

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé :

Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Kynurénine
3-monooxygenase par docking moléculaire

Présenté et soutenu publiquement par :

Le : 15/09/2020

KHODJA Linda

Jury d'évaluation :

Président du jury : **BENSEGUENI A.** (Professeur - UFM Constantine 1).

Encadreur : **MOKRANI E.H.** (Maître assistant « A » - UFM Constantine 1).

Examinatrice : **TENIOU S.** (Maître assistant « A » - UFM Constantine 1).

Année universitaire : 2019/ 2020



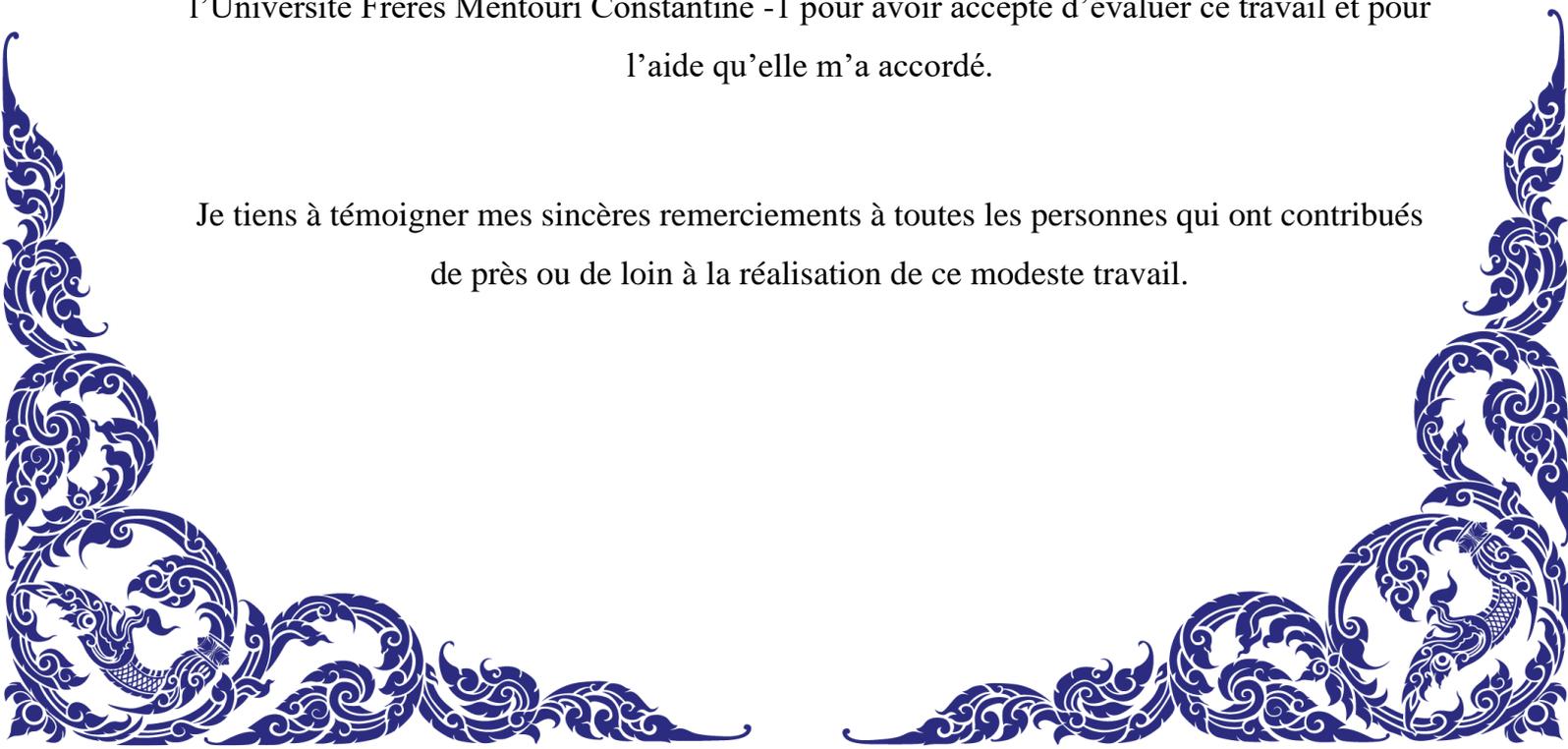
Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon encadreur Monsieur **MOKRANI E.H.**, Maître assistant « A » à l'Université Frères Mentouri Constantine -1. Je le remercie pour le temps qu'il m'as accordé, ses judicieux conseils, ses orientations, sa patience et son suivi consciencieux de ce travail. J'ai eu beaucoup de chance de l'avoir comme encadreur de mon mémoire.

J'exprime mon grand respect et ma profonde gratitude à Monsieur **BENSEGUENI A.**, Professeur à l'Université Frères Mentouri Constantine -1 qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Je le remercie pour ses conseils et ses encouragements.

J'exprime mes vifs remerciements à Madame **TENIOU S.**, Maître assistant « A » à l'Université Frères Mentouri Constantine -1 pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour l'aide qu'elle m'a accordé.

Je tiens à témoigner mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.





Dédicace

À **mes chers parents** qui ont œuvré pour ma réussite, de par leur amour, leur soutien, leur patience, tous les sacrifices consentis et leurs précieux conseils, pour toute leur aide et leur présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A ma chère sœur, mon cher frère et mes adorables amis, pour leurs encouragements, leur amour, leur aide, et leurs conseils, qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

A tous les professeurs qui m'ont inspiré et encouragé tout au long de mon parcours d'études.

Je vous aime, merci.

- *Linda*



Table des matières

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre 1 : La Kynurénine 3-monooxygénase

1. Le métabolisme du tryptophane via la voie des kynurénines	3
2. Nomenclature et Classification de la Kynurénine 3-monooxygénase	5
3. Description structurale de la Kynurénine 3-monooxygénase	6
4. Fonction et Mécanisme d'action de la Kynurénine 3-monooxygénase	9
5. Effets thérapeutiques de l'inhibition de la Kynurénine 3-monooxygénase	10
6. Les inhibiteurs de la Kynurénine 3-monooxygénase	13
6.1 Conception des inhibiteurs avant la structure cristalline du KMO.....	13
6.1.1 Les acides 4-phenyl-4-oxobutanoïques.....	13
6.1.2 Les sulfonamides	14
6.1.3 Les acides 4-aryl-4-oxobutanoïques.....	14
6.2 Conception des inhibiteurs après la structure cristalline du KMO.....	14
6.2.1 Les acides arylpyrimidine carboxyliques	15
6.2.2 Les oxazolidinones	15
6.2.3 Les benzisoxazoles	15

Chapitre 2 : Le docking moléculaire

1. Le criblage virtuel	17
2. Le docking moléculaire.....	18
3. Les types du docking moléculaire.....	19
4. Les outils du docking moléculaire	20
4.1 Le récepteur	20
4.2 Les ligands.....	21
4.3 Les logiciels du docking.....	21

