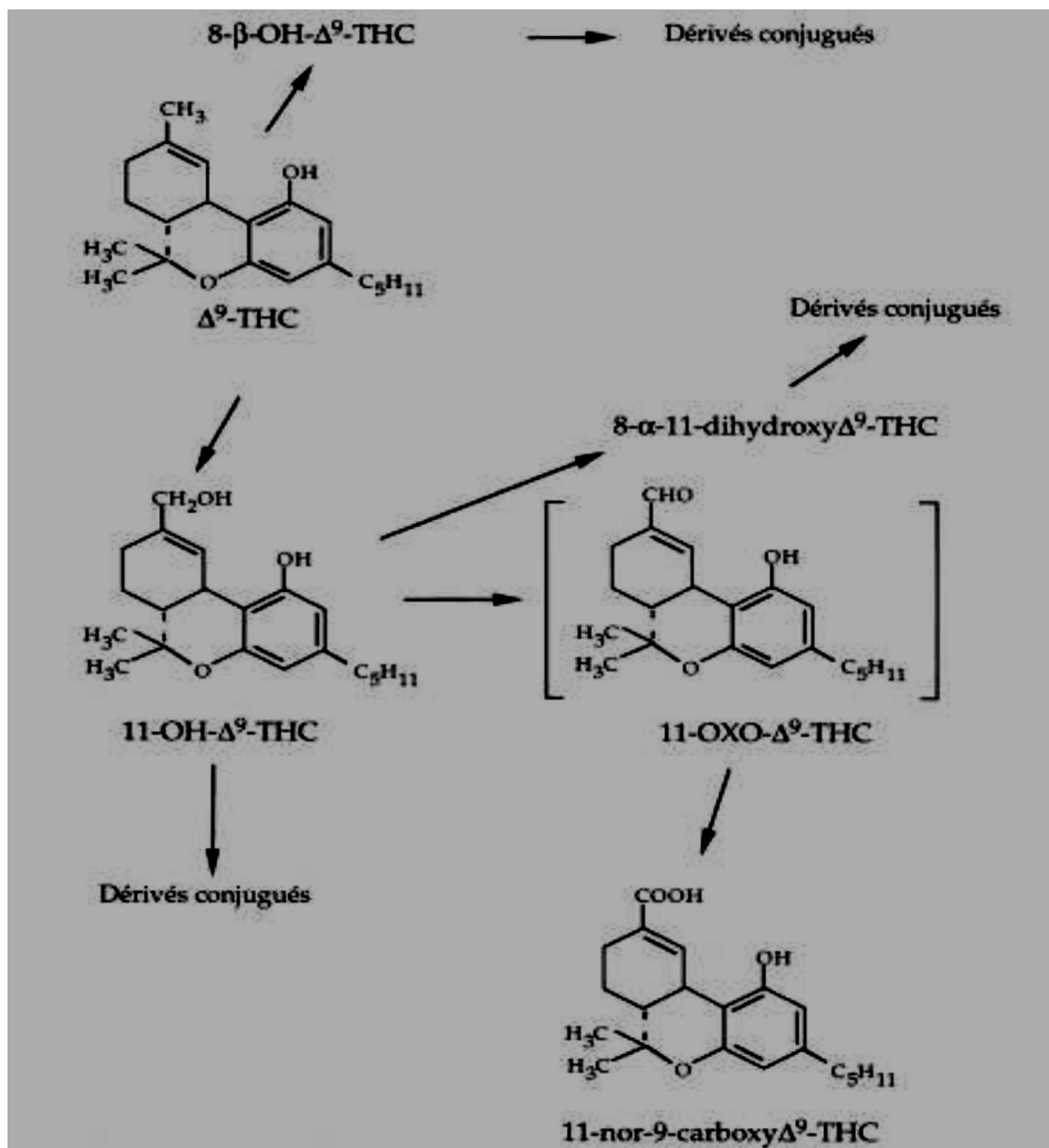
R = H cannabidiol (CBD)

R = COOH acide cannabidiolique (CBDA)  
(non psychotropes)

**Figure 05.** Structures des principaux cannabinoïdes.



Lorsque le cannabis est consommé par ingestion, la quasi-totalité du  $\Delta^9$ -THC est hydroxylée (principalement en 11-OH- $\Delta^9$ -THC) au niveau de la muqueuse intestinale (**Figure 06**), ce qui se traduit dans le compartiment sanguin par une concentration en 11-OH- $\Delta^9$ -THC supérieure à celle du  $\Delta^9$ -THC [22,23].



**Figure 06.** Principales voies métaboliques du  $\Delta^9$ -THC chez l'homme.

# **Chapitre 3**

## **Effets Bénéfiques et indésirables du THC**

## Chapitre 3 : Effets bénéfiques et indésirables du THC

### 1. Effets indésirable des médicaments à base du THC

#### 1.1. La schizophrénie

Beaucoup de données controversées ont été publiées concernant la relation entre la schizophrénie et le cannabis. Le composant principal du cannabis, le THC, est avéré responsable de la majorité des effets psychotomimétiques de la plante. Plusieurs études ont montré que le THC élève les niveaux de symptômes d'anxiété et les troubles psychotiques chez les individus sains. Au contraire du THC, le cannabidiol a des propriétés anxiolytiques et antipsychotiques et il est suggéré qu'il ait un effet neuroprotecteur chez les humains.

Cependant, la recherche a indiqué que la consommation de cannabis chez les patients schizophrènes provoque des symptômes psychotiques et qu'ils sont enclins à développer une dépendance psychologique. Les données préliminaires suggèrent que fumer du cannabis contenant du CBD, en plus du THC, peuvent avoir un effet protecteur contre les symptômes de type psychotique induits par le THC seul, cependant, plus de recherches sont nécessaires [37]. Cependant, l'abus de cannabis peut entraîner une augmentation des déficits du volume de matière blanche et la déficience cognitive, ce qui pourrait à son tour augmenter le risque de schizophrénie, en particulier pour les individus génétiquement sensibles [38].

#### 1.2. La psychose

Maintenant plusieurs données soutiennent le lien entre la psychose, la schizophrénie et la consommation de cannabis [44]. Le cannabis peut provoquer une psychose toxique aiguë, qui est un syndrome cérébral aigu non spécifique qui peut survenir également avec d'autres substances intoxicantes. Les symptômes qui sont communément observés dans la psychose toxique aiguë sont le délire de confusion, la prostration, la désorientation, la déréalisation et les hallucinations auditives et visuelles. Toutefois, seul un très petit pourcentage de la population exposée aux cannabinoïdes développe une maladie psychotique, ce qui suggère que les patients ayant une vulnérabilité génétique sont plus sensibles aux effets psychiatriques du cannabis [45]. De nombreuses études indiquent une aggravation de la schizophrénie par le cannabis et que le cannabis peut antagoniser les effets thérapeutiques de médicaments antipsychotiques chez les patients schizophrènes auparavant bien contrôlés.

Les études animales et de la recherche moléculaire suggèrent que les cannabinoïdes peuvent affecter le développement normal du cerveau pendant l'adolescence, ce qui augmente

le risque de schizophrénie [46]. Cela peut s'expliquer par le fait que le profil d'expression des récepteurs cannabinoïdes diffère chez les juvéniles et les adultes [47]. Par conséquent, le cannabis peut activer la schizophrénie plus tôt dans la vie chez les personnes vulnérables. En outre, les données expérimentales indiquent que la stimulation des récepteurs Cb1 conduit à une facilitation de la libération de dopamine dans le système mésolimbique et à un dérèglement de l'activité dopaminergique, ce qui est essentiel dans le mécanisme de la schizophrénie [45].

### **1.3. Effets sur la cognition et la mémoire**

Dans la littérature scientifique générale, les troubles de la mémoire sont souvent cités en association avec l'administration de cannabis [48]. L'utilisation aiguë du cannabis détériore le rappel libre d'informations immédiate et différée, Malgré l'observation de problèmes de mémoire, le mécanisme exact de la manière dont le cannabis affecte la cognition n'est pas encore défini [49]. Il y a une quantité croissante de preuves que les utilisateurs de cannabis à long terme peuvent développer des changements fonctionnels dans le cerveau, qui se manifeste par une aggravation subtile des fonctions cognitives

### **1.4. Effets sur l'humeur**

Un des effets les plus couramment rencontrés de cannabis est l'euphorie, un sentiment de grand bonheur ou le bien-être qui est la plupart du temps exagéré et pas nécessairement bien-fondé. L'euphorie n'est le plus souvent pas vécue comme un effet indésirable, mais plutôt comme un effet agréable. Les réactions dysphoriques à la consommation de cannabis sont les plus courantes des effets psychologiques défavorables de la consommation de cannabis. La dysphorie peut comprendre l'anxiété et la panique, des sensations somatiques désagréables et le sentiment paranoïaque, la manie ou la dépression. Les gens qui ont vécu la dysphorie peut revivre ce sentiment plusieurs semaines ou mois plus tard, sans nouvelle exposition à la drogue [50]. Par ailleurs, le cannabis exerce un effet dépresseur généralisé sur le SNC, ce qui entraîne la somnolence et le sommeil après une période initiale d'excitation [48]. Pour certains troubles cependant, pour l'anxiété, par exemple, ces effets peuvent être bénéfiques [51] ont constaté que «l'ennui, les motifs sociaux, l'amélioration du sommeil, l'anxiété et l'agitation associés à des symptômes psychotiques négatifs ou de dépression étaient les motivations les plus importantes de la consommation de cannabis »et par la suite les facteurs mentionnés précédents ont été surmontés par l'administration de cannabis.

### **1.5. Effets sur la fonction motrice**

Des rapports anecdotiques décrivent une amélioration fonctionnelle de la fonction motrice (écriture plus lisible par exemple). En effet, lors des enquêtes de patients atteints de SEP avec tremblement (qui est généralement d'origine cérébelleuse) rapportent souvent avoir un bénéfice clinique après avoir consommé du cannabis [52]. Toutefois, la consommation de cannabis aiguë peut d'abord augmenter l'activité motrice et est suivie par un état d'inertie physique avec l'ataxie, une dysarthrie et troubles de la coordination générale, qui peut durer plusieurs heures selon la dose [53].

## **2. Effets bénéfiques des médicaments basés sur le THC**

La preuve des propriétés médicinales du cannabis ou du THC simples dans certaines maladies est l'accumulation. Environ 110 études cliniques impliquant un nombre total de plus de 6.100 patients souffrant de diverses maladies ont été menées dans la période de 1975 à 2009. Les paragraphes suivants résument les découvertes les plus importantes sur diverses maladies au cours des 34 dernières années.

### **2.1. Effet antiémétique**

De nombreux médicaments cytotoxiques classiques qui sont souvent utilisés dans la chimiothérapie du cancer sont fortement émétiques. Les fumeurs de cannabis récréatif qui ont reçu la chimiothérapie ont informé leur médecin de l'effet du soulagement des nausées. Par la suite, de nombreuses études ont été menées sur les effets antiémétiques des deux formes du THC, naturel et synthétique. Il a été constaté que les deux formes du THC sont supérieures au placebo et équivalentes ou meilleures que les antiémétiques qui étaient disponibles dans les années 1970 et 1980. Les effets indésirables les plus fréquemment rapportés étaient la somnolence, la sécheresse buccale, l'ataxie, des étourdissements, la dysphorie, et l'hypotension orthostatique. Plusieurs études ont montré que de faibles doses de traitement préventif donnent de meilleurs résultats que de cibler des vomissements établis [24]. Une étude récente (2007), qui a comparé l'efficacité du dronabinol avec l'ondansétron, a trouvé que les deux étaient tout aussi efficaces pour le traitement des nausées et des vomissements chimio-induits. Toutefois, une thérapie combinée n'était pas plus efficace que chacun des agents seuls [25,30]. Au Canada, le dronabinol et la Nabilone sont indiqués pour les nausées et vomissements induits par la chimiothérapie [26]. Le mécanisme des effets des cannabinoïdes sur les nausées et vomissements induits par la chimiothérapie a été étudié depuis la découverte des récepteurs Cb1 et Cb2. Les cannabinoïdes utilisés dans les essais

cliniques agissent en tant que médicaments antiémétiques agonistes via l'activation de récepteurs cannabinoïdes Cb1 principalement, tandis que les endocannabinoïdes possèdent à la fois des actions pro et antiémétique. Une multitude de résultats expérimentaux indiquent que les deux récepteurs cannabinoïdes Cb1 et Cb2, ainsi que les récepteurs TRPV1, et de leurs ligands endogènes, se trouvent dans le tronc cérébral et des circuits du tractus gastro-intestinal. Ainsi, la sécrétion des hématogènes périphériques et centraux (agents possédant la capacité d'induire des vomissements, tels que la sérotonine, la dopamine, la substance P et les prostaglandines) est inhibée par les récepteurs cannabinoïdes agonistes et antagonistes, selon le récepteur impliqué [27].

## 2.2. Régulation de l'appétit

La dernière décennie a vu des avancées considérables dans notre compréhension du contrôle du comportement alimentaire par les endocannabinoïdes. Récemment, le lien entre la régulation de l'appétit et le niveau d'endocannabinoïdes a été démontré. Les niveaux d'AEA et 2-arachidonoylglycérol (2-AG) dans le cerveau de rat (en particulier dans le prosencéphale limbique, l'hypothalamus et le cervelet) ont été quantifiés dans trois états d'alimentation: jeûne, prise alimentaire, et satiété après un repas [28]. Les niveaux d'AEA et de 2-AG ont été significativement augmentés par la privation de nourriture dans le cerveau antérieur limbique alors que la concentration de 2-AG était significativement réduite dans l'hypothalamus pendant l'état d'alimentation, mais a augmenté significativement au cours de l'état de privation. L'hypothèse suggère que les niveaux élevés d'endocannabinoïdes dans les zones du cerveau au cours de la privation de nourriture jouent un rôle important dans la motivation des animaux vers la nourriture. La diminution des niveaux de 2-AG dans l'hypothalamus au cours de la prise alimentaire propose que la synthèse de 2-AG soit activement inhibée lors de l'alimentation, afin de faciliter la satiété après un repas. Récemment, l'AEA et la 2-AG ont préférentiellement augmenté les réponses au goût sucré par rapport au salé, l'aigre ou l'amer [29].

Les malades du sida ont affirmé que fumer de la marijuana soulage les nausées, améliore l'appétit, réduit l'anxiété, soulage les douleurs, améliore le sommeil et inhibe la candidose buccale. L'administration orale du THC, ainsi que d'autres agonistes du récepteur Cb1, a montré l'amélioration de l'appétit et le ralentissement de la perte de poids, ce qui montre des propriétés hyperphagies (polyphagie). Plusieurs études ont montré que le dronabinol pourrait contribuer à stimuler l'appétit des malades du cancer et du SIDA, et même à améliorer le sens

du goût dans cette population [30]. Puisque les récepteurs Cb2 ont été récemment localisés dans le SNC [31] et l'expression de ce récepteur n'a pas été trouvée dans les voies d'alimentation, peu de recherches ont considéré que le récepteur Cb2 pourrait avoir un effet sur la régulation de l'appétit.

### 2.3. Soulagement de la douleur

Le Cb1, Cb2 et la famille des canaux récepteurs transitoires potentiels (TRPV1) fonctionnent probablement comme nocicepteurs. Pour les récepteurs Cb1 et Cb2, qui sont exprimés sur des terminaux pré synaptiques GABA énergiques, les mécanismes de soulagement de la douleur sont expliqués par l'inhibition de la libération du neurotransmetteur dans le cas de l'activation des récepteurs. En outre, le TRP1 appartient à la famille de canaux récepteurs transitoires potentiels. Leur principale fonction est de percevoir des sensations, y compris la douleur. Cependant, il y a beaucoup de différents types de douleur, et la comprendre quel type pourrait être traitée avec le cannabis est cruciale. Le classement de l'Association internationale pour l'étude de la douleur (AIED) définit la douleur en fonction de cinq catégories: la durée et la gravité, la localisation anatomique, le système corporel impliqué, la cause, et les caractéristiques temporelles (intermittente, constante, etc.) [32]. Les cannabinoïdes se sont révélés efficaces dans le soulagement d'une vaste gamme de problèmes de douleur, principalement la douleur somatogénique, qui est divisée en douleur nociceptive et neuropathique. Ainsi, toutes les deux sont divisées en douleur aiguë et chronique. Il y a deux types de douleur chronique qui peuvent être traitées avec du cannabis: douleur inflammatoire nociceptive et douleur neuropathique. La douleur inflammatoire nociceptive est associée à une lésion tissulaire et au processus inflammatoire qui en résulte. La douleur neuropathique est déclenchée par des dégâts aux neurones dans les systèmes nerveux périphérique et central.

Des études récentes ont suggéré que les cannabinoïdes peuvent également avoir des propriétés immuno modulatrices et inflammatoires. En effet, de récentes données expérimentales suggèrent un effet des cannabinoïdes sur d'autres processus fondamentaux en plus de la douleur qui sont importants dans la sclérose en plaques(SEP), avec la preuve d'effets anti-inflammatoires et l'encouragement de la remyélinisation et de la neuro protection [33]. Des propriétés anti-inflammatoires sont soupçonnés d'être régulées principalement par le biais de l'activation du récepteur Cb2. Les informations détaillées sur le traitement de la douleur à l'aide de la médecine à base de cannabinoïdes ont été examinées par Rahn et

Hohmann (2009). Plusieurs études soutiennent la considération que les cannabinoïdes ont une plus grande efficacité dans les conditions de douleur chronique que dans des conditions de douleur aiguë [34].

#### **2.4. La sclérose en plaques (SEP) et d'autres troubles caractérisés par la spasticité**

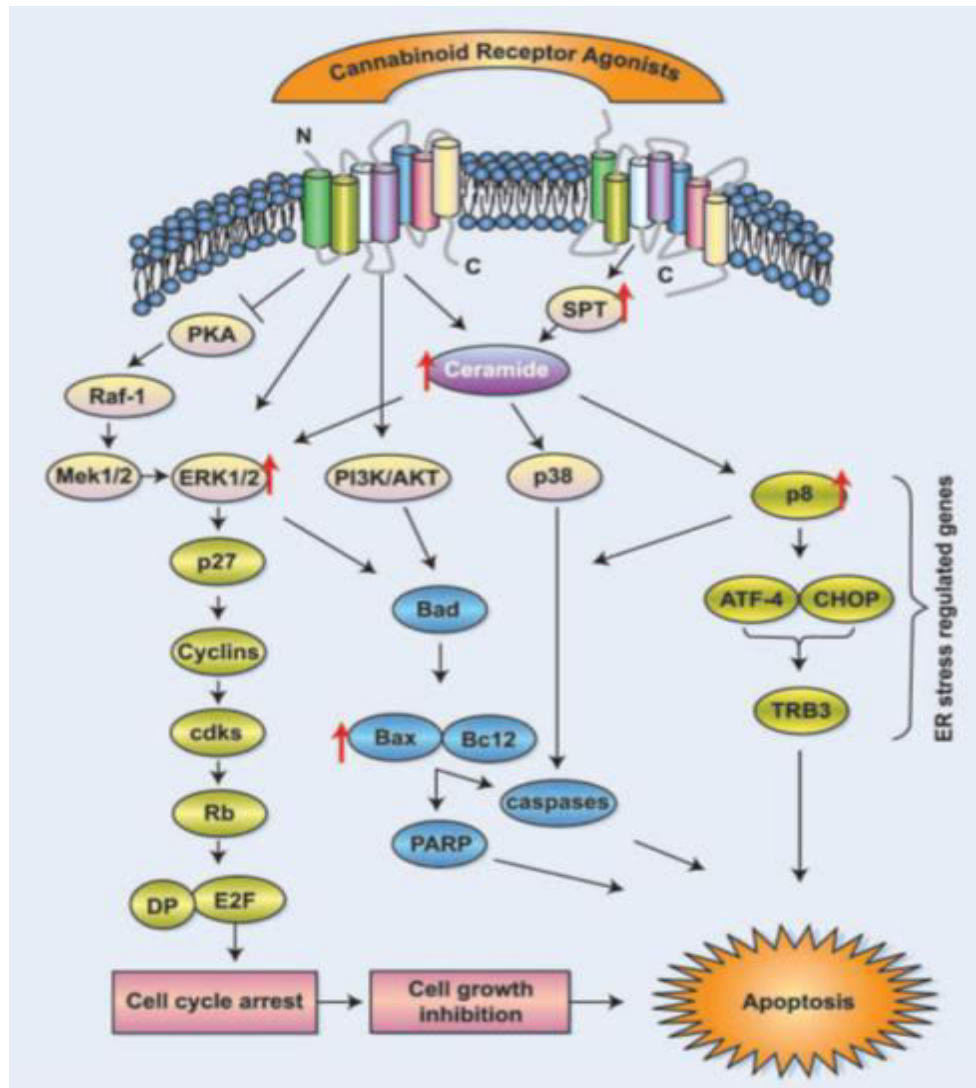
La spasticité est caractérisée par une raideur ou rigidité des muscles ou avec des réflexes du tendon profond exagérés. La condition peut interférer avec la marche, le mouvement, ou la parole. La spasticité est un des principaux symptômes de la SEP, de la paralysie cérébrale, des lésions de la moelle épinière et des traumatismes crâniens, des lésions au cerveau causant l'accessibilité limitée à l'oxygène, et aux maladies métaboliques telles que l'adréno leucodystrophie, la sclérose latérale amyotrophique (maladie de Lou Gehrig), et la phénylcétonurie. Récemment, des études ont publié le lien étroit entre l'inflammation et les maladies neurodégénératives chez les patients atteints de SEP. Toutefois, le traitement avec la médecine conventionnelle a une faible efficacité due à l'incapacité des anti-inflammatoires d'accéder au SNC. Au cours des dernières années, une grande quantité de la littérature sur les cannabinoïdes a fourni des preuves solides sur leurs capacités en tant qu'agents neuroprotecteurs dans différents états pathologiques. Ce fut d'abord démontré dans l'ischémie cérébrale expérimentale en 1994 [35]. Depuis, il y a de nombreuses études montrant la puissance des MBC comme médicaments efficaces pour la protection des patients atteints de SEP [36]. Le mécanisme par lequel les MBC sont utilisés comme médicament anti-inflammatoire et protecteur s'explique par l'expression spécifique des récepteurs cannabinoïdes. Le récepteur Cb2 est principalement exprimé sur les cellules des branches d'adaptation et innées du système immunitaire, ainsi les cannabinoïdes exercent un très large spectre d'actions sur les cellules, à la fois à la périphérie et sur le système nerveux central

#### **2.5. Régulation du cycle cellulaire et traitement du cancer**

Des études récentes ont montré que le système endocannabinoïdes (SEC) pourrait offrir une cible anti-tumorale intéressante. Une énorme quantité d'études ont révélé les mécanismes moléculaires des cannabinoïdes, en fournissant des connaissances sur la façon de moduler l'activité des récepteurs spécifiques des cannabinoïdes dans le but d'appliquer les MBC comme agents chimio thérapeutiques. À ce jour, il a été constaté que les MBC inhibent la croissance des cellules tumorales et induisent l'apoptose en modulant différentes voies de signalisation cellulaires. Une explication du mécanisme exact de régulation des voies de



signalisation cellulaires régulées par les MBC est représentée dans la **figure 07**. Cependant, cela va au-delà de la portée de ce rapport.