5. Les interactions protéine-ligand	22
---	----

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

1. Matériel	24
1.1 Ordinateur	24
1.2 Logiciels et Serveurs	24
1.2.1 AutoDock	24
1.2.2 Visual Molecular Dynamics (VMD)	24
1.2.3 Maestro	24
1.2.4 Discovery Studio	25
1.2.5 ChemDraw	25
1.2.6 OpenBabel	25
1.2.7 Microsoft Excel	25
1.2.8 SwissADME	25
1.2.9 PreADMET	26
1.3 Banques de données	26
1.3.1 Protein Data Bank (PDB)	26
1.3.2 PubChem	26
2. Méthodes	26
2.1 La sélection de la protéine	26
2.2 La construction 3D des Ligands	28
2.3 Protocole d'utilisation d'AutoDock	28
2.3.1 Préparation de l'enzyme	28
2.3.2 Préparation des inhibiteurs	29
2.3.3 Calcul des grilles de potentielle	29
2.3.4 Docking moléculaire	30
2.3.5 Analyse des résultats	31

2.4 Tests de fiabilité du programme AutoDock	31
2.4.1 Le test RMSD	31
2.4.2 L'analyse visuelle.....	32
2.4.3 Le coefficient de corrélation (r)	32
2.5 Proposition de nouveaux inhibiteurs	32
2.5.1 Criblage virtuel d'une collection de similaires.....	32
2.5.2 Modification par substitution	33
2.6 Les propriétés ADMET	33
2.6.1 Propriétés physicochimiques	34
2.6.2 Propriétés pharmacocinétiques	35
2.6.3 Tests de toxicité.....	36

Chapitre 4 : Résultats et discussion

1. Tests de fiabilité du programme AutoDock	38
1.1 Le test RMSD	38
1.2 L'analyse visuelle.....	39
1.3 Le coefficient de corrélation (r).....	40
Conclusion.....	44
2. Etude des interactions de <i>Pf</i> KMO-inhibiteur.....	45
3. Proposition de nouveaux inhibiteurs	47
3.1 Criblage virtuel d'une collection de similaires.....	47
3.2 Modification par substitution	50
3.2.1 Les mono-substitutions	50
3.2.2 Les poly-substitutions	53
Résidus clés dans le site actif de la <i>Pf</i> KMO.....	56
4. Les propriétés ADMET	56
4.1 Propriétés physicochimiques	57

4.2 Propriétés pharmacocinétiques	58
4.3 Tests de toxicité	58
Conclusion et perspectives	60
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Logiciels de docking et leurs algorithmes.	22
Tableau N°2 : Code PDB des complexes <i>Pf</i> KMO-Inhibiteur avec leurs caractéristiques.....	27
Tableau N°3 : Les valeurs de RMSD des onze complexes <i>Pf</i> KMO-Inhibiteur étudiés.	39
Tableau N°4 : Les énergies d'interaction des 107 inhibiteurs de la KMO, leurs IC ₅₀ et Log IC ₅₀	41
Tableau N°5 : Les propriétés pharmacocinétiques de composé C45	46
Tableau N°6 : Numéro d'accession et score des dix (10) meilleurs inhibiteurs obtenus suite au docking moléculaire de la collection de similaires du composé C45	47
Tableau N°7 : Les propriétés pharmacocinétiques de composé S185.	49
Tableau N°8 : Les énergies d'interaction (scores) des 48 composés monosubstitués et leurs BBB perméabilité.....	50
Tableau N°9 : Les énergies d'interaction (scores) des 14 composés polysubstitués et leurs BBB perméabilité.....	54
Tableau N°10 : Propriétés physicochimiques des composés S185, M22, P3 et la Donépézil à partir de serveur SwissADME.....	57
Tableau N°11 : Propriétés pharmacocinétiques des composés S185, M22, P3 et la Donépézil à partir de serveur SwissADME.	58
Tableau N°12 : Résultats des tests <i>in silico</i> de toxicité des composés S185, M22, P3 et la Donépézil à partir de serveur PreADMET.	59

Liste des figures

Figure 1 : La structure du tryptophane.	3
Figure 2 : La voie des kynurénines et ses voies en aval de la sérotonine, glycolyse et NAD+.	4
Figure 3 : Structure cristalline du la Kynurénine 3-monooxygénase humaine (code PDB : 5X68). ...	6
Figure 4 : Comparaison structurelle de <i>hKMO</i> et <i>ScKMO</i>	7
Figure 5 : Structure de <i>PfKMO</i> lié avec KYN (code PDB : 5NAK).	7
Figure 6 : Structure cristalline du site actif de <i>PfKMO</i> lié à KYN.	8
Figure 7 : Surfaces de structures cristallines de <i>PfKMO</i>	9
Figure 8 : Métabolisation de KYN en 3-HK.	9
Figure 9 : Le mécanisme catalytique proposé du KMO de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	10
Figure 10 : La structure et les fonctions de l'Acide Kynurénique (KA).	11
Figure 11 : KA et QA dans le système nerveux et leurs effets sur NMDAr et $\alpha 7nAChR$	11
Figure 12 : Effet d'inhibition du KMO dans la voie des kynurénines.	12
Figure 13 : La structure de la nicotynylalanine.	13
Figure 14 : La structure de m-NBA et FCE 28833A.	13
Figure 15 : La structure de Ro 61-8048.	14
Figure 16 : La structure de UPF-648.	14
Figure 17 : La structure de CHDI-340246.	15
Figure 18 : La structure de GSK180.	15
Figure 19 : La structure de GSK366.	16
Figure 20 : Le processus de développement d'un médicament « <i>Drug Design</i> ».	17
Figure 21 : Les étapes typiques d'un docking moléculaire.	19
Figure 22 : Les deux étapes de docking moléculaire « <i>Docking</i> » et « <i>Scoring</i> ».	19
Figure 23 : Représentation du modèle clé-serrure pour le docking rigide.	20
Figure 24 : Logiciels utilisés dans toutes les publications de docking de 1990 à 2013.	21
Figure 25 : Illustration des différentes interactions protéine-ligand.	23

Figure 26 : Représentation par Maestro de la structure 3D de la <i>PfKMO</i> (Code PDB : 5NAB).....	27
Figure 27 : Représentation par VMD de la chaîne A du complexe 5NAB et sa cavité catalytique en présence de l'inhibiteur 8RK et le FAD.....	28
Figure 28 : Position de la boîte de docking dans le site actif de la <i>PfKMO</i> (code PDB : 5NAB) avec ses coordonnées et ses dimensions.....	30
Figure 29 : Les fonctions ajoutés au cours de la mono-substitution.	33
Figure 30 : Résultats en pourcentage du test RMSD par AutoDock à deux intervalles.	38
Figure 31 : Histogramme en pourcentage du test RMSD par AutoDock à divers intervalles.	38
Figure 32 : Comparaison entre les poses du ligand simulés par AutoDock et les poses obtenues par cristallographie aux rayons X.....	40
Figure 33 : Corrélation linéaire entre les Log IC ₅₀ et les énergies d'interaction (ΔG) des 107 inhibiteurs étudiés.	44
Figure 34 : Représentation par Maestro du positionnement du composé C45 dans le site actif de la <i>PfKMO</i>	45
Figure 35 : Diagrammes des interactions entre le ligand C45 et la <i>PfKMO</i>	45
Figure 36 : La structure du composé C45.	47
Figure 37 : Représentation par Maestro du positionnement du composé S185 dans le site actif de la <i>PfKMO</i>	48
Figure 38 : Diagrammes des interactions entre le ligand S185 et la <i>PfKMO</i>	48
Figure 39 : Représentation des positions des radicaux R1 et R2 dans la structure de base du composé S185.....	50
Figure 40 : Représentation par Maestro du positionnement du composé M22 dans le site actif de la <i>PfKMO</i>	52
Figure 41 : Diagrammes des interactions entre le ligand M22 et la <i>PfKMO</i>	52
Figure 42 : Représentation des positions des radicaux R3, R4 et R5 dans la structure du composé M22.	54
Figure 43 : Représentation par Maestro du positionnement du composé P3 dans le site actif de la <i>PfKMO</i>	55
Figure 44 : Diagrammes des interactions entre le ligand P3 et la <i>PfKMO</i>	55