**Figure 07.** Représentation schématique des voies de signalisation associées à l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes induite par ses agonistes

## 2.6. Pression intraoculaire élevée

Le glaucome est un trouble oculaire causé par pression intraoculaire élevée. De nombreux rapports anecdotiques ont indiqué que la marijuana de la rue peut soulager les symptômes du glaucome. Des essais contrôlés randomisés ont confirmé que les cannabinoïdes pris oralement, par injection ou fumée peuvent diminuer la pression intraoculaire et que cet effet est dépendant de la dose. Le THC, le  $\Delta^8$ -THC et le 11-hydroxy-THC ont été signalés pour être plus efficace que le CBD. Un essai randomisé contrôlé a constaté une réduction de la pression intraoculaire après consommation de cannabis. Cependant, cette étude a été

accompagnée par des altérations de l'état mental. Des gouttes pour les yeux du THC ont réduit la pression intraoculaire avec des effets secondaires minimales. Il est suggéré que les cannabinoïdes peuvent réduire la pression intraoculaire en influençant la production d'humeur aqueuse et l'écoulement à travers l'activation du récepteur Cb1 [30]. Bien que l'administration topique à l'aide de gouttes pour les yeux soit idéale pour les traitements du glaucome, elles ont été associées à une irritation et des lésions cornéennes [24].

### **2.7. Effets anti-inflammatoires**

Les anti-inflammatoires constituent une importante classe de médicaments qui présentent différentes activités pharmacologiques de type anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique et antiplaquettaire ainsi que des effets secondaires gastro-intestinaux et rénaux. Leur prescription est considérable, tout particulièrement pour le traitement des maladies rhumatismales telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose. L'action anti-inflammatoire du THC rassemble à celle des AINS (Anti-inflammatoire non stéroïdien) s'explique essentiellement par l'inhibition non spécifique de l'activité cyclooxygénase qui est notre enzyme à étudier [76].

Le THCA peut également aider les effets anti-inflammatoires d'autres cannabinoïdes. La recherche a montré que, bien que le THC inhibe la cyclooxygénase (COX) inflammatoire enzymes [39], THCA est capable d'inhiber COX-1 par 50% et COX-2 par 30%. Le rôle des enzymes COX-1 et COX-2 est de promouvoir la production de substances inflammatoires connues sous le nom de prostaglandines à partir d'acides gras oméga-6. C'est ainsi que fonctionne l'aspirine analgésique commune et pourquoi la consommation de graisse oméga-3, comme celles de l'huile de poisson, peut réduire l'inflammation et la douleur qui en résulte, car les graisses oméga-3 "éliminent" les graisses oméga-6. Cependant, COX-1 et COX-2 peuvent être nécessaires dans la guérison des fractures osseuses [40], Donc dans cette situation, il pourrait être préférable d'éviter THCA en faveur de la CBD, qui est anti-inflammatoire par d'autres mécanismes et a même démontré la capacité de guérison de l'os [41].

En plus de ces avantages, THCA peut également avoir des effets protecteurs sur les cellules du cerveau [42]. Dans une autre étude de laboratoire, il a été constaté pour exercer les capacités antioxydants lorsque les cellules du cerveau de souris ont été exposées à une neurotoxine, et avoir un effet protecteur contre la mort cellulaire.

# Chapitre 4

## L'enzyme

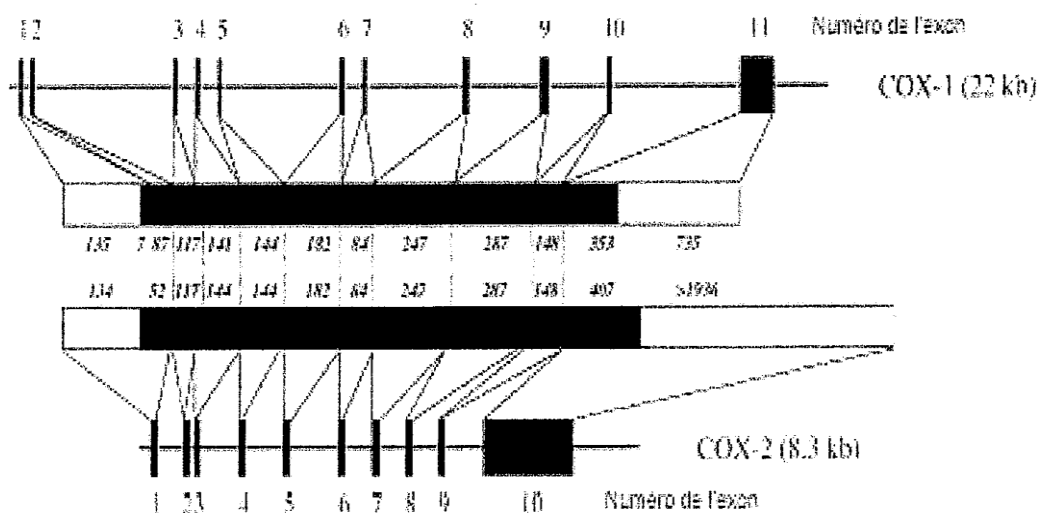
## Chapitre 4 : L'enzyme

La cyclooxygénase2 est une enzyme qui catalyse la biosynthèse des endoperoxydes cycliques à partir de l'acide arachidonique pour former les prostaglandines

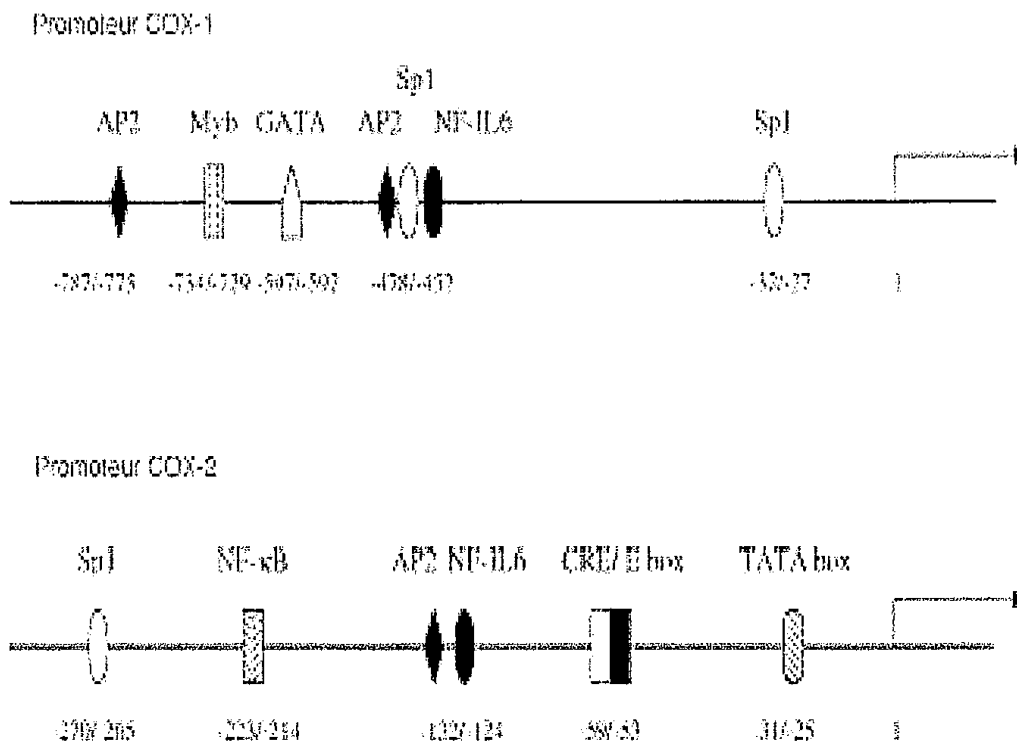
### 1. Structures des gènes COX-2

Le gène de COX-2 a été découvert en 1991, comme un gène de réponse primaire,[81]. C'est un gène compact (8,3kb), avec 10 exons, localisé sur le chromosome 1 chez l'homme [82](Figure 08). La séquence de son ADN présente 60% d'homologie avec celle du gène non inductible.

Plusieurs éléments de régulation transcriptionnelle sont retrouvés dans le promoteur de COX-2 une TATA box, un motif NF-IL6, deux sites AP-2, trois sites SpI, deux sites NF-KB, un motif CRE et une E-box. L'exon le plus grand du gène COX-2 code pour la totalité de la région 3' non traduite (3'-UTR), qui contient 17 copies de la séquence ATTTA, intervenant dans l'instabilité des ARNs [83] (Figure 09). L'ARNm de la forme inductible existe sous la forme de variantes de 4,5kb, 4kb et 2,8kb alors que celui de la forme constitutionnelle mesure 2,8kb [84].



**Figure 08.** Structure des gènes de COX-1 et de COX-2 humains et représentation schématique de leurs transcrits (ARNm).



**Figure 09.** Eléments de régulation au niveau des promoteurs des gènes COX2.

## 2. Régulation de l'expression des gènes COX-2

L'activité enzymatique de COX2 présente un renouvellement rapide, impliquant une régulation de l'expression de leur gène, que ce soit au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnelle.

L'expression du gène de COX-2 est fortement régulée, notamment par la nature hautement Inductible de son promoteur. Le COX-2 est exprimé en réponse à :

- des facteurs pro-inflammatoires (IL-1, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , LPS et TPA)
- des hormones (FSH, LH et œstrogènes)
- des facteurs de croissance (EGF, PDGF et FGF)
- des oncogènes (v-Src et v-Ras)

L'induction rapide de COX-2 fait intervenir différentes cascades de signalisation, notamment la cascade MAPK (mitogène-activated protéine kinases, comprenant les sous-

groupes de kinases ERKs, JNKs/SAPKs et p38 MAPK), ainsi que divers facteurs de transcription, dont NF-KB [86].

Les glucocorticoïdes interviennent dans l'inhibition de COX-2 à plusieurs niveaux. Ils sont responsables d'une augmentation d'expression des protéines IKB, inhibitrices de NF-KB, supprimant ainsi la synthèse d'ARNm de COX-2 médiée par NF-KB [87]. Par ailleurs, les corticoïdes inhibent directement l'action d'un autre facteur de transcription, AP-1, bloquant ainsi la synthèse d'ARNm de COX-2 médiée par l'IL-1 [88]. Enfin, les glucocorticoïdes peuvent inhiber l'expression de COX-2 en diminuant la stabilité des ARNm de COX-2, en agissant sur leur région 3'-UTR.

### 3. Structure

#### 3.1- Structure Primaire

La COX-2 est une protéine glycosylée. Leurs séquences primaires varient de 603 (souris) à 604 acides aminés (Homme) [91]. Les séquences en acides aminés de différentes espèces sont identiques à environ 90% (entre 81 et 98 %) . la séquence de COX-2 se caractérise par une proline supplémentaire après l'Ile106 et l'insertion d'une séquence supplémentaire de 18 acides aminés en position C-terminale dans [93]. Les formes immatures des enzymes subissent un clivage peptidique lors de leur adressage, avec la perte du peptide signal.

Certaines régions, notamment celles impliquées dans l'activité enzymatique, sont très fortement conservées

#### 3.2. Domaine de liaison à la membrane

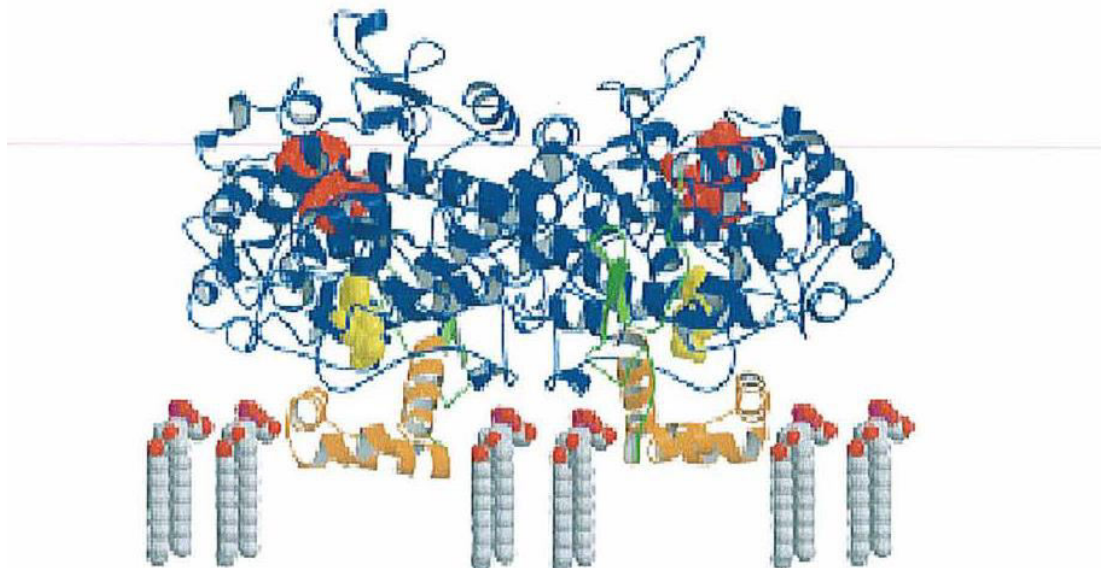
Ce domaine contient les acides aminés 73 à 116 et est formé par quatre hélices  $\alpha$  (A, B, C, D) hautement amphiphiles. Ces hélices s'insèrent, grâce à des liaisons hydrophobes, seulement dans le feuillet interne de la bicouche phospholipidique, créant grâce à des liaisons hydrophobes un motif original d'ancrage de l'enzyme dans la membrane du réticulum endoplasmique. La conséquence directe de ce mode d'attachement est la localisation totale de la protéine dans la partie luminale du réticulum endoplasmique. Cette localisation autoriserait le passage direct des acides gras membranaires vers les sites enzymatiques voisins.

#### 3.3. Domaine catalytique

C'est le domaine le plus important en masse (117 à 600 acides aminés) et il comprend le site actif peroxydasique et dioxygénasique [Figure 10]. Ce domaine a un degré élevé

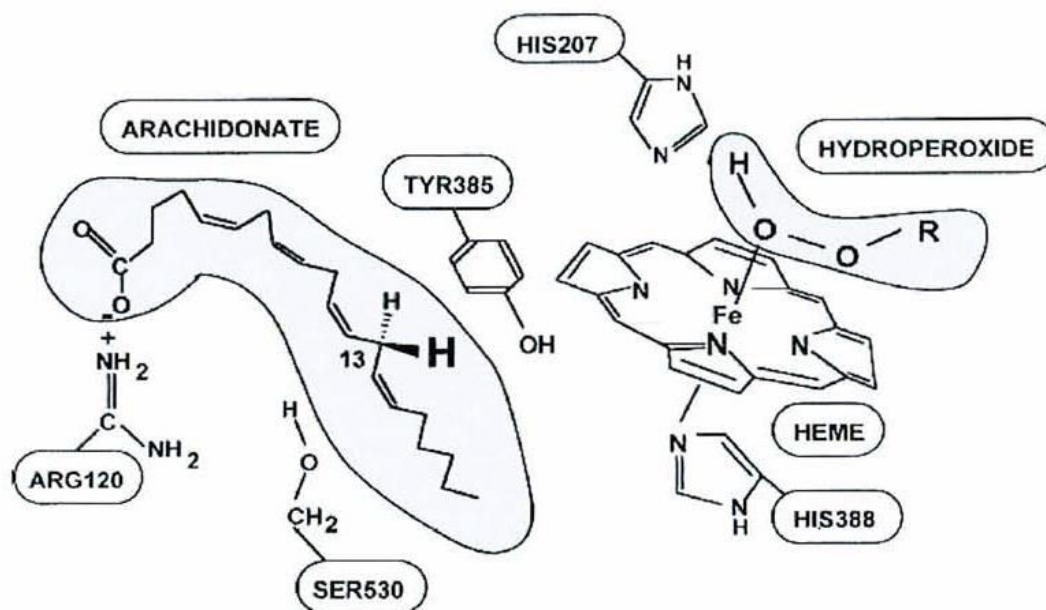
d'homologie structurale avec les protéines membres de la famille des peroxydases malgré une faible homologie de séquence (20% d'identité) [91]. Les motifs structuraux du site enzymatique interagissent étroitement avec l'hélice D du motif de liaison à la membrane, et l'ensemble s'organise en un long canal hydrophobe qui permet à l'acide aminé d'avoir un accès direct aux sites catalytiques à partir de la membrane [95]. Plusieurs acides aminés présents dans ce canal jouent un rôle important. L'Arg 120 et la Glu524 forment un pont ionique, la Tyr355 est en étroite relation avec l'Arg120 dans la partie médiane du canal, la Ser530 est le site d'acétylation de l'aspirine [96], enfin, la Tyr385 est le support de l'activité oxygénasique grâce aux radicaux tyrosyl générateurs de peroxydes [97]. Par ailleurs, les repliements de la protéine font que le site d'acétylation par l'aspirine (Ser530) est situé au voisinage immédiat du site catalytique oxygénasique (Tyr385), de sorte que ces deux sites se trouvent au sommet du canal [91]. La résolution plus récente de la structure tridimensionnelle de COX-2 [98].

par la cristallographie aux rayons X a permis de montrer que la structure de la COX-2 humaine ou murine est superposable à celle de la COX-1 malgré des différences de structure primaire comme un peptide signal COX-1 plus grand ou la présence, dans COX-2, d'une proline supplémentaire. L'addition de ces résidus ne modifie que localement la structure de l'enzyme, sans affecter sa topologie globale.



**Figure 10** . Structure de la PGHS-1 ovine. Homodimère ancré dans une membrane plasmique:

molécule de flurbiprofène (jaune) au niveau du site actif, domaine EGF-like (**vert**), domaine de liaison à la membrane (**ocre**), domaine catalytique (**bleu**), hème (**rouge**)[d'après Picot, 1994 et Smith, 2000][98].



**Figure 11.** Interrelations cyclooxygénase - peroxydase et résidus importants.

En revanche, la substitution de l'Ile523 en Val509 permet la formation d'une poche latérale (sidepocket) dans le site actif de COX-2. C'est la faible taille de la chaîne latérale de la Val couplée avec le changement conformationnel de la Tyr355 qui permet, dans COX-2, une meilleure accessibilité à cette poche par un élargissement de 0,7 Å du segment hydrophobe. De plus, la substitution de la deuxième Ile434 en Val420 contribue à former une "porte moléculaire" qui agrandirait encore la nouvelle poche latérale, de sorte que le site actif de COX-2 aurait un volume supérieur de 25% à celui de COX-1[99].

### 3.4. Activité enzymatique

Les isoformes de la cyclooxygénase sont des hémoprotéines bi fonctionnelles qui catalysent la principale réaction commune à la biosynthèse des prostaglandines et conduisent, selon l'acide arachidonique cellulaire, à la production des différents dérivés. Elles assurent la transformation de l'acide aminé en endoperoxyde PGG<sub>2</sub> grâce à leur activité dioxygénasique puis en PGH<sub>2</sub> par leur activité peroxydasique [100]. Ces deux activités enzymatiques sont assurées par des sites distincts mais proches. En effet, l'activité cyclooxygénasique peut être détruite sans que l'activité peroxydasique ne soit affectée [101]. En revanche, la fonction peroxydasique est indispensable à l'initiation de l'activité cyclooxygénase. En effet, le groupement hémique du site actif peroxydasique doit être oxydé par un hydroperoxyde



initiateur pour pouvoir à son tour oxyder une tyrosine (Tyr385) voisine dans l'espace mais localisée sur le site actif cyclooxygénasique.

Le radical tyrosyl ainsi formé est l'initiateur de l'oxygénation et permet l'extraction de l'hydrogène 13(S) de l'acide aminé [102] et forme ainsi un radical acyl gras ( $\text{Fe}^4 + \text{Tyr}1\text{AA}'$ ). Ce radical acyl gras réagit avec une molécule d'Oxygène pour former le radical  $\text{PGG}_2$ . Enfin, le  $\text{PGG}_2$  est libéré et le radical tyrosyl régénéré. Cette première réaction de cyclo-oxygénation est suivie d'une peroxydation au cours de laquelle le groupement 15-hydroperoxy est transformé en 15-hydroxy, et le  $\text{PGG}_2$  réduit en  $\text{PGH}_2$ .

Les peroxydes formés lors de la première étape de la réaction de cyclo-oxygénation peuvent être à l'origine de l'auto-inactivation des activités cyclooxygénasique et peroxydasique [103]. Les deux isoformes de la cyclooxygénase ont des propriétés enzymatiques envers l'acide aminé assez proche. En effet, elles possèdent des affinités ( $K_m \text{COX-1} = 2 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $K_m \text{COX-2} = 2,7 \text{ } \mu\text{M}$ ) et des propriétés catalytiques ( $V_{max} \text{COX-1} = 30 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ,  $V_{max} \text{COX-2} = 43 \text{ } \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ) similaires vis-à-vis de l'acide aminé en  $\text{PGH}_2$  [104]. Cependant, leur sélectivité de substrat est légèrement différente: COX-2 métabolise des acides gras en C18 et C20:3 tandis que COX-1 n'utilise que l'acide aminé (C20:4) comme substrat, ce qui peut être expliqué par la différence de largeur de leurs sites actifs [105].

## 4. Mécanismes d'inhibition des cyclo-oxygénases

### 4.1. Inhibition irréversible des cyclo-oxygénases

Ce mécanisme concerne deux molécules l'aspirine et le THC. Des études récentes ont montré que l'action de l'acide acétylsalicylique est identique sur les deux isoenzymes de COX, mais que ses conséquences sont différentes. Ainsi, la COX-1 est acétylée de façon covalente sur la Ser529 sur l'enzyme humaine, située au voisinage du site actif (Tyr385), ce qui bloque irréversiblement l'activité dioxygénasique par encombrement stérique. La COX-2 est également acétylée sur la Ser516 chez toutes les espèces, mais le blocage du site actif dioxygénasique n'est que partiel, en raison d'un canal hydrophobe plus large que celui de la COX-1. Dans ce cas, il y a alors déviation des voies de biotransformation de l'acide arachidonique vers la formation de l'acide 15-hydroxyéicosatétraénoïque (15R-HETE), qui peut lui-même être biotransformé en épilipoxines par la lipoxigénase.

### 4.2. Inhibition réversible des cyclo-oxygénases

Mécanisme d'action commun à la plupart des AINS, on peut cependant distinguer:

- Des inhibiteurs compétitifs (kétoprofène par exemple) entrant en compétition avec l'acide arachidonique, et formant un complexe enzyme-inhibiteur rapidement dissociable. L'action sur les deux isoenzymes est indépendante du temps.
- Des inhibiteurs d'interaction lente ou "slow tight-binding inhibitor" (indométacine par exemple), dont l'action sur les cyclo-oxygénases dépend du temps. Ils forment avec l'enzyme un complexe intermédiaire rapidement dissociable qui évolue secondairement vers un complexe lentement dissociable.
- Des études récentes ont montré que le type d'inhibition de la cyclooxygénase par un AINS peut être différent selon l'isoforme considérée, ce qui pourrait expliquer la "sélectivité" de certaines molécules pour une isoenzyme [106]

# **Chapitre 5**

## **Docking Moléculaire**

## Chapitre 5 : Docking Moléculaire

### 1. Définition

Le Docking moléculaire consiste à déterminer la position relative de deux molécules. La structure obtenue confère les propriétés à l'ensemble (le complexe) ainsi formé. Par exemple, la recherche de 'bonne' structure est cruciale dans la conception de nouveau médicament. Ou encore, selon l'association de deux protéines, le signal déclenché lors de leur association peut être différent.

Le plus important problème pour l'étape de Docking est de parcourir le mieux possible l'espace conformationnelle. La complexité de ce problème est fonction du nombre de degrés de liberté, de translation, de rotation en plus des conformations de départ possibles du ligand. Afin d'éviter des calculs que les machines ne peuvent résoudre ou seulement dans des temps bien trop importants, plusieurs approximations sont possibles. Les algorithmes de recherche de la flexibilité du ligand peuvent se classer en trois principes, nommés combinatoire, stochastique, et déterministe.

### 2. L'approche combinatoire

Cette approche est basée sur des grilles de valeurs pour chaque degré de liberté, et chacune de ces grilles est explorée de manière combinatoire au cours de la recherche. En raison de l'effet combinatoire, le nombre d'évaluations augmente bien plus rapidement que le nombre de degrés de liberté. Pour cela, des critères de fin sont imposés pour éviter à l'algorithme de parcourir des portions de l'espace qui ne mèneraient qu'à de mauvaises solutions.

Dans un premier temps le ligand est découpé en parties rigides et flexibles. Entre les points où des rotations sont possibles, une ou plusieurs «ancres» rigides sont définies, ensuite une première partie rigide est mise en interaction avec le récepteur puis les parties flexibles sont ajoutées de manière successive avec une exploration des angles de torsion. Le plus important est le choix des fragments de base à placer en premier dans le site car il est très difficile pour les algorithmes de compenser une mauvaise position initiale. Les différentes implémentations changent par la manière dont le premier segment rigide est placé dans le site et dans les procédures d'élimination quand le nombre d'angles de rotation augmente. Nous supposons

que la position du segment rigide de départ ou ancre fait partie des  $n$  positions de plus basse énergie possible. Le nombre  $n$  détermine la largeur de l'arbre de recherche. Cette hypothèse peut s'avérer être un biais dans le cas de petits segments 'ancres' car ceux-ci sont susceptibles de s'adapter à de nombreux endroits à la surface du récepteur entraînant la construction de branches sans intérêt. Cette méthode a été incorporée dans plusieurs programmes dont Dock [107] et FlexX [108]. Le programme FlexX positionne l'ancre à partir d'une modélisation des interactions chimiques et effectue une sélection automatique des fragments de base [109,110].

Les fragments sont ajoutés de manière incrémentale. Chaque angle possible est construit et les angles qui produisent des recouvrements avec le récepteur ou des conflits internes sont rejetés. A chaque ajout, le calcul de l'énergie est pratiqué et les molécules partiellement construites sont classées. Cette procédure est répétée jusqu'à la construction complète de la molécule.

### 3. L'approche stochastique

L'approche stochastique consiste à effectuer des changements aléatoires dans la structure tridimensionnelle du ligand. Habituellement il s'agit de modifier un degré de liberté à chaque fois. L'un des points faibles de cette méthode est l'incertitude de convergence. Pour l'éviter, il faut multiplier les calculs, indépendamment les uns des autres. Un des principaux algorithmes stochastiques est la méthode de Monte Carlo [111].

Pour la méthode de Monte Carlo le ligand est considéré dans son ensemble et les changements s'effectuent aussi bien sur les translations, les rotations que sur les torsions. A chaque mouvement, la molécule est minimisée et son énergie est calculée. Pour déterminer si une structure doit être conservée les programmes se servent du critère de Metropolis [112].

Pour les systèmes macromoléculaires le critère de Metropolis peut s'exprimer ainsi : à partir d'une configuration  $i$ , on tire au hasard une configuration  $j$ . Cette nouvelle configuration est acceptée avec une probabilité  $\alpha$ , qui est la probabilité que le système puisse aller d'un état d'équilibre  $i$  vers un état  $j$ . La différence d'énergie entre la nouvelle et l'ancienne configuration est calculée. Si la nouvelle configuration est d'énergie plus basse elle est acceptée. En revanche si elle est d'énergie plus haute, un nombre au hasard entre 0 et 1 est tiré, si ce nombre est inférieur à  $\alpha$  la nouvelle configuration est acceptée, sinon l'ancienne

configuration est gardée. Ce critère est, dans la plupart des cas, très efficace et simple à mettre en œuvre.

Pour obtenir la structure la plus stable ou quand il est raisonnable de penser que la structure de départ est très éloignée de celle de l'interaction, il est possible d'utiliser le recuit simulé. Cette méthode est une variante de la méthode de Monte Carlo qui s'applique particulièrement bien aux macromolécules. Elle consiste à effectuer plusieurs cycles de calculs avec la particularité que le premier cycle sera simulé à haute température et que dans les cycles suivants ce facteur sera progressivement diminué. Chaque nouveau cycle commence avec la meilleure structure du précédent.

Une autre modification possible de Monte Carlo moins employée est la recherche Tabou qui consiste en un critère de choix suivant la zone de l'espace conformationnelle où se situe la structure, avec des zones permises et d'autres interdites (tabou), afin de limiter le calcul [113], cette technique se retrouve dans le programme PRO\_LEADS.

Le programme ICM [114] utilise des probabilités partielles pour son algorithme de Monte Carlo. Les mouvements de translation et de rotation sont testés par une simulation des mouvements pseudo-brownienne, alors que les mouvements de torsion se basent sur des probabilités partielles. Après chaque cycle une minimisation locale est faite, qui est suivie par un calcul de l'énergie de solvation et de l'entropie. Le choix se fait selon le critère de Metropolis. Les probabilités partielles sont dérivées du diagramme de Ramachandran de structures connues.

Le programme Glide [115] utilise lui aussi la méthode de Monte Carlo. Il se sert de caractéristiques chimiques pour évaluer la pertinence des structures et faire un choix à chaque cycle, mais afin de réduire l'espace à explorer par Monte Carlo il emploie préalablement plusieurs filtres qui permettent d'éliminer les mauvais contacts notamment polaires ou hydrophobes.

#### **4. L'approche déterministe**

Dans l'approche déterministe, l'état initial détermine les mouvements à effectuer pour générer l'état suivant. Cet état devant être d'énergie égale ou inférieure à celle de l'état initial. Le problème des systèmes déterministes est qu'ils peuvent facilement rester piégés dans un

minimum local car leurs capacités à surmonter des barrières énergétiques sont faibles. Il s'agit de l'approche la plus simple et la plus directe.

L'exemple le plus répandu est la simulation de dynamique moléculaire. Cette méthode est très rarement employée en Docking du fait des moyens qu'elle demande et de son biais pour les minima locaux.

Pour simuler les interactions protéines-ligands, nous avons choisi un programme de docking. Il est appelé Surflex, qui utilise la méthode incrémentielle [116].

## 5. Applications

Il y a deux principales applications au programme de docking. La plus ancienne est la prédiction du mode d'interaction. La seconde consiste à optimiser des molécules ayant déjà une activité avec le récepteur. Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer les performances des différents programmes de docking pour chaque application. L'aptitude d'un algorithme à trouver l'emplacement correct du ligand par rapport à son récepteur est habituellement déterminée au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD (Root-Mean-Square Deviation) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal. La valeur admise est une différence maximale de 2 angströms au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate [119,120]. En général, les erreurs de docking sont dues à un échantillonnage insuffisant ou à une fonction de score inadéquate. Pour savoir de quel type d'erreurs il s'agit, il faut comparer l'énergie la plus basse obtenue par docking avec le score de la structure cristalline. Si le score du complexe de docking est moins favorable à celui de la structure cristalline il s'agit d'un problème de la partie chargée de parcourir l'espace conformationnel. L'échantillonnage dans ce cas est incomplet et n'a pas permis de trouver le conformère correspondant au minimum global d'énergie potentielle [121]. Dans le cas où le score de docking serait bien plus bas que celui de la structure cristalline il s'agit d'une erreur de la fonction de score.

Pour remédier à ces problèmes, dans le premier cas il faut augmenter le nombre de conformères évalués, dans le deuxième il faut revoir la fonction de score. Il s'agit là de cas classiques qui supposent que l'espace conformationnel autour de la structure expérimentale est parfaitement parcouru et que la structure cristalline est bien celle correspondant au minimum global d'énergie potentielle. Il faut donc l'adapter selon son propre calcul.

Pour optimiser les molécules à activité pharmacologique, le programme doit être capable de ranger correctement des molécules semblables chimiquement. La fonction de score doit être capable de limiter les faux positifs et les faux négatifs. Pour vérifier la capacité à différencier du logiciel, il faut disposer d'une banque expérimentale de complexes. Il convient d'avoir une structure cristallographique pour au moins un complexe protéine-ligand proche des molécules testées.

## 6. Programmes utilises Surfex.

Le programme Surfex comprend deux parties. L'une pour des études de similarité tridimensionnelle des molécules, l'autre pour des études de Docking. Seule la partie Docking est abordée ici. Elle se base sur la construction d'une pseudo-molécule comme cible sur laquelle aligner le ligand. Il s'agit de fragments de molécules placés dans le site actif de manière à occuper idéalement et de manière redondante celui-ci à partir de critères morphologiques. Il est important de préciser que cette pseudo molécule peut être construite à partir du ligand dans le site, à condition de bénéficier d'une structure, ou bien à partir du récepteur sans aucun ligand : il utilise dans ce cas 3 types de fragments CH<sub>4</sub>, C=O et N-H mais il est nécessaire de connaître l'emplacement du site actif.

L'étape de Docking s'effectue suivant deux méthodes :

- la première est une méthode incrémentale dite Hammerhead [122]. Dans ce cas le programme fractionne le ligand et cherche à trouver le meilleur appariement pour chaque fragment, il essaye d'adapter les fragments à ceux de la pseudo-molécule.

Les fragments ayant la plus haute affinité sont utilisés pour reconstruire le ligand. À la différence de la recherche incrémentale de Dock il n'y a pas de recherche systématique des angles de torsion mais une étape de minimisation entre chaque ajout de fragment.

- la deuxième méthode dite 'molécule entière' reprend la même étape de fractionnement que précédemment. Le changement se fait au niveau des fragments du ligand conservés. Dans la méthode Hammerhead ne sont conservés pour l'étape de Docking que les meilleurs fragments qui s'alignent avec ceux de la pseudo-molécule. Ici tous les fragments sont pris en compte pour la recherche de configuration optimale du ligand.

Ainsi le résultat des configurations retenues pour s'apparier avec le ligand contient des molécules proches de l'alignement initial du ligand qui ont été localement modifiées par le



processus de fragmentation. Les fragments de ces configurations sont évalués puis une étape de sélection et de fusion des meilleurs fragments entre configurations permet d'obtenir un «conformère» global. Cette deuxième méthode se montre beaucoup plus rapide que la méthode Hammerhead pour des résultats au moins équivalents.

Dans la version de Surflex que nous avons utilisée (version 1.3), il s'agit de la méthode par défaut.

Pour l'utilisateur, l'emploi du logiciel passe par trois étapes :

- Choisir de quelle manière définir le site actif, soit à partir d'un ligand soit à partir du récepteur.
- Construire la «pseudo-molécule » qui sera la cible de la recherche de similarité.
- Enfin lancer le processus de Docking.

Le résultat est donné sous la forme des 10 meilleurs « conformères » au formatmol2. Chaque fichier possède trois scores : le premier d'affinité ; le second correspond au degré de pénétration impropre du ligand dans la protéine appelé «crash score», plus ce score est proche de 0 plus l'interaction est favorable et le troisième ou «polar score» correspond au niveau de contribution des interactions polaires. Plusieurs options, à rentrer en ligne de commande, permettent d'adapter le calcul suivant le nombre de torsions ou suivant l'espace conformationnelle à représenter avec la «pseudo-molécule ».

# **Partie Pratique**

**Matériels**

**et**

**Méthodes**

## I Matériel et Méthodes

Le but de cette partie pratique est de rechercher de nouvelles molécules inhibitrices de la cyclo-oxygénase en parallèle à une réduction de l'activation des récepteurs de cannabinoïdes CB1 en utilisant la technique de docking moléculaire par le logiciel Surflex.

### 1.1. Matériel

- **Ordinateurs : PC Intel (R) core TM i3 CPU 2,53 GHz avec 2 Go de mémoire RAM sur système d'exploitation 64 bits) Windows 7**
- **Le réseau internet** comme outil principal pour le téléchargement des programmes, des complexes et des ligands dont on a besoin.
- **Surflex v 1.3, 2005** : Logiciel principal de docking.
- **Titan** : Logiciel de construction de molécules
- **MS Viewer v 4.2** : programme de visualisation des molécules
- **VMD** : Logiciel de visualisation.
- **Une banque de donnée appelée la PDB (Protéine Data Bank)** c'est la principale source de données de biologie structurale, elle permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.
- **Open Babel 2.3.0** : C'est un programme utilisé pour faire la conversion des formats.

### 1.2. Méthodes

#### 1.2.1 Préparation des Ligands

Les inhibiteurs ou composés étudiés (substitués) de la cyclooxygénase Cox-2 tirés de la littérature ont été dessinés par le programme Titan en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome. Par la suite, une étape de minimisation d'énergie intramoléculaire (en appliquant la méthode semi-empirique AM1) est nécessaire afin d'optimiser géométriquement les molécules dessinées. Enfin, les ligands construits sont enregistrés sous format *.pdb*.

## 1.2.2. Préparation de l'enzyme et de récepteur

### 1.2.2.1. Obtention des structures

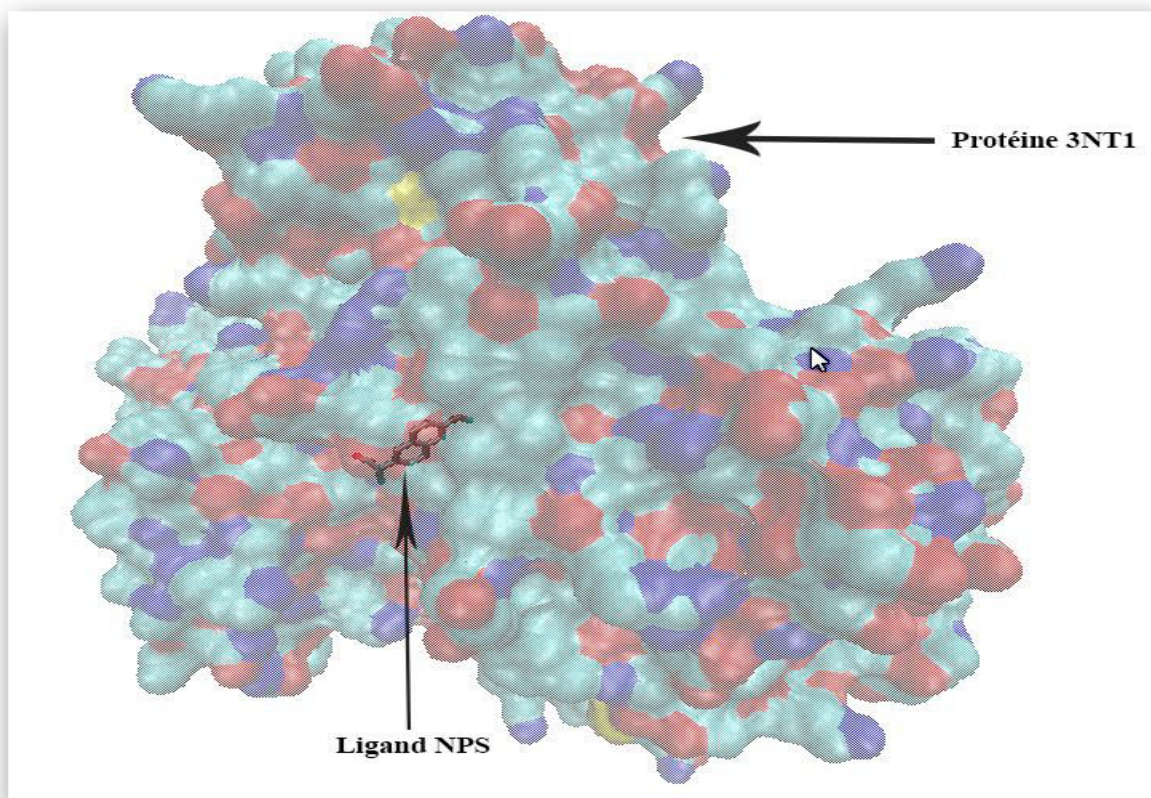
La majorité des structures protéiques sont disponibles via la «Protéine Data Bank » [117], un grand nombre de structures d'une même molécule avec ou sans ligand permet d'avoir une information pertinente.

### 1.2.2.2. Préparation de l'enzyme

La structure de la cyclo-oxygénase Cox-2, faisant l'objet de notre étude, a été obtenue via la banque de donnée PDB. Cette dernière nous a proposé plusieurs structures cristallographiques de complexes Cox2-Inhibiteur.

Parmi ces complexes, nous avons choisi les codes 3NT1. Ce choix est dicté par leur faible valeur de résolution. **Figure N°12**

Par la suite, nous avons gardé la chaîne A uniquement tout en éliminant les molécules d'eau et les différents ligands à l'aide de programme de visualisation VMD ou Viewer lite et ce pour une utilisation plus aisée de l'enzyme lors du docking moléculaire. L'enzyme ainsi préparée est enregistrée dans des fichiers de format .mol2 que reconnaît le programme Surflex.