Liste des abréviations

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
3-HK	3-Hydroxykynurenine
3OHAA	3-Hydroxyanthranilic Acid (Acide 3-hydroxyanthranilique)
Å	Ångström
A3M	Anthranilate 3-monooxygenase
ACMS	2-amino-3-carboxymuconate 6-semialdehyde
ACMSD	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase
ADMET	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination, Toxicité
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFMID	Kynurenine formamidase
AGL	Algorithme Génétique Lamarckian
AhR	Arylhydrocarbon Receptor
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BBB	Blood–Brain Barrier
CYP	Cytochromes P450
dlg	Docking LoG file
dpf	Docking Parameters File
EC	Enzyme Commission number
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FAH	Flavoprotéine Hydroxylase Aromatique
g	gramme
GI	Gastro Intestinale

glg	Grid LoG file
GO	Gigaoctet
gpf	Grid Parameters File
GPR35	G Protein-Coupled Receptor 35
HAAO	3-Hydroxyanthranilate 3,4 dioxygenase
hKMO	<i>Human</i> Kynurenine 3-monooxygenase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTS	High Throughput Screening
IC₅₀	Inhibitory Concentration 50
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFNγ	Interferon gamma
KA	Kynurenic Acid (Acide Kynurénique)
KAT	Kynurenine aminotransferase
kcal	kilocalorie
kDa	kiloDalton
kg	kilogramme
Ki	Constante d'inhibition
KMO	Kynurenine 3-monooxygenase
KP	Kynurenine Pathway (Voie des Kynurénines)
KYN	Kynurenine
KYNU	Kynureninase
L	Litre
logP	Coefficient de partition octanol/ eau
LQTS	Long QT Syndrome
m²	mètre carré
mg	milligramme
mol	mole

NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADP	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFK	N-formylkynurénine
nM	nanomole
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NMDAr	N-Methyl-D-Aspartate receptor
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Picolinic Acid (Acide Picolinique)
PDB	Protein Data Bank
pdbqt	Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)
<i>PfKMO</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Kynurénine 3-monooxygenase
PLP	Pyridoxal 5-phosphate
PM	Poids Moléculaire
QA	Quinolinic Acid (Acide Quinolinique)
QPRT	Quinolate phosphoryltransférase
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
r	Coefficient de corrélation
R1	Radical 1
R2	Radical 2
R3	Radical 3
R4	Radical 4
R5	Radical 5
RAM	Random Access Memory
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RMSD	Root Mean Square Deviation

ScKMO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Kynurenine 3-monooxygenase
SIB	Swiss Institute of Bioinformatics
SLA	Sclérose Latérale Amyotrophique
SNC	Système Nerveux Central
TDO	Tryptophane 2,3-dioxygenase
TPSA	Topological Polar Surface Area
TRP	Tryptophane
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VMD	Visual Molecular Dynamics
α7nAChR	α -7-nicotinic Acetylcholine Receptor
ΔG	Energie d'interaction
μM	micromole
μmol	micromole



INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

Le processus de conception d'un nouveau médicament est très long, coûteux et fastidieux, allant de l'identification d'une cible thérapeutique en passant par la recherche des composés actifs jusqu'aux essais cliniques. En moyenne, de 12 à 15 ans d'efforts et 1 milliard de dollar sont nécessaires pour la mise d'un nouveau médicament sur le marché [1][2].

Pour surmonter ces défis, le docking moléculaire est un outil exemplaire. Il s'agit d'une approche, faisant partie de la modélisation moléculaire, permettant la simulation des interactions protéine-ligand le plus souvent. Le docking moléculaire est devenu de plus en plus utile lors des premières phases de drug design en raison de l'immense croissance des structures 3D de rayons X et de RMN et de leurs résolutions améliorées rapportées dans la banque de données des protéines (PDB) [2][3].

Dans ce travail, nous avons utilisé le programme de docking moléculaire AutoDock [4] pour étudier les mécanismes d'inhibition de la Kynurénine 3-monooxygénase (KMO). Cette enzyme est responsable de la conversion de la kynurénine (KYN) en 3-hydroxykynurénine (3-HK) faisant partie de la voie de la kynurénine ; principale voie du métabolisme du tryptophane chez les mammifères [5][6]. La KMO est considérée comme la meilleure cible thérapeutique dans cette voie car son blocage fait augmenter le neuroprotecteur l'acide kynurénique (KA) et diminuer les métabolites neurotoxiques, 3-HK, Acide 3-hydroxyanthranilique (3OHAA) et l'acide quinolinique (QA) [7]. Il a été démontré dans de nombreuses études que les inhibiteurs de KMO peuvent être utiles dans le traitement de divers maladies et troubles neurologiques telles que : la maladie de Huntington [8][9][10], la maladie d'Alzheimer [11], la maladie de Parkinson [5][12], ainsi que d'autres maladies comme : la pancréatite aiguë [13][14][15][16]. A ce jour-là, il n'existe aucun médicament sur le marché ciblant cette enzyme.

L'objectif du présent travail est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme, ainsi, d'évaluer la performance du programme de docking AutoDock utilisé dans cette étude. Au préalable, nous avons évalué la fiabilité de logiciel utilisé, AutoDock, en appliquant trois tests. Le premier test consiste à calculer l'écart quadratique moyen ou RMSD en angströms entre la pose du ligand conçue par le logiciel et celle de référence déterminée expérimentalement. Ce test a été conforté par une analyse visuelle permettant de visualiser la superposition des modèles de ligands théoriques et expérimentaux. Le dernier test consiste à évaluer le degré de corrélation existant entre les énergies d'interaction calculées par AutoDock et les valeurs expérimentales des IC_{50} des inhibiteurs de la KMO étudiés.

Ensuite, une étude approfondie du mode d'inhibition de la PfKMO par plusieurs inhibiteurs provenant de la littérature a été menée. L'évaluation de leurs énergies d'interaction à l'égard de la PfKMO par docking moléculaire nous a permis de déterminer l'inhibiteur le plus puissant de cette enzyme. Ce composé a été utilisé, par la suite, comme structure de départ pour la conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs encore plus puissants de la KMO tout en améliorant sa pénétration à travers la barrière hémato-encéphalique. Dans cette optique, un criblage virtuel d'une collection de similaires chimiques du composé de départ a été, dans un premier temps menée, suivie par une série de substitutions structurales pour aboutir à la fin à la proposition d'un nouveau inhibiteur potentiellement plus actif.

Enfin, une dernière étude prédictive des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité potentielle des composés nouvellement proposés a été menée en vue de vérifier leurs paramètres ADMET.

Ce manuscrit englobe quatre (4) chapitres :

- Le premier chapitre : traite l'enzyme cible (KMO) et ses inhibiteurs.
- Le deuxième chapitre : décrit le docking moléculaire et les outils nécessaires à son application.
- Le troisième chapitre : regroupe tout le matériel et les méthodes utilisés dans ce travail.
- Le quatrième chapitre : expose l'essentiel des résultats obtenus avec une discussion.
- Une conclusion et quelques perspectives clôtureront ce mémoire.



Chapitre 1 : LA KYNURÉININE 3- MONOOXYGENASE

1. Le métabolisme du tryptophane via la voie des kynurénines

Le tryptophane (TRP) est un acide aminé indispensable qui ne peut pas être synthétisé dans l'organisme. Il doit donc être apporté par l'alimentation. Un apport journalier en tryptophane de 4mg/kg/jour est recommandé par l'OMS. Les sources de tryptophane dans l'alimentation sont majoritairement : les œufs, le lait et les produits laitiers, et les produits carnés. Ces concentrations moyennes dans le sang sont comprises entre 50 et 60 $\mu\text{mol/L}$. Le tryptophane (figure N°1) est utilisé pour la synthèse protéique et il est également le substrat de deux voies métaboliques indispensables dans l'organisme : la voie de synthèse de la sérotonine et la voie des kynurénines (KP) [17].

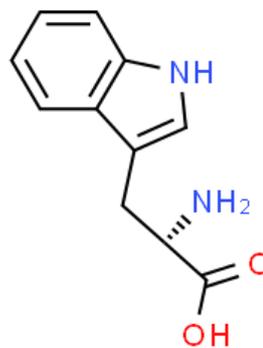


Figure 1 : La structure du tryptophane.

La voie des kynurénines est la principale voie de métabolisation du tryptophane chez les mammifères. En effet, plus de 95% du tryptophane est métabolisé et converti via la voie des kynurénines en kynurénine (KYN) et ses produits de dégradation dans les tissus périphériques (comme le foie et les reins) et le système nerveux central (e.g. les astrocytes, les microglies). Dans une étude sur les *neurospora* en 1947, Beadle et *al.* ont découvert que cette voie aboutisse à la génération d'une importante source d'énergie cellulaire, la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) [6][7][18][19].

La voie des kynurénines joue un rôle important dans de nombreuses maladies et troubles, du cancer aux maladies infectieuses, telles que le VIH, les troubles neurologiques (la schizophrénie et la dépression), les maladies auto-immunes (la sclérose en plaques et la polyarthrite rhumatoïde), des affections périphériques (les maladies cardiovasculaires et la pancréatite aiguë), les maladies neurodégénératives (la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson)[6][20][21].

La première étape du métabolisme du tryptophane en kynurénines est une oxygénation du TRP. Comme le montre la figure N°2, cette étape est catalysée par l'une des deux enzymes : l'enzyme tryptophane 2,3 dioxygénase (TDO) et l'enzyme indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO). La TDO est un

analogue de l'enzyme IDO, c'est-à-dire que leur fonction est identique (même activité catalytique) mais leur origine est indépendante. Ces enzymes catalysent la formation du métabolite N-formylkynurénine (NFK). La TDO a été trouvée dans le cerveau en faible quantité mais cette enzyme est principalement exprimée dans le foie. L'expression de TDO est augmentée par les glucocorticoïdes (cortisol) et le tryptophane lui-même, ce qui fait de cette enzyme le régulateur des concentrations plasmatiques en tryptophane. En revanche, l'IDO est ubiquitaire dans l'organisme, elle est principalement extra-hépatique et exprimée majoritairement dans le cerveau, dans le tractus digestif, les poumons et également le placenta ainsi que les cellules immunitaires, l'expression et l'activité de la IDO sont augmentées par les cytokines inflammatoires telles que L'IFN γ et inhibées par la molécule 1-méthyltryptophane. Le métabolite NFK est ensuite métabolisé par une formamidase très rapidement en kynurénine (KYN), le premier métabolite stable de la voie [6][17][22].

KYN peut agir comme substrat pour trois enzymes et donc elle a trois voies métaboliques catalysées par kynurénine aminotransférases (KATs), kynureninase (KYNU), et kynurénine 3-monooxygénase (KMO).

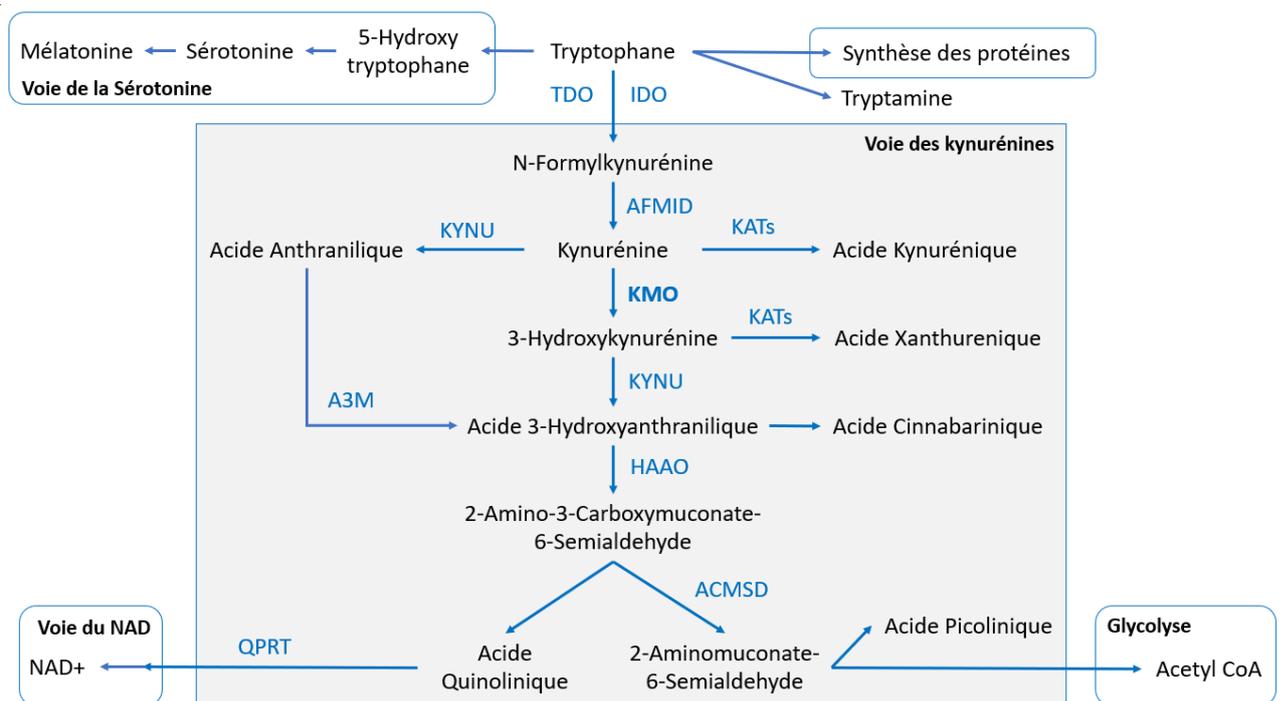


Figure 2 : La voie des kynurénines et ses voies en aval de la sérotonine, glycolyse et NAD+.