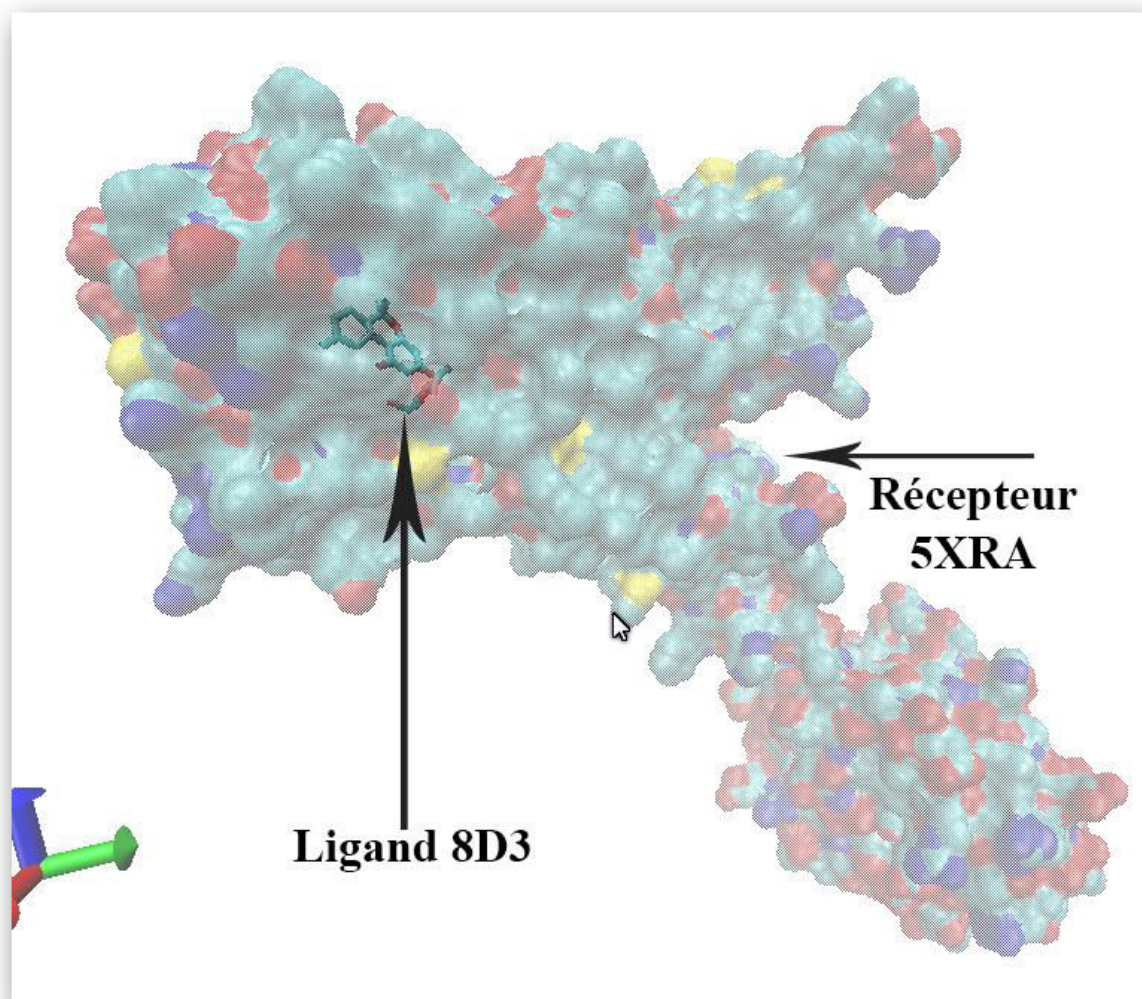
**Figure N°12.** Représentation par VMD du complexe 3NT1 avec le ligand pdb NPS positionné dans la cavité catalytique.

### 1.2.2.3. Préparation de Récepteur

La structure de Cb1 a été aussi obtenue via la banque de donnée Pdb structures cristallographiques du complexe Cb1-inhibiteur sous le code 5XRA.

Par la suite, nous avons gardé le récepteur uniquement tout en éliminant les molécules d'eau et les différents ligands et ce pour une utilisation plus aisée du récepteur lors du docking moléculaire. **Figure N°13**

Le récepteur ainsi préparé est enregistré dans un fichier de format .pdb que reconnaît le programme Surflex.



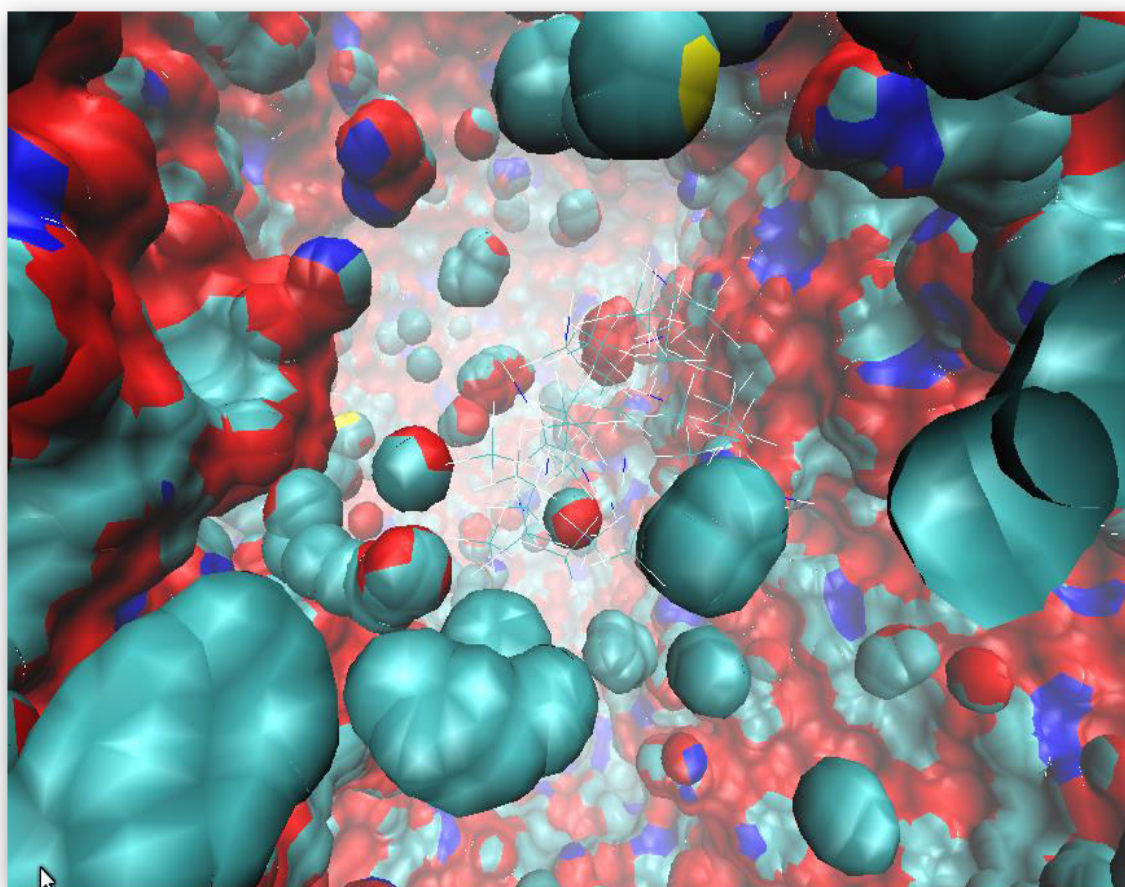
**Figure N°13.** Représentation par VMD du complexe 5XRA avec le ligand pdb 8D3 positionné dans le site de liaison.

### 1.2.3. Génération du protomol

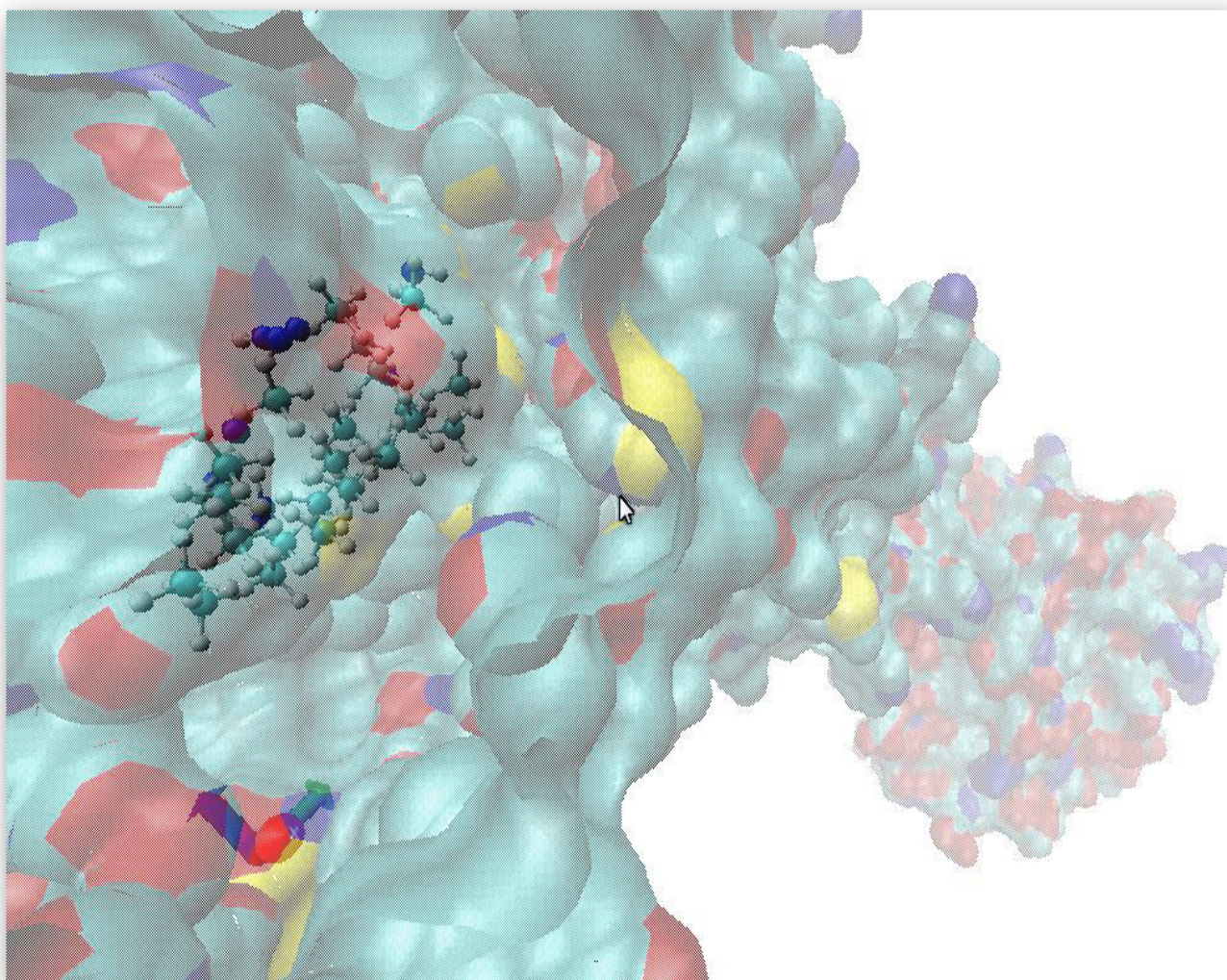
Le programme Surflex utilise l'algorithme de *Hammerhead* modifié pour réaliser le docking semi-flexible des ligands dans le site actif d'une cible donnée. Dans un premier temps, il génère une pseudo-molécule idéale pour interagir avec le site de liaison étudié, communément appelé «*protomol*» [49, 50].

Dans notre travail, nous avons généré le protomol de l'enzyme (**figure14**) et du récepteur (**figure18**) retenues en utilisant leur ligand de référence sous format *.pdb* et les fichiers de chacune des enzymes préparées sous format *.mol2* selon la commande suivante

```
surflex-dock proto ligand.pdb proteine.mol2 pl
```



**Figure N°14.** Protomol généré pour le complexe 3NT1



**Figure N°15.** Protomol généré pour le complexe 5XRA.

#### 1.2.4. Docking Moléculaire

Cette étape nécessite la disponibilité de la protéine au format *.mol2*, le protomol au format *.mol2* généré dans l'étape précédente et les ligands sous format *.pdb*. Le docking moléculaire par Surflex permet d'avoir les dix (10) meilleures positions (conformations) de chaque ligand au sein du site actif étudié, classées par leur score [49, 50]. Cette étape a été réalisée en utilisant la commande suivante :

**surflex-dock dock ligand.pdb pl-protomol.mol2 proteine.mol2**



### 1.2.5. Règle de Lipinski

Chaque médicament potentiel doit se conformer à plusieurs critères de base, tels son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologiques d'absorption, de distribution, métabolisme, d'excrétion et de toxicité (filtre ADME/Tox). Cette méthode est basée essentiellement sur la règle de 5 de Lipinski [123]:

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da)
- Le coefficient de partition (logP) doit être  $\leq 5$  (avec un optimum entre 0 et 3).
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être  $\leq 5$ ;
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être  $\leq 10$ .
- nombre de fonctions rotatables  $\leq 15$

**LogP** : est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau ( $\text{LogP} = \text{Log Coct/Ceau}$ ). Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. En effet, une molécule doit, pour parvenir dans l'organisme jusqu'à son lieu d'action, se dissoudre dans des phases aqueuses, traverser des membranes lipidiques, des phases protéiques et osidiques. La solubilité dans l'eau et dans les lipides ainsi que le coefficient de partage jouent dans ce transport, un rôle fondamental. Une molécule dotée d'une action plus rapide doit avoir un coefficient de partage qui favorise le plus son transport.

Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins deux des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité. En complément de ces règles, d'autres critères sont pris en compte dans la sélection de molécules potentiellement candidates:

- Nombre d'halogènes  $\leq 7$  ;
- Chaines alkyles  $\leq \text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-CH}_3$  ;
- Nombre de cycles  $\leq 6$  ;
- Pas de grands cycles de plus de 7 membres ;
- Au moins un atome d'azote ou d'oxygène dans la molécule.

Dans notre travail, ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur

« Molinspiration » version 2013 utilisant la commande «**Calculate Propertie** » **Figure N°16.**

The screenshot shows the Molinspiration website interface. At the top, there is a browser address bar with the URL [www.molinspiration.com/cgi-bin/properties](http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties) and a search bar with the text "Rechercher". The Molinspiration logo is on the left, and the page title "Calculation of Molecular Properties and BioactivityScore" is on the right. Below the logo, there is a text input field labeled "Enter SMILES" and a "Clear" button. Below the input field, it says "or draw molecule below". To the left of the drawing area is a toolbar with various chemical drawing tools, including a smiley face, a box, a red X, a red R, a plus sign, a minus sign, a curved arrow, a straight arrow, a pink X, and an 'i' icon. Below the toolbar is a vertical stack of buttons for elements: C, N, O, S, F, Cl, Br, I, P. To the right of the drawing area are three buttons: "Calculate Properties" (blue), "Predict Bioactivity" (yellow), and "Galaxy 3D Generator" (pink). Below these buttons are three links: "Molinspiration home", "Molinspiration products and services", and "Molinspiration services FAQ".

**Figure N°16.** Représentation de l'interface du serveur Molinspiration pour le calcul des Paramètres décrits par Lipinski.

# **Résultats**

## **Et**

# **Discussion**

## 2. Résultats et Discussions

### 2.1. La fiabilité du programme Surfex-dock

#### • Par calcul du RMSD

Le test de fiabilité du programme Surfex par le RMSD, a été réalisé en utilisant 100 complexes protéines-ligands pris de manière arbitraire de la PDB tableau N°02. Les complexes sont téléchargés au format pdb après introduction dans la PDB du code correspondant à chaque complexe.

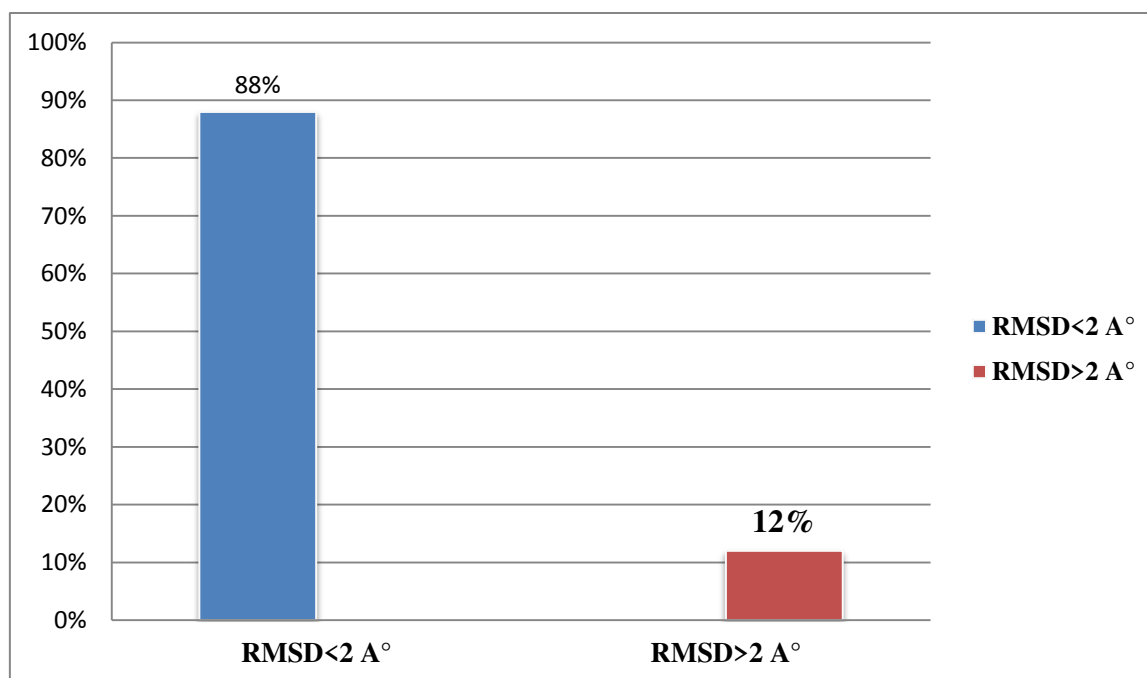
Dans la figure suivante (**Figure 17**), les résultats sont donnés en pourcent (%), à deux intervalles de RMSD.

**Tableau N°02.** Résultats de test de fiabilité du programme par le RMSD

	COMPLEXE	CODE	RMSD
1	1AZ1	ALR	1.331
2	1AZ2	CIT	1.078
3	1EF3	C7I	0.012
4	1EL3	I84	1.893
5	1IEI	ZES	2.039
6	1PWL	BFI	1.884
7	1US0	LDT	1.683
8	1T40	ID5	1.085
9	1T41	ID5	1.626
10	1Z3N	3NA	3.025
11	2ACQ	G6P	0.450
12	2ACR	CAC	0.031
13	2DUX	ZST	1.565
14	2DUZ	ZST	1.383
15	2FZ9	ZST	1.545
16	2FZ8	ZST	1.349
17	2HVN	ZST	1.093
18	2HVO	ZST	1.129
19	2HV5	ZST	0.572
20	2IKH	LIT	1.390
21	2IKJ	393	1.636
22	2IKI	388	1.388
23	2I17	FLC	0.851
24	1A9M	U0E	1.758

25	1B6M	PI6	1.646
26	1B6P	P17	1.738
27	1DIF	A85	0.717
28	1EBW	BEI	1.225
29	1EBY	BEB	1.531
30	1EBZ	BEC	1.274
31	1EC0	BED	1.082
32	1EC2	BEJ	0.687
33	1EC1	BEE	0.500
34	1EC3	MS3	1.437
35	1GNM	U0E	1.640
36	1MSM	JE2	1.918
37	1ODY	LP1	1.611
38	1OHR	1UN	1.601
39	1PRO	A88	1.713
40	1QBR	XV6	1.066
41	1QBT	146	1.055
42	1QBU	846	1.758
43	1TCX	IM1	1.396
44	1W5W	BE4	1.958
45	1W5X	BE5	1.490
46	1W5Y	BE6	1.778
47	1WBM	BLL	1.621
48	2BPV	1IN	1.740
49	2BPY	3IN	2.024
50	2BQV	A1A	1.057
51	3AID	ARQ	1.211
52	3FX5	KNI	4.902
53	1DTT	FTC	1.496
54	1IKV	EFZ	1.417
55	1W5V	BE3	1.281
56	3CKT	YDP	2.387
57	3GI4	K60	1.525
58	3GI5	K62	1.796
59	3GI6	D78	1.808
60	3MXD	K53	1.787
61	3MXE	K54	2.090
62	3OK9	G52	1.296
63	3OXX	DR7	1.738
64	2I16	LDT	0.072
65	2PDX	ZST	1.051
66	2PDY	FID	1.977
67	4GAB	FID	1.960
68	2R24	LDT	0.854
69	3G5E	Q74	2.154
70	3GHS	LDT	1.472
71	3GHT	LDT	1.472
72	3GHU	LDT	0.596

73	3LD5	LDT	1.331
74	3LEN	ZST	1.483
75	3LQG	388	1.655
76	3LQL	LDT	0.772
77	3M4H	388	1.749
78	3MB9	ZST	1.436
79	3MC5	393	1.668
80	3Q65	SO4	7.057
81	3XR2	SFI	2.683
82	3XR4	SUZ	1.870
83	3S3G	TLT	1.660
84	3T42	3T4	1.835
85	3M64	393	1.528
86	3D20	017	0.459
87	1QAO	SAM	1.830
88	2WDY	COA	1.690
89	3M8P	65B	1.752
90	3M8Q	DJZ	1.072
91	2BAN	357	0.544
92	1G27	BB1	1.590
93	4XFI	HCS	0.055
94	4ONG	IMD	11.166
95	5CGX	1S7	1.556
96	1RAE	CTP	2.196
97	4RCD	3LL	2.598
98	4WXC	EDO	0.027
99	4DXJ	IPE	1.987
100	4URU	6W2	0.626



**Figure 17.** Résultats en % obtenus par Surflex à deux intervalles de RMSD (Å).

D'après ces résultats il ressort que 88% des valeurs de RMSD sont inférieures à 2 Å et que seulement 12 % de ces valeurs sont supérieures à 2 Å, et ce conformément aux travaux de Teniou S. (2012) et Merzoug et al. (2015) qui révèlent un taux de RMSD inférieur à 2Å de 85,8% et de 83 %, respectivement pour le même programme de docking moléculaire.

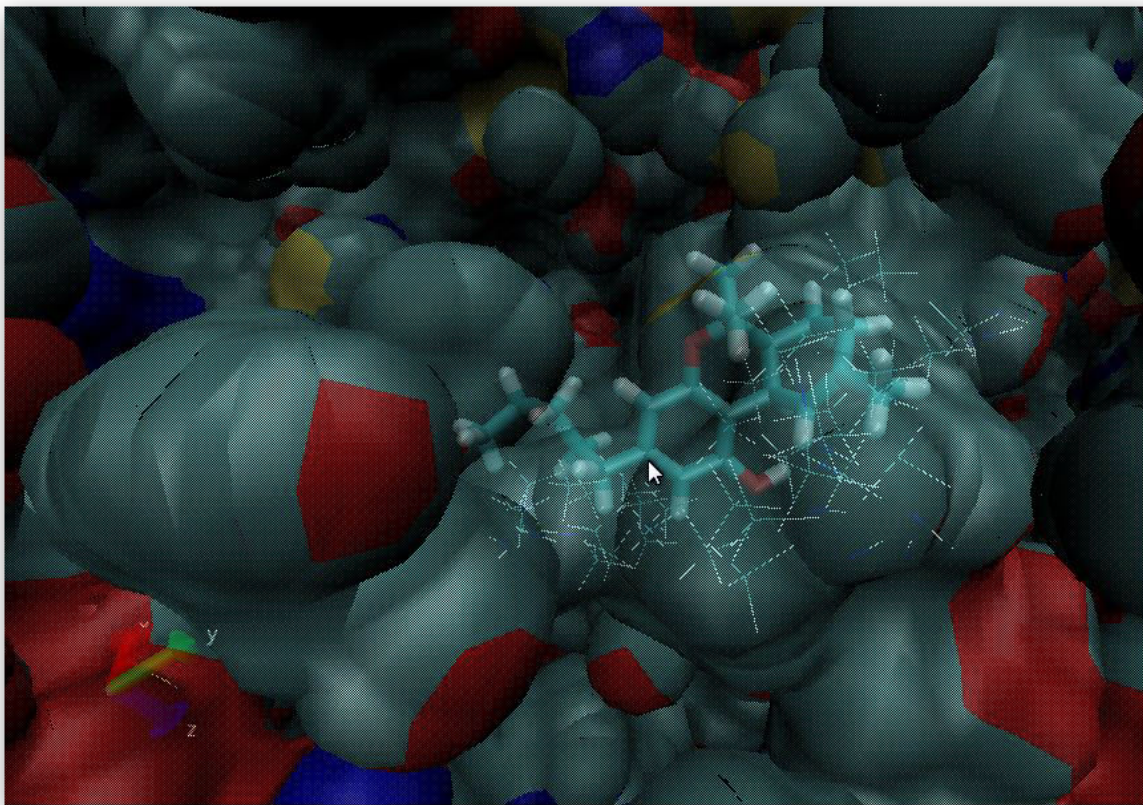
On peut donc conclure que le programme Surflex peut être considéré comme suffisamment performant et peut être utilisé sans trop de risques d'erreurs pour simuler la formation des complexes enzyme-inhibiteurs

## 2.2. Etude des interactions du THC-COX-2 et THC-Cb1

L'étude bibliographique réalisée au début de ce travail ne fait état d'aucune citation sur la modélisation pour docking moléculaire de l'interaction du THC avec le site actif de la cox-2 ou le récepteur Cb1. De ce faite, il nous a semblé judicieux d'envisager une étude in silico faisant appel au programme Surflex pour modéliser les interactions des complexes protéine-ligand mettant en jeu le THC et déjà existant dans la PDB. Ceci aura pour but de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition mis en place par ce composé et de nous aider à développer de nouveaux ligands de la cox-2 (inhibiteur) et du récepteur Cb1.

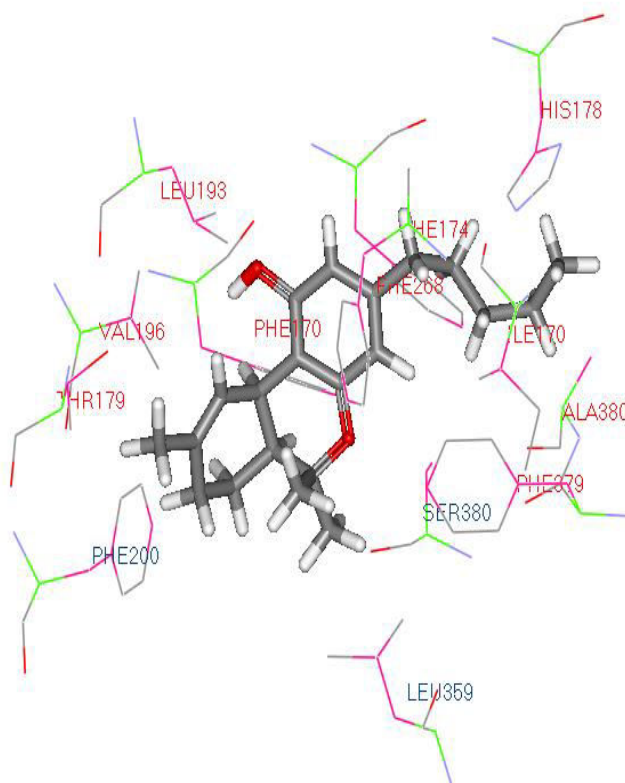
### 2.2.1. Etude des interactions THC-Cb1

La reconstruction du complexe 5XRA de la PDB par docking moléculaire avec Surflex montre un bon positionnement de THC dans le site de liaison du récepteur Cb1 (**Figure 18**) avec un score ou une affinité s'évaluant à 2.56. Ce score résulte de la mise en place de nombreuses interactions hydrophobiques avec les résidus LEU193, HIS178, PHE174, PHE268, ILE170, ALA380, PHE379, SER380, LEU359, PHE200, THR179, VAL196 et PHE170. L'absence de liaisons hydrogène est à souligner dans la formation de ce complexe (**Figure 19**)



**Figure N°18.** Représentation du positionnement THC dans le site de liaison du récepteur des Cannabinoïdes.

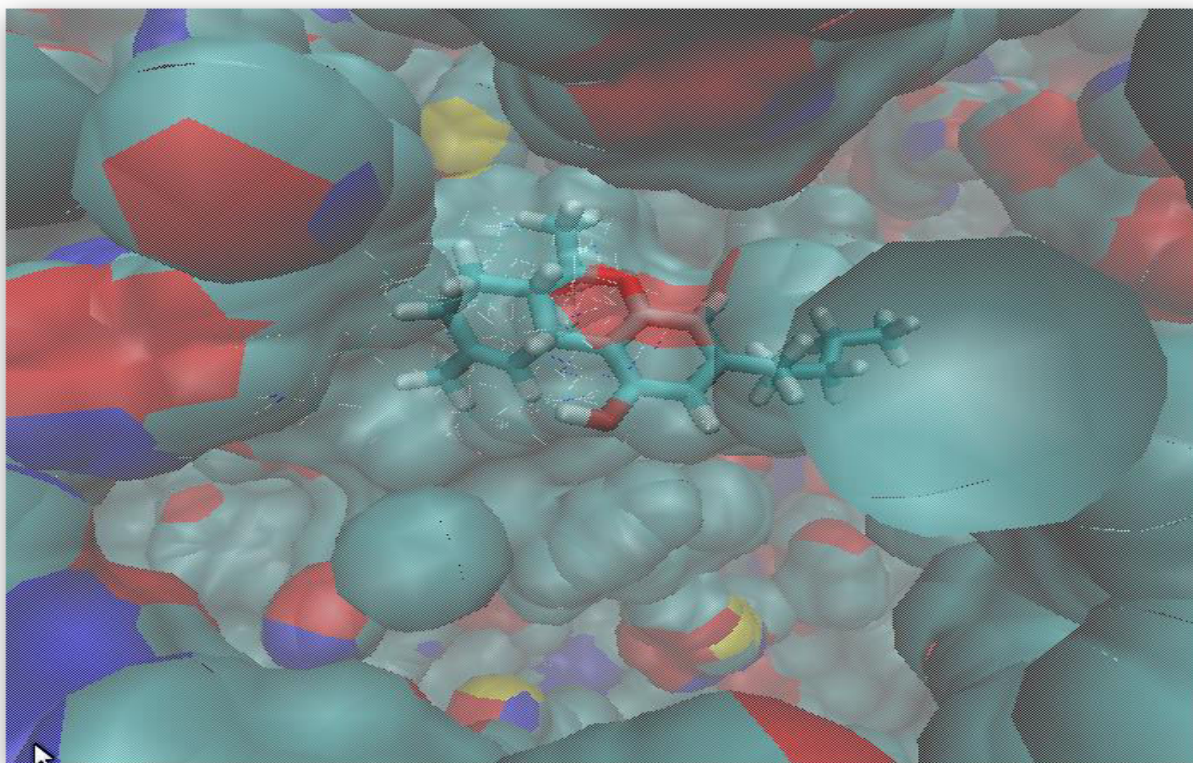




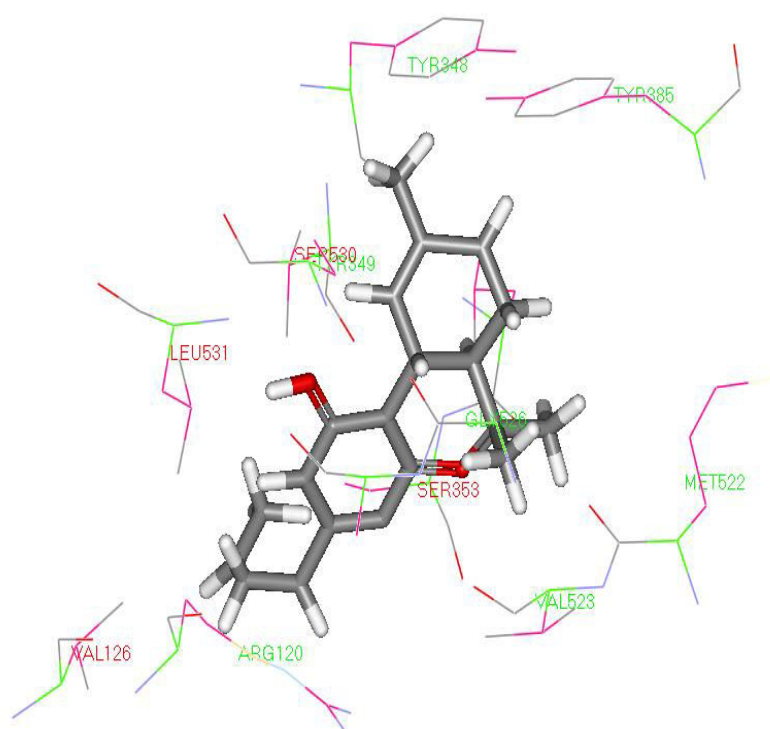
**Figure N°19.** Représentation du positionnement THC dans le site de liaison du récepteur des Cannabinoïdes.

### 2.2.2. Etude des interactions THC-COX-2

La reconstruction du complexe THC-COX-2 par docking moléculaire avec Surflex à partir du complexe 3NT1 de la PDB donne un score de 1.46 moins faible que celui du complexe THC-Cb1 (**Figure 20**) Ce score résulte de la mise en place de différentes interactions hydrophobiques avec les résidus TYR 348, TYR385, GLY526, MET522, VAL523, SER353, ARG120, VAL126, LEU531, SER530 et TYR349 (**Figure 21**). Comme précédemment l'absence de liaisons hydrogène est également à souligner dans cette interaction (**figure N°22**)



**Figure N°20.** Représentation du positionnement THC dans le site actif du cyclo-oxygénase 2.



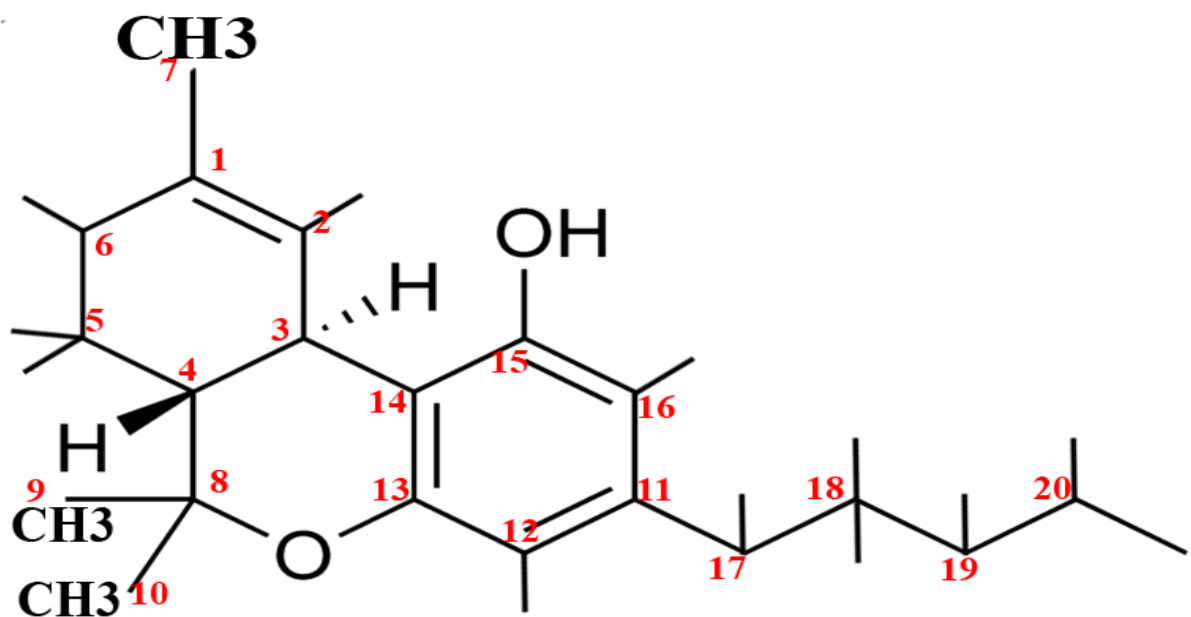
**Figure N°21.** Représentation du positionnement THC dans le site actif du cyclo-oxygénase 2.

### 2.3. Les mono et bi-substitution de la THC

L'objectif visé par es substitutions est l'amélioration de l'affinité du THC pour la COX-2 et la diminution simultanée de celle-ci pour le récepteur cannabinoïdes Cb1.

Nous avons pris comme structure de base la molécule **THC** (**figure 22**) préparé par le logiciel de construction de molécules **Titan**.

Les résultats des différentes mono substitutions et bi substitution sont représentés dans les tableaux 3 et 4 ci-dessous.



**Figure 22.** Structure de la molécule de base **THC**

Mono substitution																				Affinité Cox2	Affinité CB1
	C1	C2	C3	C4	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	1.47	2.56
1	COOH																			3.73	2.43
2		COOH																		0.82	4.51
3			COOH																	2.27	1.69
4				COOH																-1.80	3.24
5					COOH															3.12	3.37
6						COOH														-1.38	3.02
7							COOH													1.40	2.83
8								COOH												3.41	3.77
9									COOH											2.90	2.27
10										COOH										1.78	2.81
11											COOH									-3.78	0.08
12												COOH								-3.55	1.33
13													COOH							1.71	2.88
14														COOH						2.31	2.39
15															COOH					-0.82	1.78
16																COOH				1.66	2.89
17																	COOH			-4.39	2.04
18																		COOH		-1.81	1.67
19																			COOH	0.89	2.70
20	NH2																			0.96	2.50
21		NH2																		2.09	3.48
22			NH2																	1.73	2.69
23				NH2																0.85	4.71
24					NH2															1.91	3.22
25						NH2														3.00	3.24
26							NH2													3.04	3.46
27								NH2												3.37	2.19

28									NH2											1.57	3.63	
29										NH2											0.42	1.18
30											NH2										2.33	3.17
31												NH2									3.29	1.76
32													NH2								0.94	2.12
33														NH2							3.92	3.34
34															NH2						1.84	4.33
35																NH2					2.32	4.46
36																	NH2				3.47	4.21
37																		NH2			5.59	4.88
38																			NH2		4.02	5.47
39	Br																				3.68	3.28
40		OH																			0.34	3.19
41			OH																		0.48	2.24
42				OH																	-0.07	4.25
43					OH																3.69	3.25
44						OH															2.50	4.51
45							OH														3.48	3.36
46								OH													4.80	3.45
47									OH												1.86	3.39
48										OH											3.12	2.20
49											OH										0.05	3.62
50												OH									1.68	2.65
51													OH								2.31	3.97
52														OH							3.06	4.36
53															OH						2.70	1.66
54																OH					2.18	4.21
55																	OH				2.95	4.08
56																		OH			3.65	4.10
57																			OH		4.56	4.13
58	CONH <sub>2</sub>																				2.71	1.19

59		CONH <sub>2</sub>																			<b>3.41</b>	<b>0.15</b>	
60			CONH <sub>2</sub>																			<b>3.76</b>	<b>2.36</b>
61				CONH <sub>2</sub>																		<b>0.55</b>	<b>1.36</b>
62					CONH <sub>2</sub>																	<b>1.77</b>	<b>4.48</b>
63						CONH <sub>2</sub>																<b>-0.85</b>	<b>3.29</b>
64							CONH <sub>2</sub>															<b>0.33</b>	<b>4.43</b>
65								CONH <sub>2</sub>														<b>2.40</b>	<b>4.12</b>
66									CONH <sub>2</sub>													<b>-0.03</b>	<b>2.37</b>
67										CONH <sub>2</sub>												<b>3.22</b>	<b>1.09</b>
68											CONH <sub>2</sub>											<b>-2.30</b>	<b>-0.57</b>
69												CONH <sub>2</sub>										<b>-0.91</b>	<b>4.33</b>
70													CONH <sub>2</sub>									<b>1.43</b>	<b>3.89</b>
71														CONH <sub>2</sub>								<b>2.08</b>	<b>5.44</b>
72															CONH <sub>2</sub>							<b>0.53</b>	<b>4.24</b>
73																CONH <sub>2</sub>						<b>2.19</b>	<b>5.79</b>
74																	CONH <sub>2</sub>					<b>3.40</b>	<b>5.72</b>
75																		CONH <sub>2</sub>				<b>3.23</b>	<b>5.61</b>
76																			CONH <sub>2</sub>			<b>4.16</b>	<b>6.09</b>

	Bisubstitution																				Affinité Cox2	Affinité CB1	
	C1	C2	C3	C4	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	3.41	0.15	
77	COOH	CONH2																				-2.01	1.70
78		CONH2	COOH																			0.97	2.22
79		CONH2		COOH																		-2.82	2.90
80		CONH2			COOH																	2.63	3.34
81		CONH2				COOH																-3.89	2.68
82		CONH2					COOH															-1.68	2.95
83		CONH2						COOH														1.67	3.91
84		CONH2							COOH													-1.34	3.58
85		CONH2								COOH												-2.93	2.20
86		CONH2									COOH											-5.14	1.95
87		CONH2										COOH										-5.14	2.97
88		CONH2											COOH									0.16	3.20
89		CONH2												COOH								2.69	3.36
90		CONH2													COOH							-3.38	2.32
91		CONH2														COOH						-2.31	3.24
92		CONH2															COOH					2.35	4.21
93		CONH2																COOH				-2.58	4.96
94		CONH2																	COOH			3.32	4.14
95		CONH2																		COOH		0.65	3.11
96	NH2	CONH2																				1.53	4.17
97		CONH2	NH2																			1.39	2.03
98		CONH2		NH2																		0.25	1.72
99		CONH2			NH2																	0.04	2.98
100		CONH2				NH2																-0.74	1.70
101		CONH2					NH2															2.23	1.90
102		CONH2						NH2														2.87	3.13
103		CONH2							NH2													0.69	1.24
104		CONH2								NH2												1.03	1.90

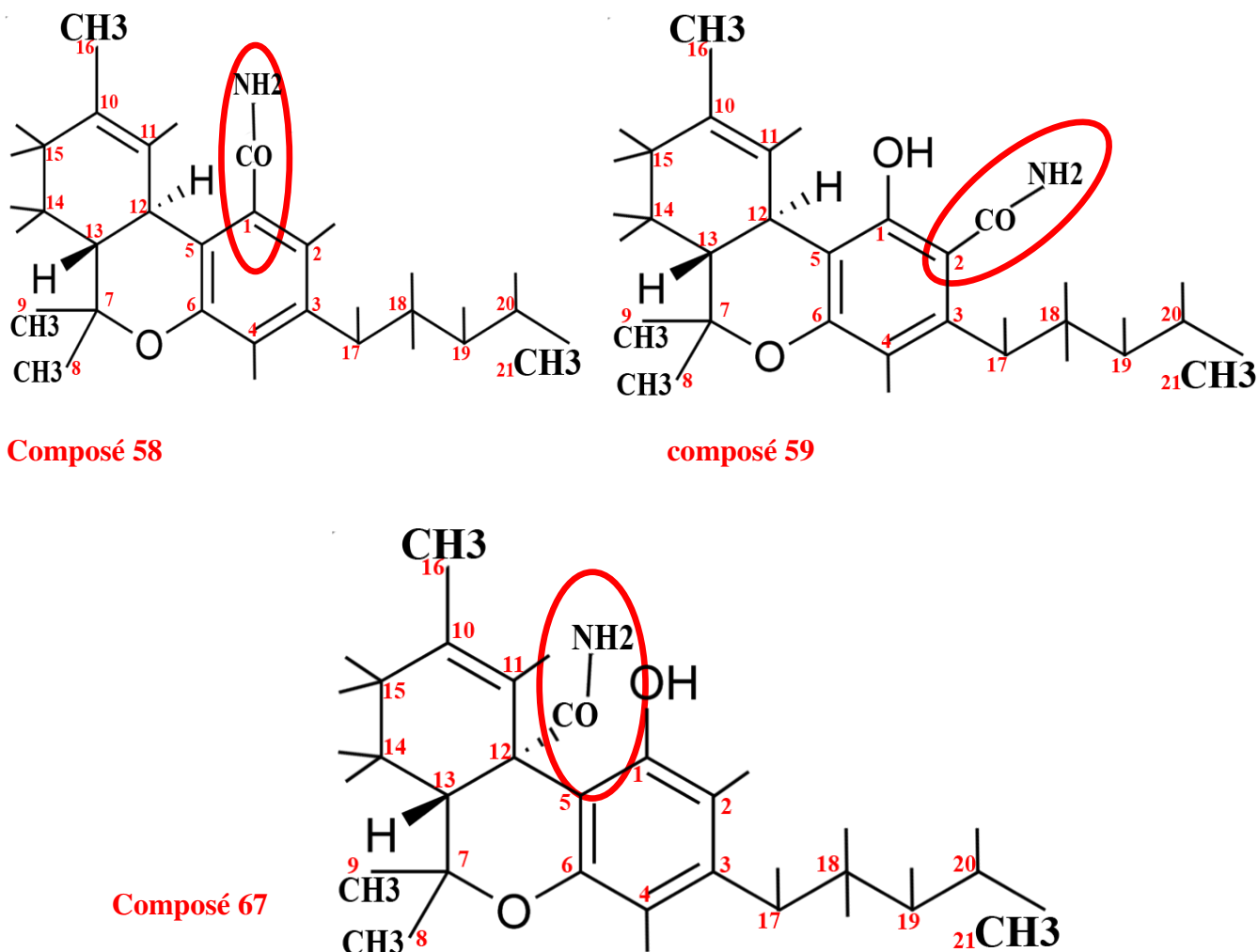
105		CONH2								NH2										0.63	3.36
106		CONH2									NH2									2.63	2.61
107		CONH2										NH2								-0.20	3.08
108		CONH2											NH2							3.85	4.29
109		CONH2												NH2						-2.07	3.91
110		CONH2													NH2					0.78	3.67
111		CONH2														NH2				0.12	4.50
112		CONH2															NH2			-0.99	5.10
113		CONH2																NH2		-1.91	5.58
114		CONH2																	NH2	-0.74	2.80
115	Br	CONH2																		2.08	0.58
116		CONH2	OH																	1.23	2.62
117		CONH2		OH																1.94	4.59
118		CONH2			OH															1.91	3.36
119		CONH2				OH														1.03	1.78
120		CONH2					OH													2.05	2.50
121		CONH2						OH												-1.46	1.51
122		CONH2							OH											1.79	3.42
123		CONH2								OH										-0.56	0.68
124		CONH2									OH									-2.10	-0.66
125		CONH2										OH								2.37	2.87
126		CONH2											OH							1.06	3.31
127		CONH2												OH						3.00	3.58
128		CONH2													OH					-1.28	5.01
129		CONH2														OH				0.61	3.74
130		CONH2															OH			3.27	4.02
131		CONH2																OH		2.86	4.35
132		CONH2																	OH	2.04	5.03
133		CONH2																		2.89	2.31
134	CONH <sub>2</sub>	CONH2																		0.65	-0.69
135		CONH2	CONH <sub>2</sub>																	3.79	2.33