IDO: Indoléamine 2,3-dioxygénase, **TDO:** Tryptophane-2,3-dioxygénase, **AFMID:** Kynurénine formamidase, **KATs:** Kynurénine aminotransférases, **KMO:** Kynurénine 3-monooxygénase, **KYNU:** Kynureninase, **A3M:** Anthranilate 3-monooxygénase, **HAAO:** 3-Hydroxyanthranilate 3,4 dioxygénase, **ACMSD:** 2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde décarboxylase, **QPRT:** Quinolinate phosphoryltransférase. [22][23][24]

Les enzymes KATs catalysent la transamination irréversible de KYN en acide kynurénique (KA). L'activité de KATs dépend de la présence du co-enzyme vitamine B6. KYN peut également réagir avec KYNU en formant de l'acide anthranilique. Cependant, KYN a une affinité plus élevée pour KMO que KATs et KYNU. L'enzyme KMO métabolise KYN en 3-hydroxykynurénine (3-HK) qui est ensuite métabolisé en acide 3-hydroxyanthranilique (3OHAA) par l'enzyme KYNU. L'acide 3-hydroxyanthranilique est aussi obtenue par la métabolisation d'acide Anthranilique par l'enzyme anthranilate 3-monooxygénase (A3M). L'activité enzymatique de KYNU est dépendante du cofacteur pyridoxal 5-phosphate (PLP), la vitamine B6 et l'expression de cette enzyme est également induite par des cytokines pro-inflammatoires [17][25][26].

Le 3OHAA est métabolisé par l'enzyme 3-hydroxyanthranilate 3,4 dioxygénase (HAAO) en 2-amino-3-carboxymuconate 6-semialdéhyde (ACMS). Ce dernier peut se diriger vers la synthèse de deux acides ; d'une part, l'enzyme 2-amino 3-carboxymuconate 6-semialdéhyde décarboxylase (ACMSD) qui est exprimée dans le cerveau, le foie et les reins chez l'homme, métabolise l'ACMS en 2-aminomuconate 6-semialdéhyde et par la suite en acide picolinique (PA) ; d'autre part, l'ACMS subit une cyclisation spontanée et non enzymatique en l'acide quinolinique (QA). L'enzyme qui intervient à ce niveau est la quinolinate phosphoryltransférase (QPRT) en catalysant la première étape de la synthèse de novo de NAD⁺ à partir de QA [17][18].

Il est important de noter qu'il existe plusieurs intermédiaires neuroactifs dans cette voie: KA, QA, et 3-HK dont nous parlerons plus en détail par la suite [18].

2. Nomenclature et Classification de la Kynurénine 3-monooxygénase

La KMO (EC 1.14.13.9) aussi connue par Kynurénine 3-hydroxylase fonctionne à un point clé de la voie des kynurénines. Cette enzyme faisant l'objet de cette étude appartient aux oxydoréductases qui agissent sur les donneurs appariés avec incorporation de molécule de dioxygène (les dioxygénases)[5].

La KMO est caractérisée comme une flavoprotéine hydroxylase aromatique (FAHs) de classe A catalysant une réaction de monooxygénation en validant les critères suivants: elle est codée par un seul gène, possède une coenzyme FAD lié de manière non covalente, utilise le NADPH, puis libère le NADP⁺ après réduction de FAD et possède un seul domaine de liaison aux dinucléotides de pli Rossmann [6][27].

3. Description structurale de la Kynurénine 3-monooxygénase

La KMO humaine (*hKMO*) contient 486 acides aminés ce qui correspond à un poids moléculaire d'environ 5 kDa. C'est un dimère contenant des sous-unités asymétriques. Elle présente une hélice transmembranaire C-terminale d'environ 50 résidus de long [6].

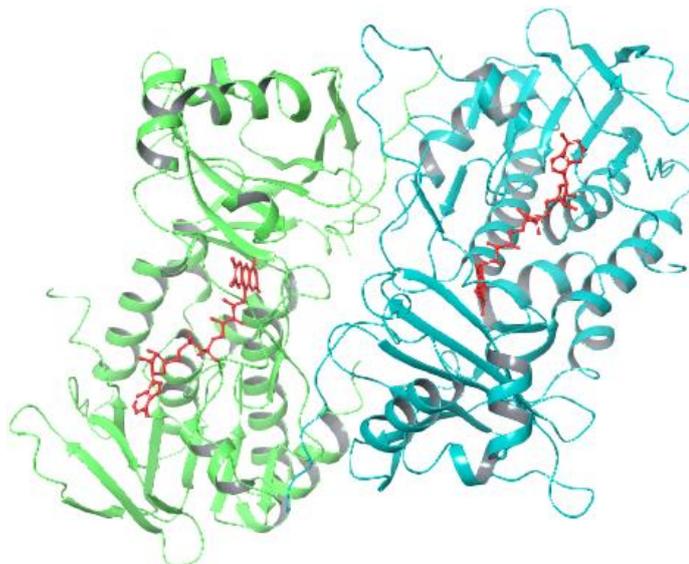


Figure 3 : Structure cristalline de la Kynurénine 3-monooxygénase humaine en présence de cofacteur FAD (code PDB : **5X68**). [28]

Des études sur la distribution tissulaire ont montré que la KMO des mammifères se situe dans la membrane externe de la mitochondrie. La KMO humaine est fortement exprimée dans le foie et les reins, mais également dans la microglie et les macrophages infiltrants dans le cerveau. Bien qu'elle soit exprimée d'une manière ubiquitaire, de très faibles niveaux de la KMO ont été trouvés dans les cellules du cerveau. L'extrémité C-terminale du KMO jouant un rôle important dans l'activité enzymatique se lie à la membrane mitochondriale externe et est donc très hydrophobe. Cela réduit considérablement la stabilité du KMO exprimée de manière recombinante et, par conséquent, l'obtention du KMO humaine ou des autres mammifères a été difficile. Les premières tentatives ne produisant que des purifications partielles de l'enzyme inactive. En raison de ces problèmes, des KMO d'autres organismes ont été utilisées pour étudier son mécanisme et sa structure. Il faut noter qu'il existe un niveau élevé de conservation entre les KMO de différentes espèces, notamment au niveau de leur site actif [6][7][20][29].

La KMO de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScKMO*) a été exprimée avec succès par recombinaison dans *Escherichia coli* et sa purification a abouti à l'isolement du *ScKMO*. Cette KMO a montré dans un essai basé sur HPLC sa capacité à convertir la kynurénine (KYN) en 3-hydroxykynurénine (3-HK)

même s'elle n'a pas de domaine C-terminal. La *ScKMO* a été cristallisée avec succès à la fois sans substrat et en complexe avec un inhibiteur UPF 648 et cela a conduit à la publication de la première structure de KMO sous le code PDB : **4J36**. Les *ScKMO* et *hKMO* partagent 38% d'identité et 51% de similarité et tous les résidus impliqués dans la liaison des ligands sont conservés entre les deux espèces. La structure de *ScKMO* a été un modèle utile au développement de nouveaux échafaudages inhibiteurs[6][7][20][30].