<b>136</b>		CONH2		CONH <sub>2</sub>																<b>0.26</b>	<b>3.76</b>	
<b>137</b>		CONH2			CONH <sub>2</sub>															<b>-0.48</b>	<b>1.40</b>	
<b>138</b>		CONH2				CONH <sub>2</sub>														<b>-1.51</b>	<b>0.88</b>	
<b>139</b>		CONH2					CONH <sub>2</sub>													<b>0.88</b>	<b>1.72</b>	
<b>140</b>		CONH2						CONH <sub>2</sub>												<b>3.26</b>	<b>3.34</b>	
<b>141</b>		CONH2							CONH <sub>2</sub>											<b>-1.70</b>	<b>1.18</b>	
<b>142</b>		CONH2								CONH <sub>2</sub>										<b>-2.36</b>	<b>1.88</b>	
<b>143</b>		CONH2									CONH <sub>2</sub>									<b>-5.78</b>	<b>0.33</b>	
<b>144</b>		CONH2										CONH <sub>2</sub>								<b>1.45</b>	<b>4.72</b>	
<b>145</b>		CONH2											CONH <sub>2</sub>							<b>-1.26</b>	<b>4.25</b>	
<b>146</b>		CONH2												CONH <sub>2</sub>						<b>0.69</b>	<b>5.29</b>	
<b>147</b>		CONH2													CONH <sub>2</sub>					<b>-5.16</b>	<b>3.40</b>	
<b>148</b>		CONH2														CONH <sub>2</sub>				<b>-0.29</b>	<b>3.97</b>	
<b>149</b>		CONH2															CONH <sub>2</sub>			<b>-0.65</b>	<b>4.51</b>	
<b>150</b>		CONH2																CONH <sub>2</sub>		<b>-0.62</b>	<b>5.71</b>	
<b>151</b>		CONH2																	CONH <sub>2</sub>	<b>-2.06</b>	<b>4.74</b>	
<b>152</b>		CONH2																		CONH <sub>2</sub>	<b>-2.22</b>	<b>4.10</b>

Ces deux tableaux montre que parmi les différentes substitutions réalisés sur le THC, seuls les composés monosubstitués ont présenté une amélioration des résultats escomptés. En effet, les composés bisubstitués n'ont présenté aucune amélioration, contrairement aux composés monosubstitués dont 03 composés ont donné des résultats satisfaisants à savoir une amélioration de l'affinité pour la COX-2 et une diminution de celle-ci pour le Cb1, il s'agit des composés 3,9,14,27,31,48,53,58,59,60 et 67.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'interactions des composés avec la COX-2 et le Cb1, nous sommes consacrés à une étude plus approfondie de ces interactions par une analyse visuelle des trois meilleurs dérivés du THC, à savoir les composés 58,59,67 **figure 23**

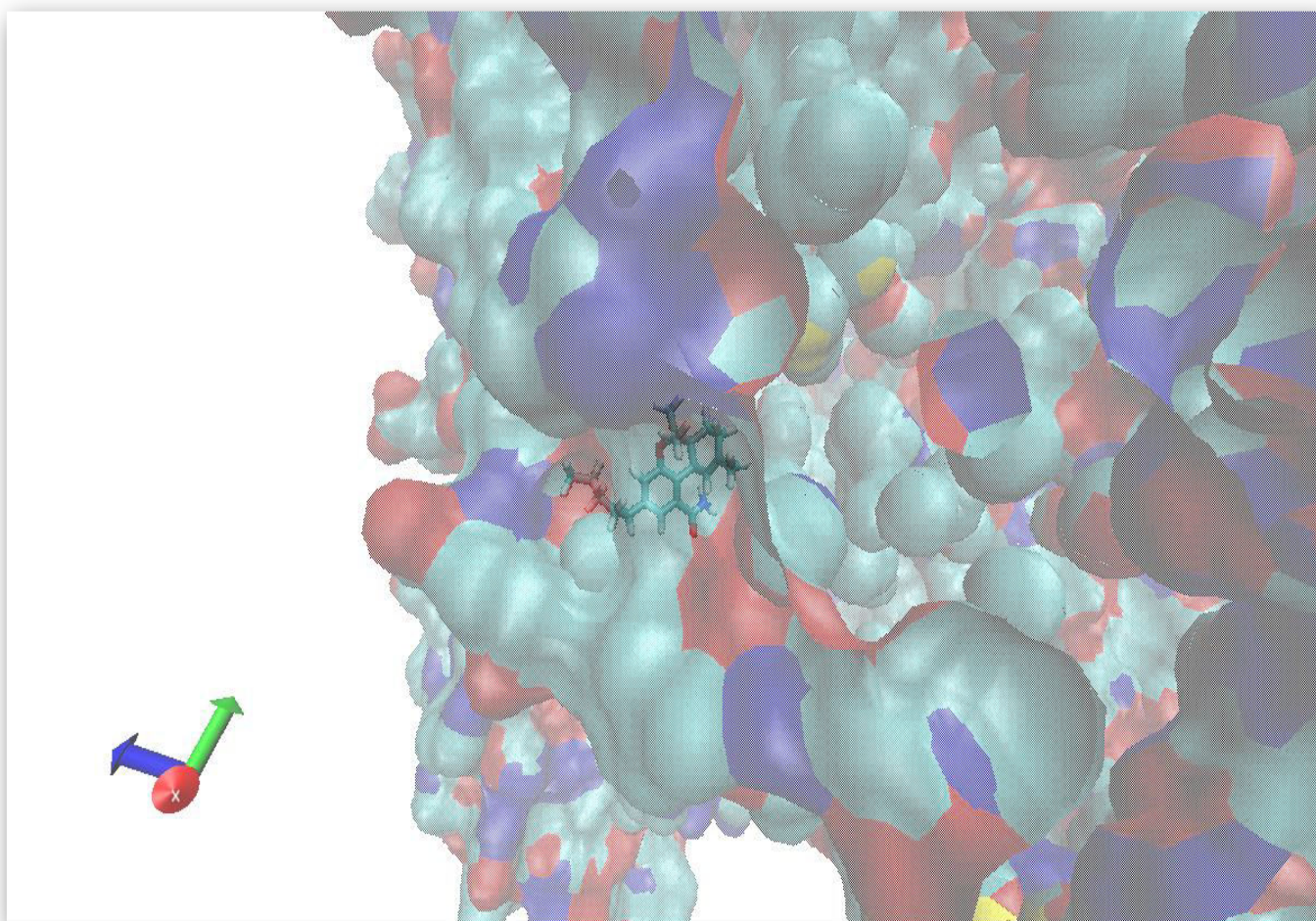


**Figure N° 23.** Structure des trois meilleurs dérivés du THC.

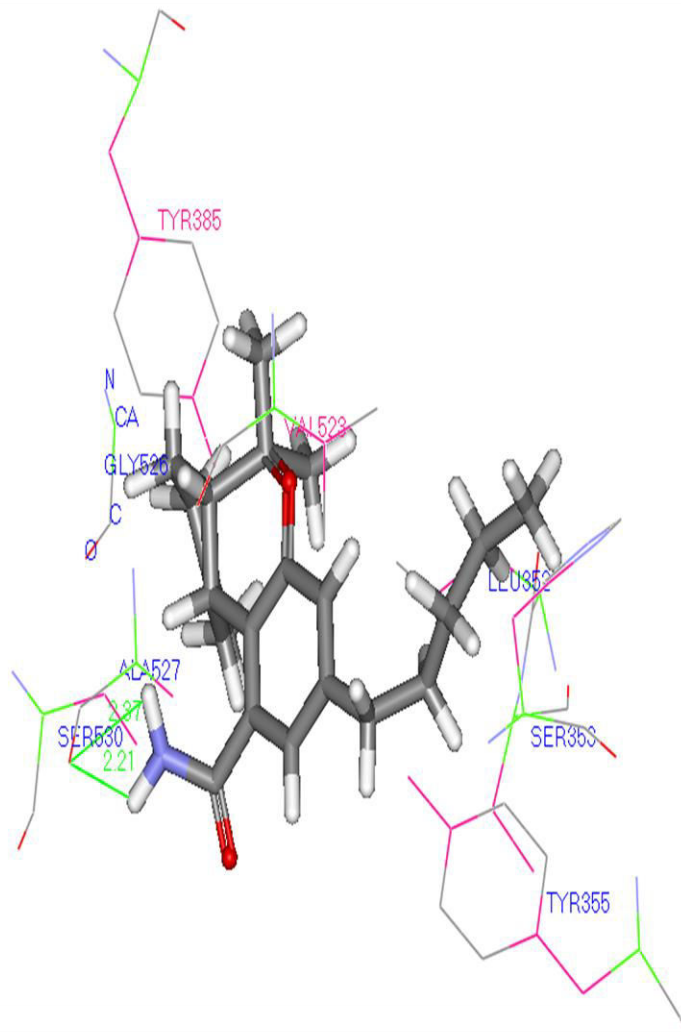
### 2.3.1- Etude des interactions du composé 58

#### 2.3.1.1. Interaction avec la COX-2

L'introduction d'une fonction amide CO-NH<sub>2</sub> sur le C1 du THC a permis d'obtenir le composé 58 dont la valeur de l'affinité est passée de 1.47 à 2.71 , cette amélioration du score se traduit par un bon positionnement du composé 58 dans la cavité catalytique de l'enzyme (**figure 24**) ou les hydrogènes portés par l'azote de la fonction amide liée au C1 forment deux liaisons hydrogènes avec l'oxygène du résidu ALA527 de la COX2 (d1 : 2.37 Å et d2 : 2.21 Å) .Le complexe COX-2-composé 58 est également stabilisé par plusieurs interactions hydrophobes avec les résidus TYR358, VAL523, LEU352, GLY526, SER530, TYR355 et SER353. (**figure N° 25**)



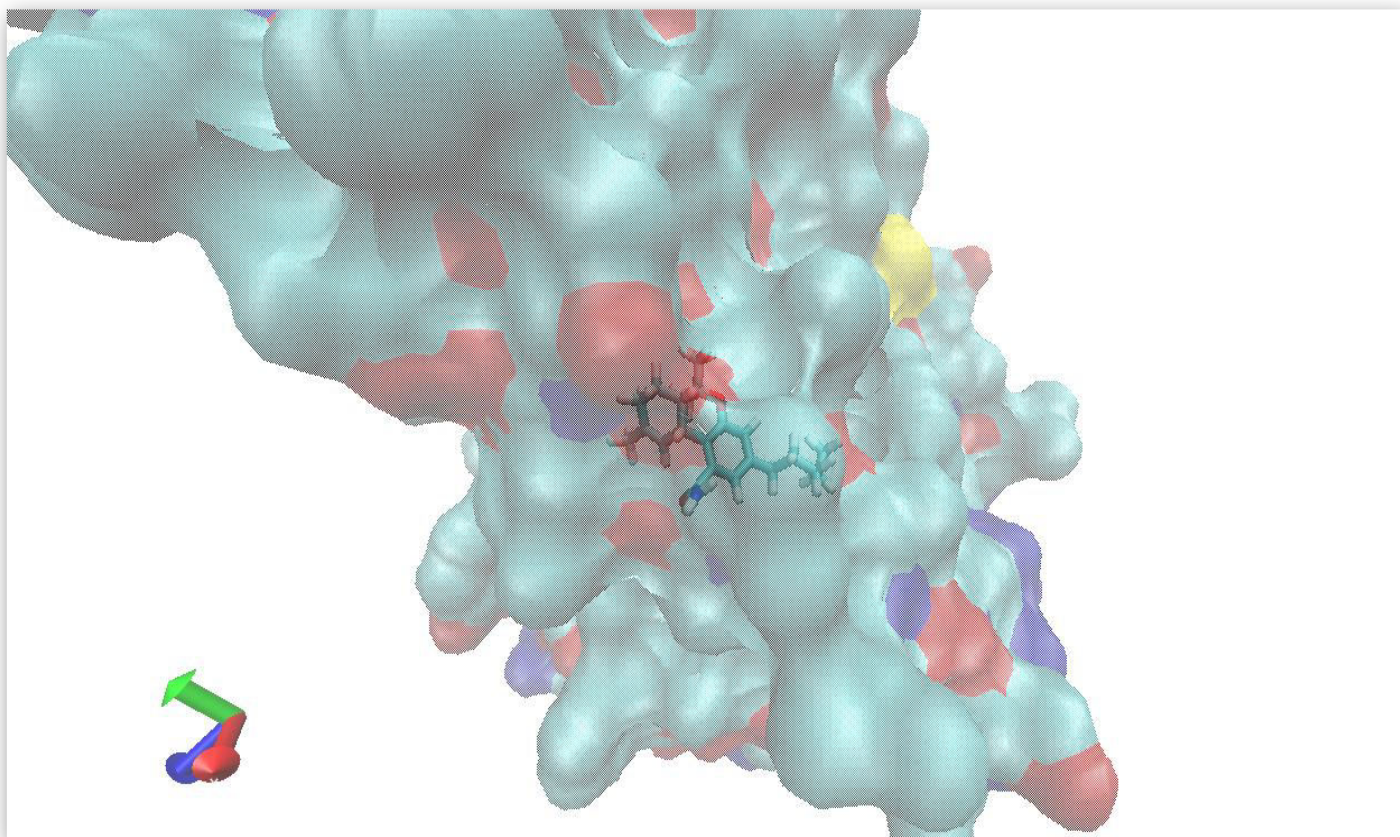
**Figure N° 24.** Représentation du positionnement du composé N°58 dans le site actif de la COX-2



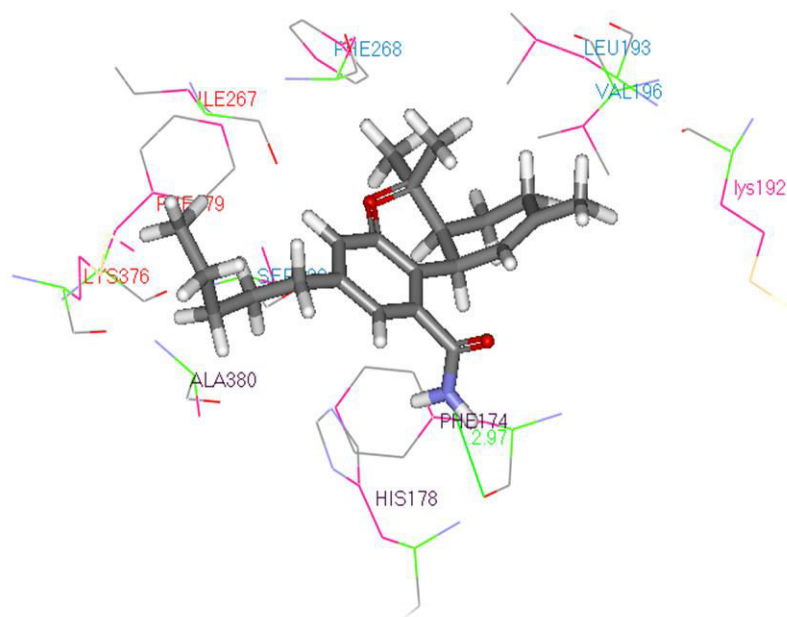
**Figure N° 25.** Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°58 et le site actif de la COX-2.

### 2.3.1.2- Interaction avec la Cb1

Contrairement à la COX-2, le composé 58 montre une baisse du score avec le Cb1 dont la valeur est passée de 2.56 à 1.19. cette faible affinité par rapport au THC s'explique par l'absence des liaisons hydrogènes et une diminution des interactions hydrophobiques entre le composé 58 et le récepteur Cb1 ou seuls interviennent les résidus suivants : HIS178 , LYS192 , LEU193 , VAL196 , PHE268 , ILE 267 , PHE379,LYS376 , ALA380 et SER383(**Figure N° 26**).



**Figure N° 26.** Représentation du positionnement du composé N°58 dans le site de liaison de la Cb1

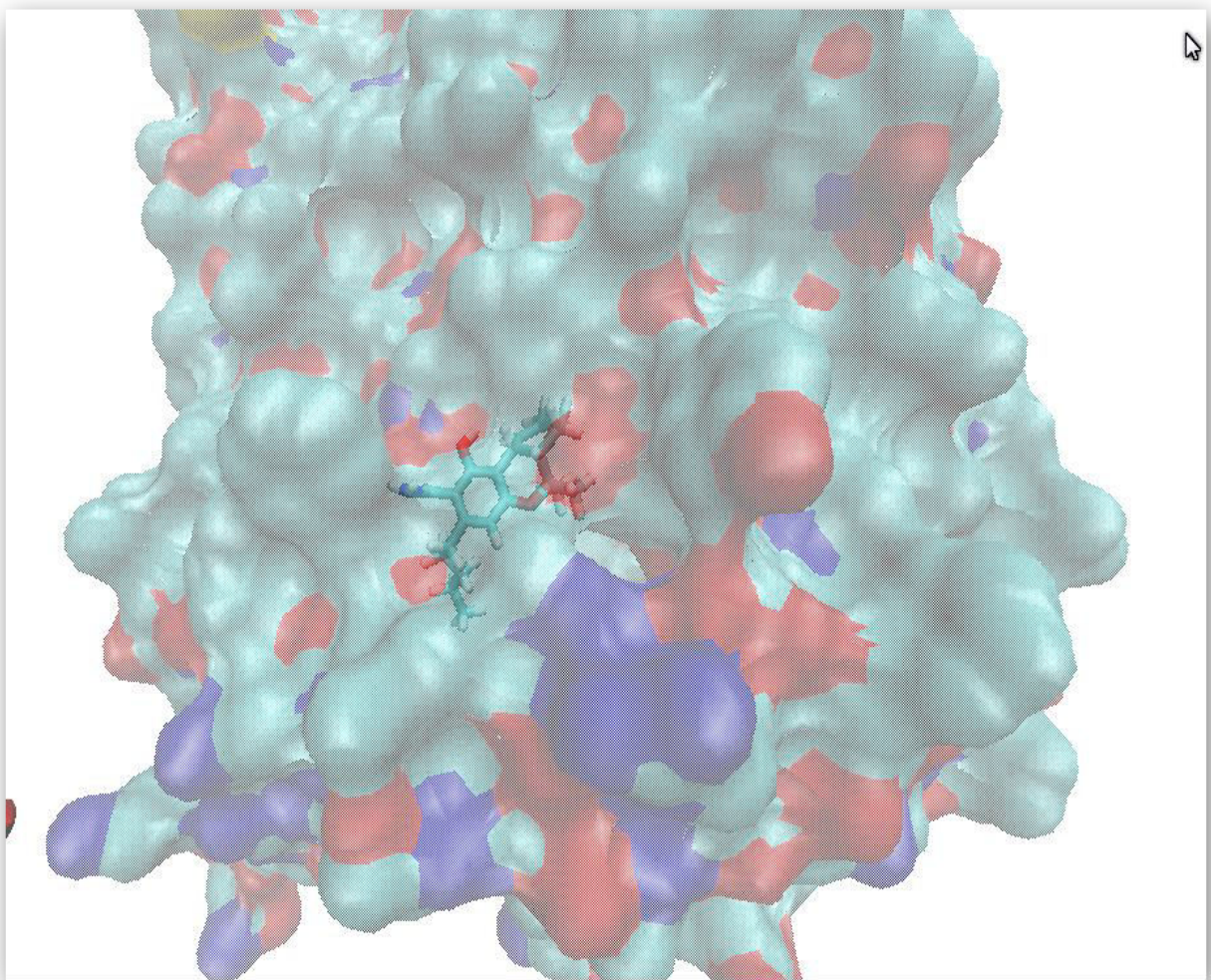


**Figure N° 27.** Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°58 et le site de liaison de la Cb1.

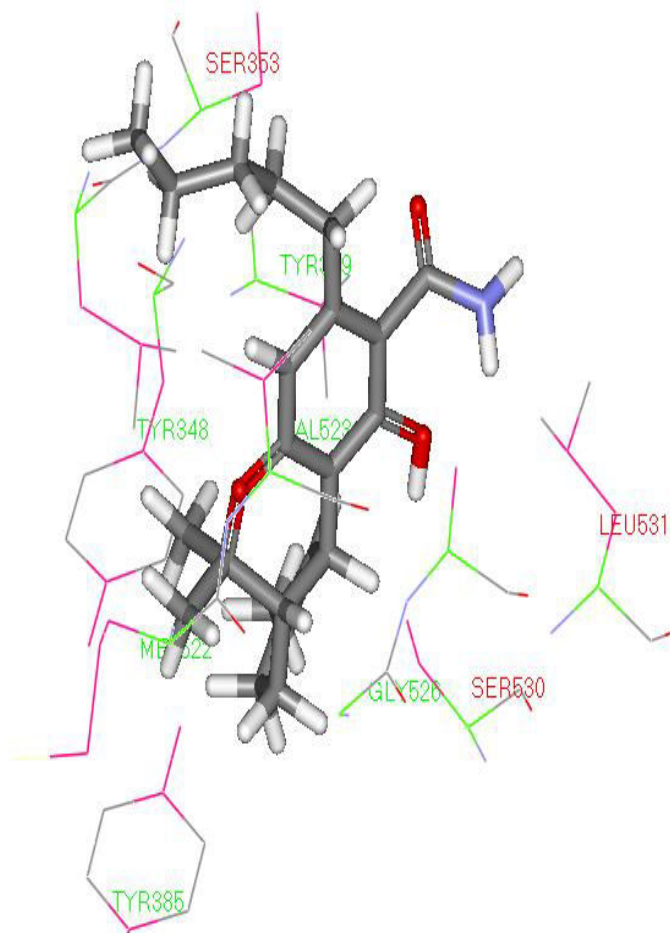
### 2.3.2. Etude des interactions du composé 59