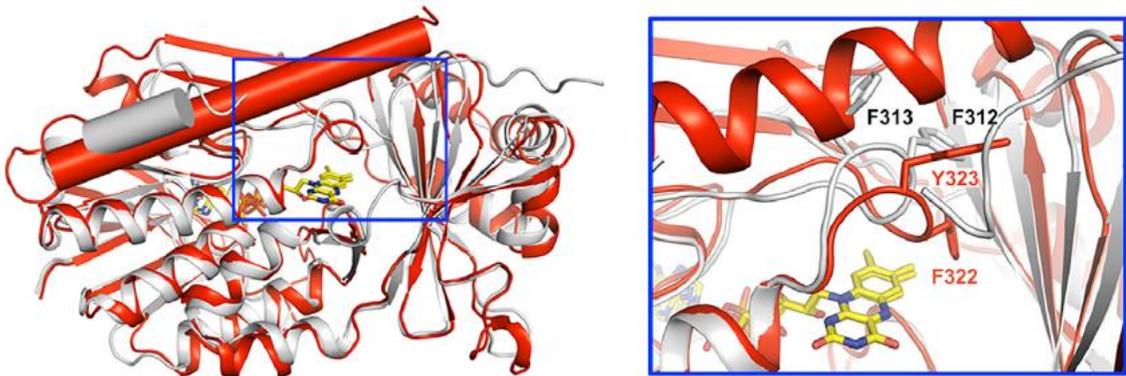


Figure 4 : Comparaison structurelle de *hKMO* et *ScKMO*.

Superposition des structures cristallines du *hKMO* en gris et du *ScKMO* en rouge. L'hélice α de l'extrémité C-terminale est représenté par un cylindre. [28]

De nombreux travaux ont été menés sur la KMO de *Pseudomonas fluorescens* (*PfKMO*). Le principal avantage de *PfKMO* est qu'étant procaryote, elle n'est pas lié à la membrane. Le domaine C-terminal est donc beaucoup moins hydrophobe et la protéine est globalement plus stable [7].

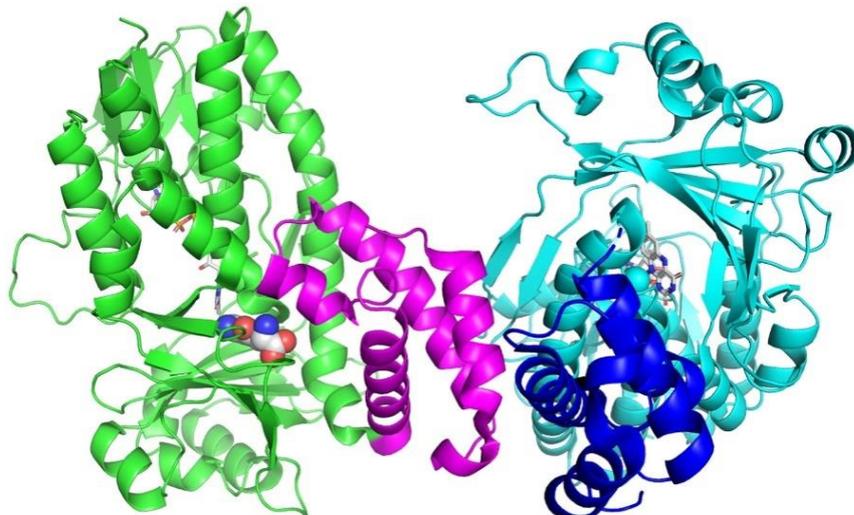


Figure 5 : Structure de *PfKMO* lié avec KYN (code PDB : **5NAK**). [6]

La KYN en sphères, le FAD en bâtons sont liés à la chaîne A (verte), tandis que la chaîne B (cyan) a seulement lié avec le FAD en bâtons. Le domaine C-terminal est représenté en magenta pour la chaîne A et en bleu pour la chaîne B.

La *PfKMO* est une enzyme soluble avec 36% d'identité et 54% d'homologie avec *hKMO* qui peut être exprimée de façon hétérologue dans *Escherichia coli*. Les structures cristallines de *PfKMO* liés à la kynurénine (figure N°5) et avec des différents inhibiteurs ont été récemment résolues. Tous les résidus *PfKMO* qui entourent le site catalytique sont conservés par rapport au *hKMO*, à l'exception du His320, qui est remplacé par une phénylalanine dans la protéine humaine [13][30].

La *PfKMO* contient deux domaines, le domaine principal contenant le pli de Rossmann, le site actif, le cofacteur FAD et un domaine C-terminal. Les résidus hydrophiles : Arg84, Tyr98, Tyr404 et Asn369 sont proches des groupes carboxylates du substrat et les résidus hydrophobes : Leu213, Leu226, Ile224, Phe238 et Met373 sont proches de l'anneau aromatique du substrat. Lorsque la kynurénine est dans le site actif, les interactions entre le groupe carboxylate et Arg84, Tyr98, Tyr404 et Asn369 sont présentes, révélant des interactions clés entre *PfKMO* et les substrats [6][7].

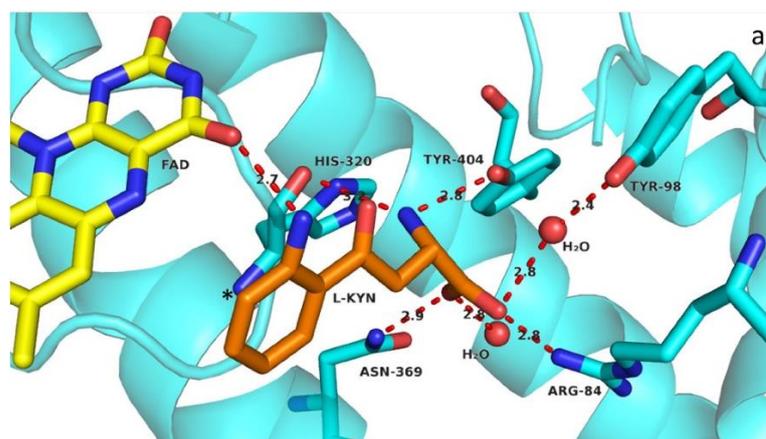


Figure 6 : Structure cristalline du site actif de *PfKMO* lié à KYN. [7]

Suite à la liaison d'un substrat, un changement conformationnel significatif a été observé dans la position du domaine C-terminal. Pour cette raison, il a été conclu que le domaine C-terminal joue un rôle intégral dans la liaison des substrats. Lorsque *PfKMO* ne se lie pas à un substrat ou à un inhibiteur, l'enzyme est censée être dans une conformation «ouverte». Une fois qu'un substrat se lie à *PfKMO*, le domaine C-terminal se déplace alors pour donner une conformation «fermée», observée dans la structure avec de la kynurénine ou des inhibiteurs liés [6][7].

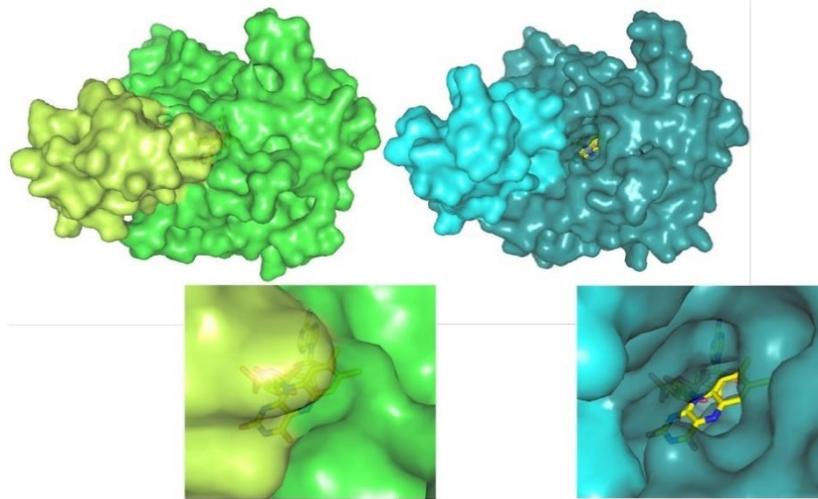


Figure 7 : Surfaces de structures cristallines de *PfKMO*.

A gauche, la position fermée liée au substrat ; A droite, la position ouverte sans substrat, avec un canal menant au FAD. Le domaine C-terminal est représenté en une couleur plus claire. [7]

4. Fonction et Mécanisme d'action de la Kynurénine 3-monooxygénase

En 1956, la KMO a été découverte pour la première fois comme responsable de la conversion du KYN en 3-HK dans les mitochondries du foie des chats et des rats [31].

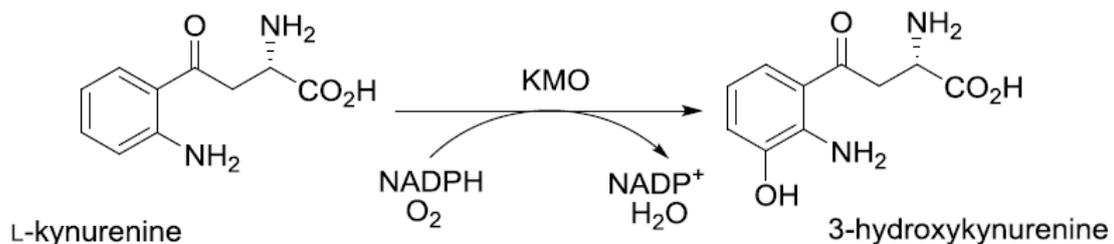


Figure 8 : Métabolisation de KYN en 3-HK.

Le mécanisme de réaction proposé pour KMO a été développé après avoir étudié la *PfKMO*. Le cycle catalytique de KMO peut être divisé en deux demi-réactions, une moitié réductrice et une moitié oxydante. La liaison de KYN au KMO est relativement lente, ce qui rend la réduction de moitié de cette réaction dépendante de KYN. Une fois que la KYN et le NADPH se lient au KMO, le cofacteur FAD est réduit par le NADPH, et le NADP + est libéré par l'enzyme. Le complexe enzymatique réagit ensuite avec l'oxygène moléculaire, formant un intermédiaire 4a-peroxyflavine qui transfère un atome d'oxygène au substrat. La 4a-hydroxyflavine résultante est rapidement déshydratée avant la libération du produit. Le complexe enzymatique oxydé subit ensuite un changement conformationnel, facilitant la libération du produit 3-HK, dans l'étape de limitation de vitesse de ce mécanisme [5][6][20][32].

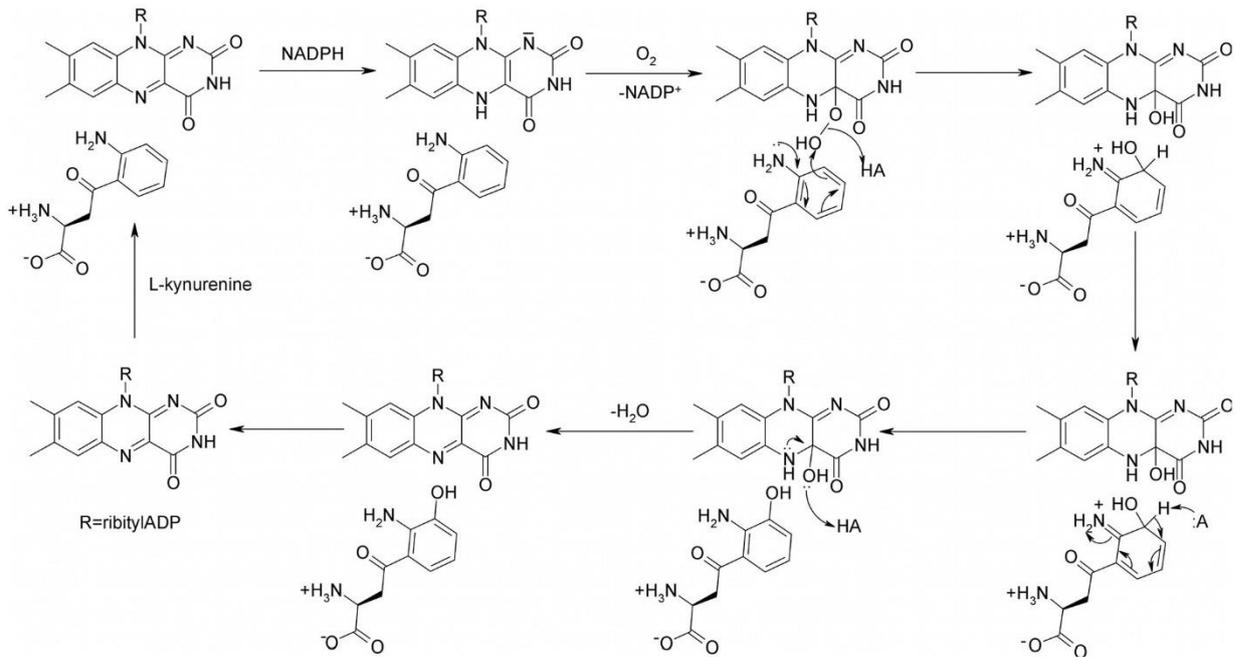


Figure 9 : Le mécanisme catalytique proposé du KMO de *Pseudomonas fluorescens*. [6]

5. Effets thérapeutiques de l'inhibition de la Kynurénine 3-monooxygénase

La kynurénine (KYN) est considérée comme le point de ramification de la voie des kynurénines. Elle a le potentiel d'être convertie en trois métabolites neuroactifs précédemment cités : KA, QA, et 3-HK.

L'acide kynurénique (KA), formé principalement par transamination irréversible du KYN, est un neuro-inhibiteur possédant des propriétés neuroprotectrices et anticonvulsivantes. À des concentrations micro-molaires élevées, la KA antagonise largement les récepteurs ionotropes du glutamate. Cependant, il inhibe de manière préférentielle et compétitive le site co-agoniste de la glycine du récepteur N-méthyl D-aspartate (NMDA) à des concentrations plus faibles. Il agit aussi comme un modulateur allostérique négatif au niveau du récepteur $\alpha 7$ -nicotinique. Plus récemment, il a été démontré que la KA agit comme agoniste sur un récepteur orphelin couplé aux protéines G (GPR35), modulant ainsi la production d'AMPC et inhibant les canaux Ca²⁺ de type N des neurones sympathiques et des astrocytes, finalement conduisant à une suppression de plusieurs voies inflammatoires. Il régule également la réponse immunitaire par ses effets agonistes sur le récepteur arylhydrocarboné (AhR), un facteur de transcription impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques. La signalisation AhR semble jouer un rôle important dans l'arrêt de la libération de cytokines dans plusieurs types de cellules, y compris les macrophages. De plus, KA peut agir comme antioxydant en piégeant les radicaux libres [18][26].