#### 2.3.2.1. Interaction avec la COX-2

L'étude de l'interaction du composé 59 avec la COX2 révèle un véritable sursaut de l'affinité dont la valeur a plus que doublé passant de 1.47 à 3.41, cette nette amélioration du score se caractérise par un bon positionnement du composé 59 dans le site actif de l'enzyme (**figure 28**) , met en jeu une amélioration des liaisons hydrophobiques fait également intervenir pour sa stabilité les résidus LEU531, SER 530 , GLY 526 , TYR 385 , MET 522 , SER 353 , TYR 349 et VAL 523 (**figure 29**)



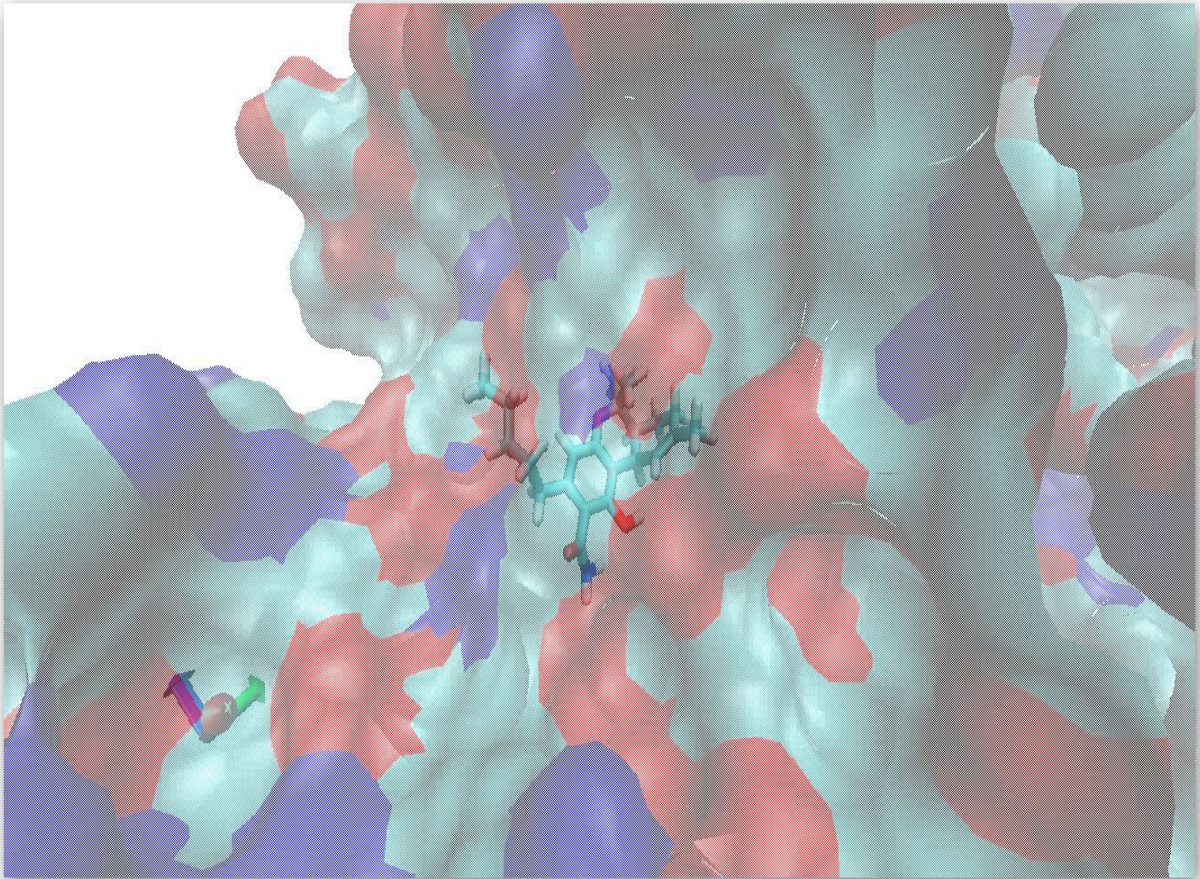
**Figure N° 28.** Représentation du positionnement du composé N59 dans le site actif de la COX-2



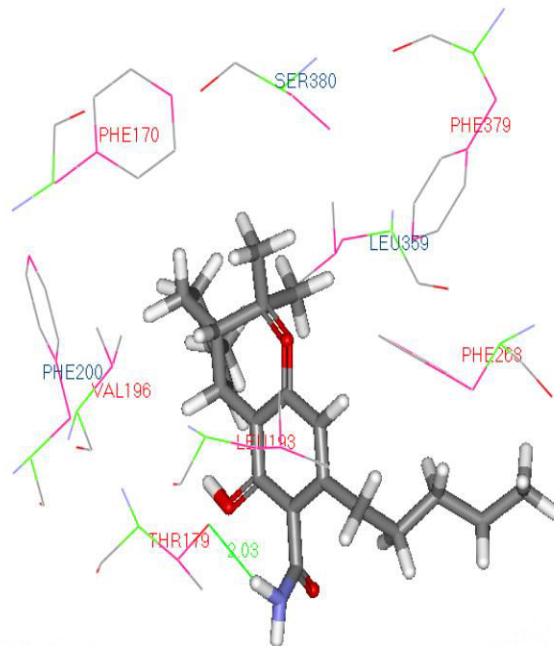
**Figure N° 29.** Analyse visuelle des liaisons hydrophobes entre le composé N59 et le site actif de la COX-2.

### 2.3.2.2. Interaction avec le récepteur Cb1

L'interaction du composé 59 avec le récepteur Cb1 se caractérise par une forte baisse du score allant de 2.56 à 0.15. Cette forte chute de l'affinité du composé 59 pour le récepteur Cb1 est dû essentiellement à la mise en place d'une seule liaison hydrogène. On observe également une diminution des interactions hydrophobes avec les résidus : PHE 170, SER380, PHE379, VAL196, THR 179, LEU 168 et LEU 359 (**figure 31**)



**Figure N° 30** .Représentation du positionnement du composé N59 dans le site de liaison de la Cb1



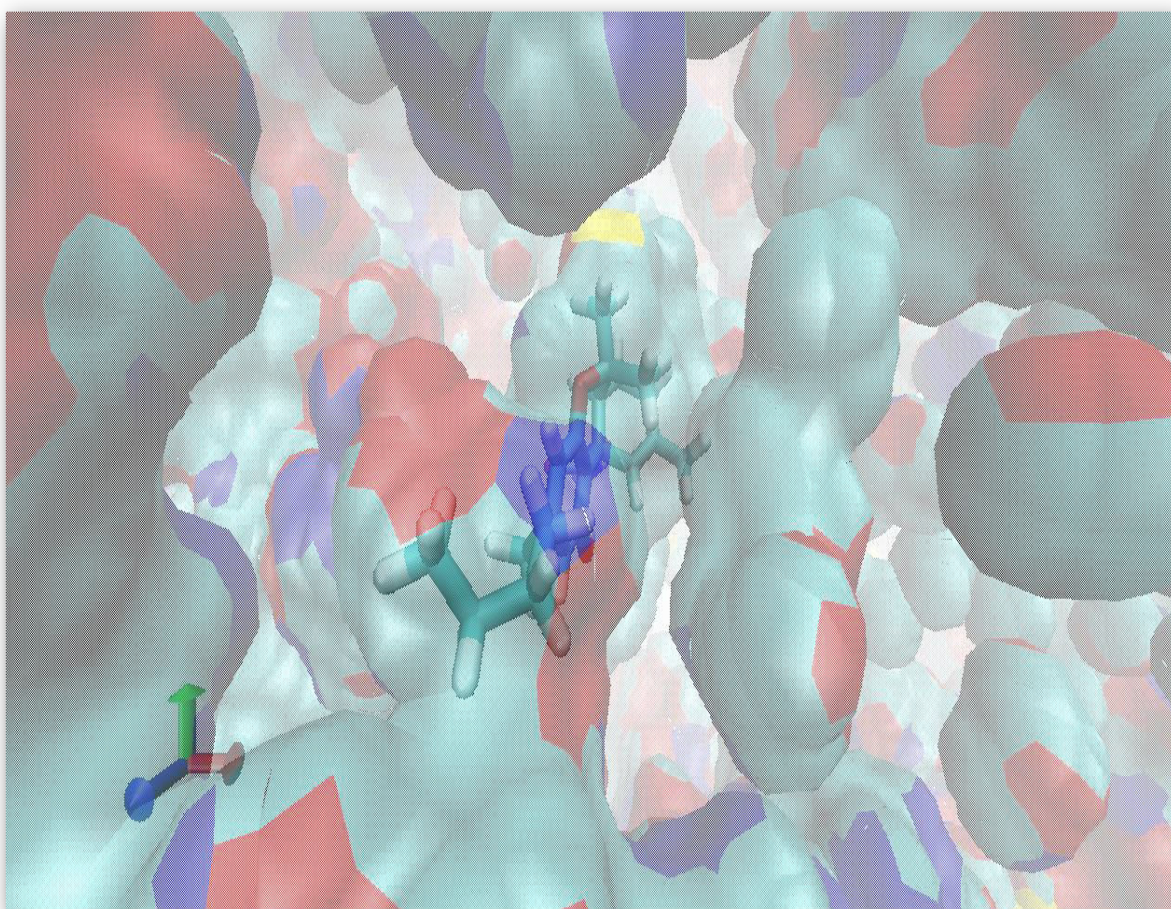
**Figure N° 31** : Analyse visuelle des liaisons hydrogènes et hydrophobes entre le composé N59 et le site de liaison de récepteur Cb1



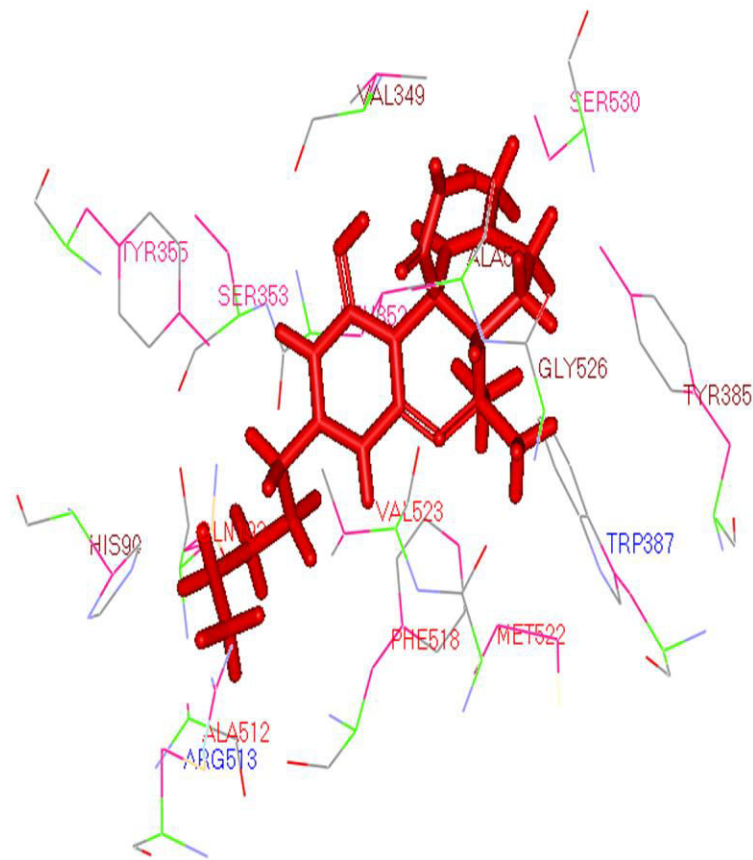
### 2.3.3. Etude des interactions du composé 67

#### 2.3.3.1 Interaction avec le COX-2

L'interaction du composé 67 avec le COX-2 donne un score de 3.22 , ce passage de l'affinité de 1.47 à 3.22 se manifeste par un bon positionnement du composé 67 dans la cavité catalytique de l'enzyme (**figure 32**) .paradoxalement cette élévation de l'affinité n'as pas abouti à la formation de liaisons hydrogène , en revanche un nombre plus élevé d'interactions hydrophobique a été mis en jeu avec les résidus SER530 , ALA527, GLY 526 , VAL 349 , TYR 385 ,SER353 , LEU 352, TRP387 , SER353 , PHE518 ,GLN192 , ALA512 , ARG513 , HIS 90 , MET522 ,VAL523 , TYR355 ,GLY526et ALA527 l'enzyme (**figure 33**)



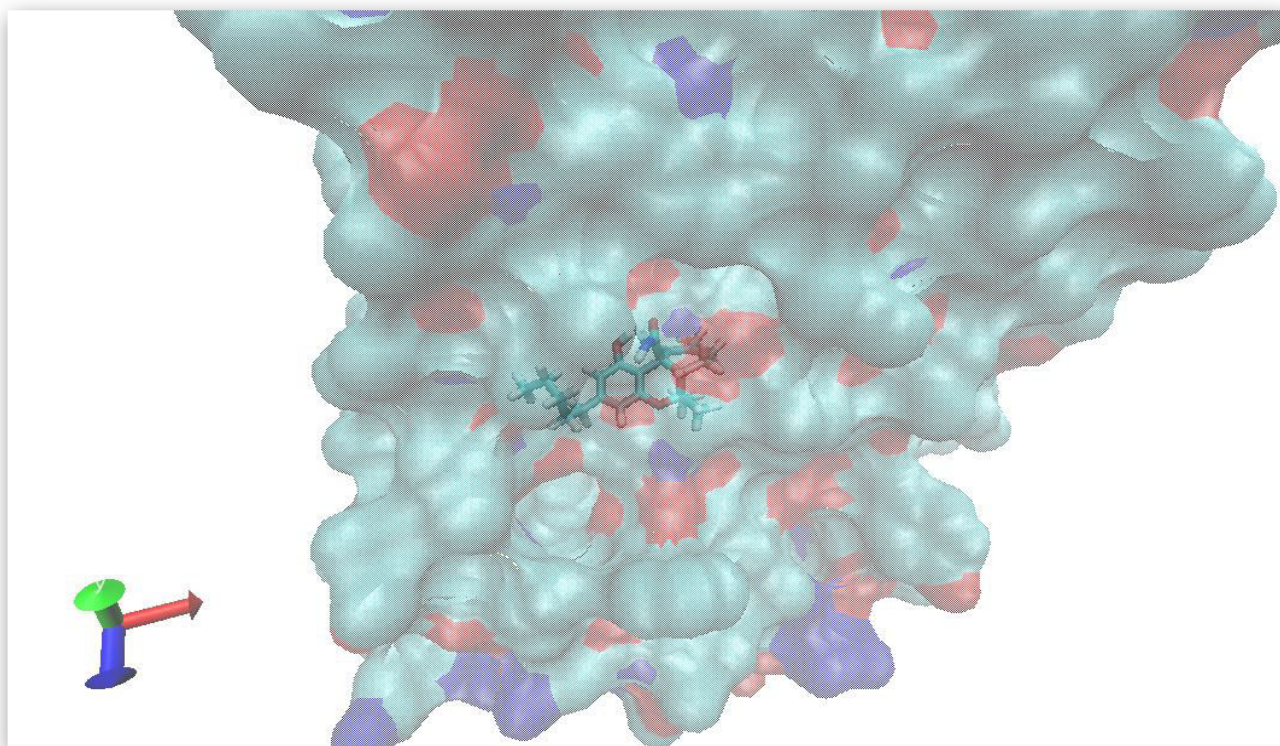
**Figure N° 32.** Représentation du positionnement du composé N°67 dans le site actif de la Cox-2.



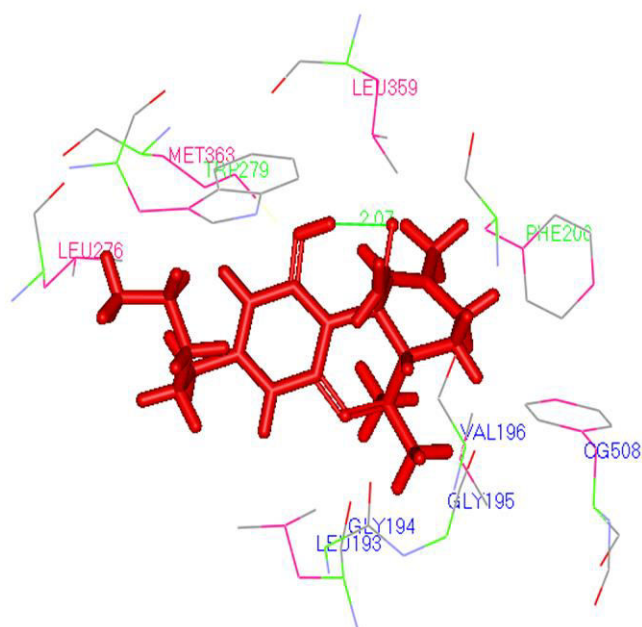
**Figure N° 33.** Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°67 et le site actif de la COX-2.

### 2.3.3.2 Interaction avec le récepteur Cb1

L'analyse visuelle montrée un mauvais positionnement de composé 67 dans le site de liaison par rapport au complexe Cb1-THC (**figure N° 34**). En effet, la modélisation de cette interaction de docking moléculaire avec surflex révèle une diminution de l'affinité dont la valeur passe de 2.56 à 1.19. cette différence de score se caractérise par l'absence de liaisons hydrogènes et la mise en place d'un nombre restreint d'interactions hydrophobiques avec les résidus LEU276 , MET363 , TRP279 , LEU359 , PHE260 , VAL 196 , PHE170 ,GLY195 , GLY194 et LEU193 (**figure N° 35**)



**Figure N° 34.** Représentation du positionnement du composé N°67 dans le site de liaison de la Cb1



**Figure N° 35.** Analyse visuelle des interactions hydrophobes entre le composé N°67 et le site de liaison du Cb1.

## 2.4. Règle de Lipinski

Il était important de compléter notre étude par l'application de la méthode de filtre ADME qui est basée sur la règle de 5 de Lipinski [123]. Afin de nous renseigner sur les propriétés pharmacocinétiques (ADME) des composés N°59, 67, 58, 53 et 31 issus de la substitution structurale du la THC

**Tableau N° 05 : Propriété pharmacocinétiques (ADME) des trois meilleurs composés issus de la mono substitution.**

Composé	Affinité Cox-2	Affinité Cb1	Paramètre de la règle de Lipinsky				
			Log P 5	PM ≤500	nON ≤10	n OHNH ≤5	Nrotb ≤15
<b>THC</b>	1.47	2.56	6.69	314.47	2	1	4
<b>58</b>	2.71	1.19	5.52	341.50	3	2	5
<b>59</b>	3.41	0.15	5.23	357.49	4	3	5
<b>67</b>	3.22	1.19	5.49	357.49	4	3	5

Il ressort de ce tableau que les trois dérivés du THC répondent favorablement à la règle de Lipinski et peuvent être utilisés comme médicaments sans poser des problèmes de biodisponibilité par la voie orale

# Conclusion

## Conclusion et perspectives

Ce travail de master avait pour objectif d'acquérir des connaissances en simulation informatique, notamment le docking moléculaire par Surfex afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux composés qui inhibent la cyclooxygénase-2 : cible thérapeutique Anti-inflammatoire et diminuent l'activation de récepteur cannabinoïde Cb1.

Au préalable, nous avons testé la fiabilité du programme Surfex par le test RMSD entre le mode d'interaction prédit et la structure cristalline de 100 composés tirés d'une façon arbitraire de la banque PDB.

Dans l'espoir de proposer de nouveaux composé plus affins et plus puissants, nous avons choisi le THC ; un inhibiteur de l'enzyme en même un activateur du récepteur étudiée, auquel nous avons apporté des modifications structurales en introduisant des groupements à différentes positions. Le docking moléculaire par Surfex des composés substitués envers les deux cibles fait ressortir de nouveaux inhibiteurs davantage plus puissants pour le COX-2 avec moins puissance pour Cb1.

En effet, l'introduction d'un groupement Amide en position C2 a amélioré nettement le score vers le COX-2 qui passe de 1.47 dans le cas du composé de départ (THC) jusqu'à 3.41 et diminuer le score vers le Cb1 qui passe de 2.56 dans le cas du composé de départ (THC) jusqu'à 0.15 pour ce qui est du composé N°59 (composé monosubstitué).

Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne positivement sur les propriétés ADME de ce composé monosubstitué qui se présente comme nouvel inhibiteur théoriquement plus puissant de la COX-2 et moins activant de la Cb1

Il conviendrait dans le prolongement de ce travail de tester l'activité biologique du composé proposé afin de pouvoir vérifier les résultats théoriques obtenus *in silico*.

# **Références**

## **Bibliographiques**

## Références bibliographiques

- [1] **Levinthal C., Wodak S.J., Kahn P., Dadvanian A.K. 1975.** Hemoglobin interaction in sickle cell fibers. I. Theoretical approaches to the molecular contacts. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **72** : 1330–34.
- [2] **Kuntz ID., Blaney J.M., Oatley S.J., Langridge R., Ferrin T.E. 1982.** A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J. Mol. Biol.* **161** : 269–88.
- [3] **Hill RJ (1983):** Marijuana, cannabis sativa L. *Regulatory Horticulture, Weed Circular.* 9: 57-66.
- [4] **UNODC, Dictionnaire multilingue sur les stupéfiants et les substances psychotropes sous contrôle international, 2007**(voir [www.unodc.org/unode/en/Scientists/multilingual-dictionary-of-narcotic-drugs-and-psychoactive-substances-under-international-control.html](http://www.unodc.org/unode/en/Scientists/multilingual-dictionary-of-narcotic-drugs-and-psychoactive-substances-under-international-control.html); récupéré en janvier 2009).
- [5] **Clarke RC, Watson DP (2007)** Cannabis and natural cannabis medicines. In: Elsohly MA (Ed.) *Marijuana and the cannabinoids*. Totowa, New Jersey: Humana Press
- [6] **Schultes RE, Klein WM, Plowman T, Lockwood TE (1975):** Cannabis: an example of taxonomic neglect. In: Rubin V (Ed.). *Cannabis and Culture*. The Hague: Mouton.
- [7] **Izzo AA, Borelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R (2009):** Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* 30: 515-527.
- [8] **Morimoto S, Tanaka Y, Sasaki K, Tanaka H, Fukamizu T, Shoyama Y, Shoyama Y, Taura F (2007):** Identification and characterization of cannabinoids that induce cell death through mitochondrial permeability transition in Cannabis leaf cells. *J Biol Chem.* 282: 20739-20751
- [09] **Fisar Z (2009):** Phytocannabinoids and Endocannabinoids. *Curr Drug Abuse Rev.* 2: 51-75. Fisher J (1975): Cannabis in Nepal: An overview. In: Rubin V (Ed.). *Cannabis and Culture*. The Hague:
- [10] **ElSohly MA, Slade D (2005):** Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 78: 539-548.).
- [11] **Fisar Z (2009):** Phytocannabinoids and Endocannabinoids. *Curr Drug Abuse Rev.* 2: 51-75.
- [12] **Fritschi G., Klein B. et Szilluweit W. (2006),** Verteilung der THC-Gehalte in Marihuana-pflanzen: Bestimmung der Gehalte in Wurzeln, Stängeln, Blättern und Blüten, *Toxichem+Krimtech*, 73(2), 54-56. (en allemand; voir [aussiwww.gtfch.org/tk/tk73\\_2/Fritschi1.pdf](http://aussiwww.gtfch.org/tk/tk73_2/Fritschi1.pdf); recupere en janvier 2009).



- [13] THC Statistics, Bureau federalhelvetique de sante publique (voir aussi [www.sgrm.ch/content.php?setsprache=d&action=sellang&alternative](http://www.sgrm.ch/content.php?setsprache=d&action=sellang&alternative) , « Chemie » Forensische Chemie « THC Gehaltstatistik 2006\_2; recupere en janvier 2009).
- [14] **RICHARD D. & SENON J.L. (1995).**Le cannabis: revue bibliographique générale. *Toxibase*, 1-85.
- [15] **GROTENHERMEN F. (2009).**Cannabis en médecine : un guide pratique des applications médicales du cannabis et du THC .Ed. Indica, Selestat,212 pp.
- [16] **MATSUDA L., LOLAIT S., BROWNSTEIN M., YOUNG A. et BONNER T. (1990).**Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of a cloned cDNA. *Nature* 346:561-546
- [17] **SEUTIN V., SCUVEE-MOREAU j., QUERTEMONT E. (2010).**Regard croisé sur le cannabis. Ed. Mardagon, Paris, 279 pp.
- [18] **Académie des sciences. (1979).** Aspects moléculaires, cellulaires et physiologiques des effets du cannabis. Ed. Tec Doc Lavoisier, 72 pp.
- [19] **MUNRO S., THOMAS K., ABU-SHAAR M. (1993).**molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365:61- 65.
- [20] **BOUTINEAU M. (2010).**Botanique systématique et appliquée des plantes à fleur.Ed. Tec et Doc, paris, 1335 pp.
- [21] **RICHARD D., SENON j.L. (2010).**Que sais-je ? Le Cannabis.Ed. Presses universitaires de France, Paris 128 pp.
- [22] **GREENE M.L., SAUNDERS D.R.(1974).**Metabolism of tetrahydrocannabinol by the small intestine. *Gastroenterology* **66**:364-72
- [23] **LAW B., MASON P.A., MOFFAT A.C., GLEAILE R.I. et KING L.I. (1984).**Forensic aspects of the metabolism and excretion of cannabinoids following oral ingestion of cannabis resin. *J. Pharm. Pharmacol.***36**:289-94.
- [24] **Robson P (2001):** Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *The British Journal of Psychiatry*.178: 107-115.
- [25] **Meiri E, Jhangiani H, Vredenburg JJ, Barbato LM, Carter FJ, Yang HM, Baranowski V (2007):** Efficacy of dronabinol alone and in combination with ondansetron versus ondansetron alone for delayed chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Curr Med Res Opin*23: 533-543.
- [26] **Wang T, Collet JP. et al (2008):** Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *Canadian Medical Association Journal*.178: 1669-1678.

- [27] **Darmani DA (2010):** Mechanisms of Broad-Spectrum Antiemetic Efficacy of Cannabinoids against Chemotherapy-Induced Acute and Delayed Vomiting. *Pharmaceuticals* 3:2930-2955
- [28] **(Kirkham et al., 2002).** Cannabinoïdes en Médecine Connaissances et attitudes des professionnels de la santé et des associations de patients aux Pays-Bas. 31p p.
- [29] **Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M (2010).**Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 935–939.
- [30] **Hazekamp A, Grotenhermen F (2010):** Review on clinical studies with cannabis and cannabinoids 2005-2009. *Cannabinoids*.5: 1-21.
- [31] **Morgan NH, Stanford IM, Woodhall GL. (2009).**Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology* 57: 356–368.
- [32] **Kreitler S, Diego B, Lamberto (2007).***Taxonomy and classification of pain. The Handbook of Chronic Pain.*Nova Biomedical Books.
- [33] **Zajicek JP, Apostu VI (2011):** Role of cannabinoids in multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 25:187-201.
- [34] **Mensinga TT, de Vries I, Kruidenier M. et al. (2006):**Dubbel-blind, gerandomiseerd, placebogecontroleerd, 4-weg gekruistonderzoeknaar de farmacokinetiek en effecten van cannabis. *RIVM rapport 267002001*.
- [35] **Bar-Joseph A, Berkovitch Y, Adamchik J, Biegon A (1994):** Neuroprotective activity of HU-211, a novel NMDA antagonist, in global ischemia in gerbils. *olChemNeuropathol*.23 125–135.
- [36] **Arévalo-Martín A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C (2003):** Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci*.23 : 2511–2516.
- [37] **Morgan CJA, Curran HV (2008):** .Effects of cannabidiol on schizophrenia-like symptoms in people who use cannabis. *The British Journal of Psychiatry*.192: 306-307.
- [38] **Ho BC, Wassink TH, Ziebell S, Andreasen NC (2011):** Cannabinoid receptor 1 gene polymorphisms and marijuana misuse interactions on white matter and cognitive deficits in schizophrenia. *Schizophrenia Research*.Article in press.
- [39] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21532172>.
- [40] <http://www.betterbones.com/bonefracture/speeddhealing.pdf>.
- [41] <http://www.livescience.com/51701-marijuana-bones-healing-fractures.html>.
- [42] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22571976>.

[43] **Morioka et al., 2010.** Cannabinoïdes en Médecine Connaissances et attitudes des professionnels de la santé et des associations de patients aux Pays-Bas. 40p p.

[44] **Veen et al, 2004; Green et al, 2005; Gonzalez-Pinto et al, 2008.**

\*Veen ND, Selten JP, van der Tweel I, Feller WG, Hoek HW, Kahn RS (2004): Cannabis use and age at onset of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161 : 501–506.

\*Green B, Young R, Kavanagh D (2005): Cannabis use and misuse prevalence among people with psychosis. *Br J Psychiatry* 187: 306–313.

\* Gonzalez-Pinto A, Vega P, Ibanez B, Mosquera F, Barbeito S, Gutierrez M (2008): Impact of cannabis and other drugs on age at onset of psychosis. *J Clin Psychiatry* 69 :1210–1216

[45] **D'Souza DC, Sewell RA, Ranganathan M (2009):** Cannabis and psychosis/schizophrenia: human studies. *Eur Arch Psychiatry ClinNeurosci.*259:413–431.

[46] **Fernandez-Espejo E, Viveros MP, Nunez L, Ellenbroek BA , Rodriguez de Fonseca F (2009):** Role of cannabis and endocannabinoids in the genesis of schizophrenia. *Psychopharmacology.*206 : 531–549.

[47] **Heng L, Beverley JA, Steiner H, Tseng KY (2011)** Differential developmental trajectories for CB1 cannabinoid receptor expression in limbic/associative and sensorimotor cortical areas. *Synapse* 65: 278-286.

[48] **Ranganathan M and D'Souza DC (2006):** The acute effects of cannabinoids on memory in humans: a review. *Psychopharmacology.*188: 425-44.

[49] **Solowij N and Battisti R (2008):** The Chronic Effects of Cannabis on Memory in Humans: A Review. *Current Drug Abuse Reviews* 1: 81-98.

[50] **Sanches RF and Marques JM (2010):** Cannabis and mood. *Rev Bras Psiquiatr.* 32: 173-180.

[51] **Schofield D, Tennant C, Nash L, Degenhardt L, Cornish A, Hobbs C, Brennan G. (2006):** Reasons for cannabis use in psychosis. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 40: 570–574.

[52] **Brust JCM (2010): Substance abuse and movement disorders. *Movement Disorders* 25 :2010 -2020.**

[53] **Muller-Vahl KR, Kolbe H, Schneider U, Emrich HM (1999):** Cannabis in movement disorders. *ForschKomplementarmed*6:23–27. *BiochemBiophysRes Commun*, 190,406-411.

[54] **Kujubu, D. A., Fletcher, B. S., Varnum, B. C., Lim, R. W., et Herschman, H. R. (1991).** TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J BiolChem*, 266, 12866-12872.

- [55] **Tay, A., Squire, J. A., Goldberg, H., et Skorecki, K. (1994).** Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (pTGS2) gene to lq25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 23, 718-719.
- [56] **Appleby, S. B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K., et Hia, T. (1994).** Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *BiochemJ*, 302 ( Pt 3), 723-727.
- [57] **Jones, D. A., Carlton, D. P., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., et Prescott, S. M. (1993).** Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem*, 268, 9049-9054.
- [58] **Xu, X. M., Tang, J. L., Chen, X., Wang, L. H., et Wu, K K (1997).** Involvement of two SpI elements in basal endothelial prostaglandin H synthase-1 promoter activity. *J Biol Chem*, 272, 6943-6950.
- [89] **Tanabe, T., et Tohnai, N. (2002).** Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 95-114.
- [90] **Migita, K., Tanaka, H., Okamoto, K., Yoshikawa, N., Ichinose, Y., Urayama, S., Yamasaki, S., Ida, H., Kawabe, Y., Kawakami, A., et Eguchi, K (2000).** FK506 augments glucocorticoid-mediated cyclooxygenase-2 down-regulation in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Lab Invest*, 80, 135-141.
- [91] **Gonzalez, M. V., Jimenez, B., Berciano, M. T., Gonzalez-Sancho, J. M., Caelles, c., Lafarga, M., et Munoz, A. (2000).** Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the Activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J Cell Biol*, 150, 1199-1208.
- [92] **Otto, J. c., et Smith, W. L. (1994).** The orientation of prostaglandin endoperoxide synthase 1 and 2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 269, 19868-19875.
- [90] **Smith, W. L., DeWitt, D. L., Kraemer, S. A., Andrews, M. J., Hia, T., Maciag, T., et Shimokawa, T. (1990).** Structure-function relationships in sheep, mouse, and human prostaglandin endoperoxide G/H synthases. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res*, 20, 14-21.
- [93] **Picot, D., Loll, P. J., et Garavito, R M. (1994).** The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*, 367, 243-249.
- [94] **Xie, W. L., Robertson, D. L., et Simmons, D. L. (1992).** Mitogen-inducible prostaglandin G/H synthase: a novel target for nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drug Dev Res*, 249-265.
- [95] **Herschman, H. R. (1996).** Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta*, 1299, 125-140.
- [96] **Kurumbail R, Stevens AM, Gierse]Ket al** Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 1996; 384: 644-648.
- [97] **Blake, C. (1994).** Prostaglandin synthase. At the heart of the matter. *Curr Biol*, 4, 452-454.

[98]DeWitt, D. L., el-Harith, E. A., Kraemer, S. A., Andrews, M. J., Yao, E. F., Armstrong, RL., et Smith, W. L. (1990). The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J BiolChem*, 265,5192-5198.

[99]Shirr, S. J., Qiao, L., Tsai, L. L., et Rigas, B. (1995).Sulindacsulfide, an aspirin-like compound, inhibitsproliferation, causes ceII cycle quiescence, and inducesapoptosis in HT-29 colonadenocarcinomaceIIls. *J Clin Invest*, 96, 491-503.

[100] [Picot, 1994 et Smith, 2000]. *Thèse de doctorat Mécanismes d'action des AINS en relation avec la prolifération cellulaire et l'apoptose*:10-12.

[101]Luong, c., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, c., et Browner, M. F. (1996). Flexibility of the NSAIDbinding site in the structure ofhuman cyclooxygenase-2.*Nat StructBiol*, 3, 927-933.

[101]Smith, W. L., etMarnett, L. J. (1991). Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *BiochimBiophysActa*, 1083, 1-17.

[101]Kulmacz, R. J., Pendleton, R. B., et Lands, W. E. (1994).Interaction between peroxidase and cyclooxygenase activities in prostaglandin-endoperoxide synthase. Interpretation ofreaction kinetics. *J BiolChem*, 269, 5527-5536.

[102] Kulmacz, R. J. (1998).Cellular regulation of prostaglandin H synthase catalysis.*FEBS Lett*, 430,154-157.

[103]Kulmacz, R. J. (1986). Prostaglandin H synthase and hydroperoxides: peroxidase reaction and inactivation kinetics. *Arch BiochemBiophys*, 249, 273-285.

[104]Percival, M. D., Ouellet, M., Vincent, C. J., Yergey, J. A., Kennedy, B. P., et O'Neill, G. P. (1994).Purification andcharacterization of recombinant human cyclooxygenase-2.*Arch BiochemBiophys*, 315, 111-118.

[105]Meade, E. A., Smith, W. L., et DeWitt, D. L. (1993).Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidalanti-inflammatory drugs. *J BiolChem*, 268,6610-6614.

[106]Terlain, B., Jouzeau, J. Y., Abid, A., Nedelec, E., et Netter, P. (1996).Izoenzymes de la cyclooxygenase et antiinflammatoiresnon stéroïdiens. *Lettre du Pharmacologue*, 10, 136-143.

[107] Kuntz ID. 1992. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science*.**257** : 1078-1082.

[108]Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. 1996. A Fast Flexible Docking Method Using an Incremental Construction Algorithm.*J. Mol. Biol.* **261** : 470-489.

[109]Rarey M., Kramer B., Lengauer T. 1997. Multiple automatic base selection: proteinligand *docking*based on incremental construction without manual intervention. *J. Comput.-Aided Mol. Des.***11** : 369-384.

- [110]Rarey M., Wefing S., Lengauer T. 1996. Placement of medium-sized molecular fragments into active sites of proteins. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **10** : 41–54.
- [111]Holland JH. 1975. Adaptation in Natural and Artificial Systems. *University of Michigan Press: Ann Arbor, MI*.
- [112]Metropolis N., Rosenbluth AW., Rosenbluth MN., Teller AH., Teller E. 1953. Equation of state calculations by fast computing machines. *J. Chem. Phys.* **21** : 1087-1092.
- [113]Baxter C.A., Murray C.W., Clark D.E., Westhead D.R., Eldridge M.D. 1998. Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins*.**33** : 367-382.
- [114]Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D. 1994. ICM: a new method for structure modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J. Comput. Chem.* **15** : 488-506.
- [115]Eldridge M.D., Murray C.W., Auton T.R., Paolini G.V., Mee R.P. 1997. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided Mol. Des.***11** : 425-445.
- [116]Thompson M. 2003 Molecular docking with Arguslab ;Planaria software Seattle WA
- [117]Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.*, **28** : 235-242.
- [118]Vieth M., Hirst JD., Kolinski A., Brooks CL. 1998. Assessing energy functions for flexible docking. *J. Comput. Chem.* **19** : 1612-1622.
- [119]Gabb J., Jackson R.M., Sternberg M.J.E. 1997. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* **272** : 106–120.
- [120]Verkhivker G.M., Bouzida D., Gehlhaar D.K., Rejto P.A., Arthurs S., *et al.* 2000. Deciphering common failures in molecular docking of ligand-protein complexes. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **14** : 731–751.
- [121]Jones G., Willett P., Glen RC. 1995. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol.* **245** : 43–53.
- [122] Tomida I, Azuara-Blanco A, House H, Filnt M, Pertzee RG, Robson PJ (2006): Effect of sublingual application of cannabinoids on intraocular pressure: a pilot study. *J. Glaucoma.* **15**: 349-353
- [123] Lipinski C. A., Lombardo F., Domini B. W., Feney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Elsevier, Advanced Drug Delivery Reviews.* 1997; **23**: 25p.,

## تلخيص

هذا العمل عبارة عن دراسة في بيئة ظاهرية أو في الفضاء الحاسوبي (محاكاة الكمبيوتر) عن طريق برنامج surflex لتفاعلات الانزيم COX-2 و مستقبل Cb1 المستخرج من بنك بيانات البروتين PDB مع عدة روابط .

أولاً قمنا باختبار دقة برنامج surflex عن طريق الاختبار المسمى RMSD و الذي أعطى نتيجة % 88 أقل من  $A^{\circ 2}$  ، لنحاول بعدها تحسين انجذاب THC إلى انزيم COX-2 مع إبعاده عن المستقبل Cb1 ، قمنا بإجراء 152 تبديل ما بين أحادي و ثنائي على مستوى التركيبية الكيميائية ل THC ، من بينها 11 مركب فقط من أعطت نتائج ايجابية أفضلها المركبات 58،59،67 و المتحصل عليها من التبديل الأحادي .

من بين هذه النتائج المركب رقم 59 يعد الأحسن بمعامل انجذاب يقدر بـ 3.42 مع انزيم COX-2 و 0.15 مع المستقبل Cb1 ، تطبيق قاعدة Lipinski أعطت نتائج ايجابية بالنسبة للمركبات الثلاثة

<b>Année Universitaire 2017/2018</b>	<b>Présenté par : BOULOUDANI HOUSSEM EDDINE et MESSAST SAMIR</b>		
<b>Etude in silico de l'interaction du Tétrahydrocannabinol avec le récepteur cannabinoïde et la cyclo-oxygénase-2</b>			
Mémoire de fin du cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée			
<p style="text-align: center;"><b><u>Résumé</u></b></p> <p>Le présent travail étudie <i>in silico</i> avec surflex consiste en une des interactions de l'enzyme COX-2 et le récepteur Cb1 issus de la PDB avec plusieurs ligands. dans un premier temps la fiabilité du programme surflex a été évaluée par le test RMSD qui donne 88 % des résultats inférieurs à 2 Å, dans un deuxième temps nous avons tenté d'améliorer l'affinité du THC pour la COX-2 et la diminuer pour le récepteur Cb1 en réalisant des mono et bi substitution sur celle-ci parmi les 152 composés obtenus, seuls 11 composés ont donné des résultats satisfaisants et en particulier les composés 58,59,67 issus de la mono substitution. Parmi ces 3 composés, le dérivé N°59 se caractérise par une affinité pour la COX-2 (score : 3.42) et une très faible valeur de celle-ci pour le récepteur cannabinoïde Cb1 (score : 0.15). l'application de la règle Lipinski a donné des résultats positifs pour les trois composés.</p>			
<b>Mots clés :</b> Surflex, COX-2, Cb1, PDB, RMSD, THC, Lipinski			
<b>Laboratoire de recherche :</b> laboratoire de biochimie appliquée université FM			
<p style="text-align: center;"><b>Jury d'évaluation</b></p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="177 1361 592 1473"> <b>Président du jury : Chikhi .A</b>  <b>Rapporteur : Bensegni .A</b>  <b>Examineur : Mokrani .M</b> </td> <td data-bbox="979 1361 1402 1473"> <b>Pr.UFM Constantine</b>  <b>Pr.UFM Constantine</b>  <b>MAA. UFM Constantine</b> </td> </tr> </table>		<b>Président du jury : Chikhi .A</b> <b>Rapporteur : Bensegni .A</b> <b>Examineur : Mokrani .M</b>	<b>Pr.UFM Constantine</b> <b>Pr.UFM Constantine</b> <b>MAA. UFM Constantine</b>
<b>Président du jury : Chikhi .A</b> <b>Rapporteur : Bensegni .A</b> <b>Examineur : Mokrani .M</b>	<b>Pr.UFM Constantine</b> <b>Pr.UFM Constantine</b> <b>MAA. UFM Constantine</b>		
<p style="text-align: center;"><b>Date de soutenance : 04/07/2018</b></p>			