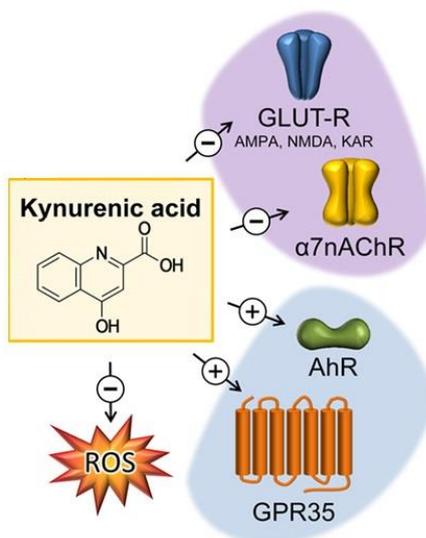


Figure 10 : La structure et les fonctions de l'acide kynurénique (KA). [33]

L'acide quinolinique (QA) est une excitotoxine puissante, un agoniste des récepteurs NMDA qui peut en outre inhiber la recapture du glutamate par les astrocytes, conduisant à une excitotoxicité. Il exerce des effets neurotoxiques via plusieurs mécanismes différents, notamment la génération des radicaux libres hautement actifs, la perturbation de la barrière hémato-encéphalique, la déstabilisation du cytosquelette cellulaire, la promotion de la phosphorylation tau et la perturbation de l'autophagie. La QA potentialise également la réponse inflammatoire en induisant la production de médiateurs pro-inflammatoires dans les astrocytes. La 3-hydroxykynurénine (3-HK) génère également des radicaux libres par auto-oxydation [6][18][25][26][34].

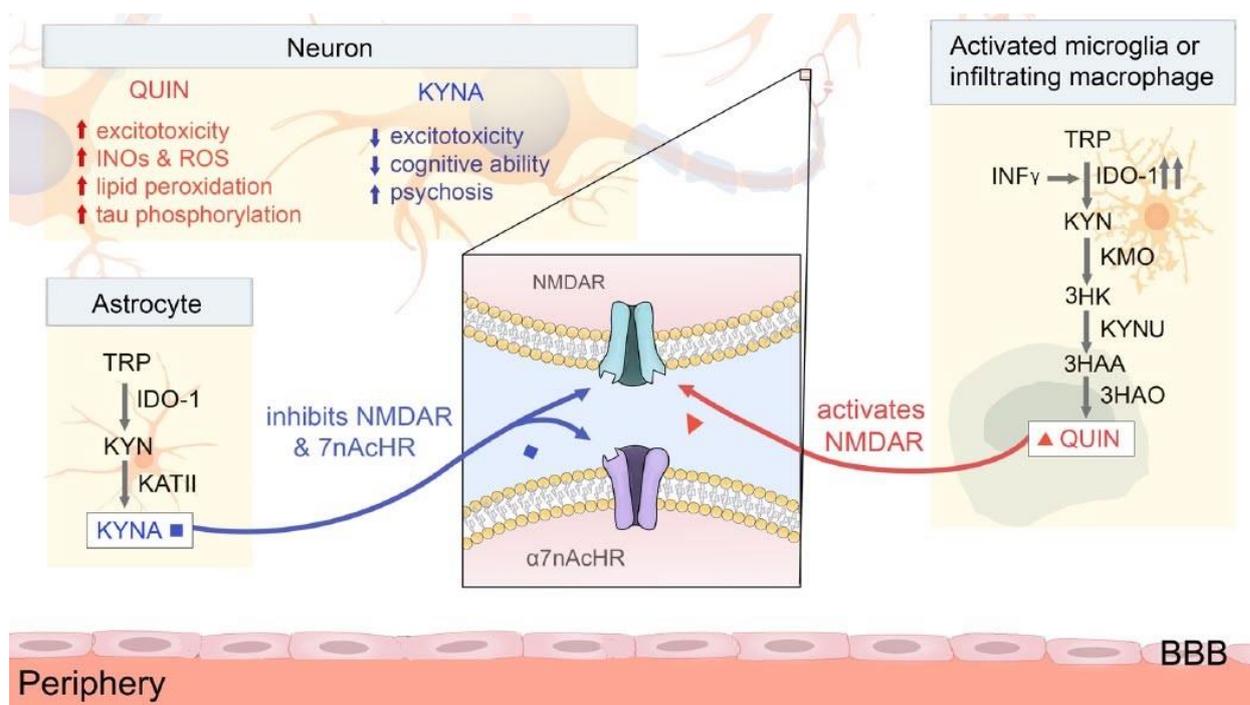


Figure 11 : KA et QA dans le système nerveux et leurs effets sur NMDAR et α7nAChR. [7]

La Kynurénine 3-monooxygénase orchestre les événements majeurs de la voie des kynurénines. Elle est considérée comme la meilleure cible thérapeutique dans cette voie car le blocage à ce stade fait augmenter le neuroprotecteur KA et diminuer les métabolites neurotoxiques 3-HK, 3OHAA et QA [7].

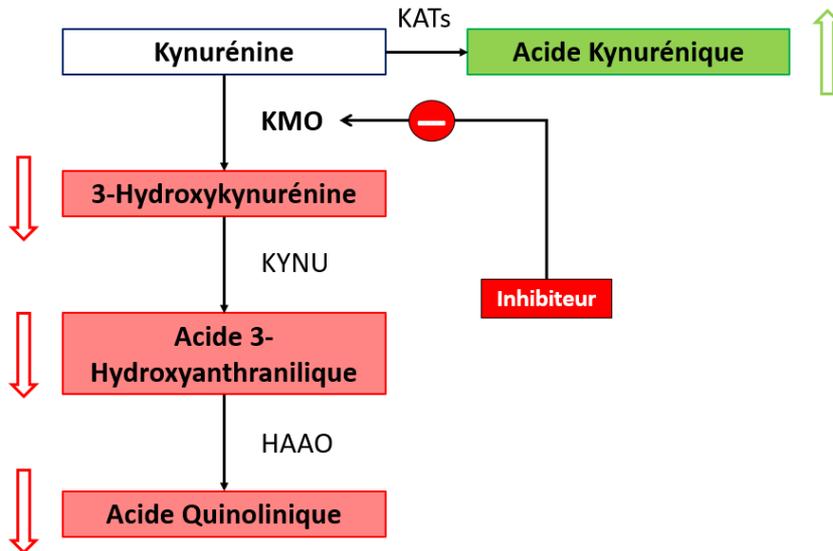


Figure 12 : Effet d'inhibition du KMO dans la voie des kynurénines.

Les métabolites neuroactifs protecteurs et toxiques, en vert et en rouge respectivement.

Comme l'inhibition du KMO est considérée comme une stratégie thérapeutique viable, il a été démontré dans de nombreuses études et recherches que les inhibiteurs de KMO peuvent être utiles dans le traitement de divers maladies et troubles neurologiques telles que : la maladie de Huntington [8][9][10], la maladie d'Alzheimer [11], la maladie de Parkinson [5][12], la sclérose latérale amyotrophique (SLA) [35], l'AVC ischémique [30], la schizophrénie [36][37], et les douleurs neuropathiques [38]; les maladies cardiovasculaires par exemple : la myocardite virale aiguë [39]; et d'autres maladies comme : la pancréatite aiguë [13][14][15][16], l'ischémie rénale [40], la carcinome hépatocellulaire (cancer du foie) [41], le cancer du sein [42], l'addiction de nicotine [43]. L'inhibition de KMO périphérique peut être une nouvelle mesure pour la prévention de l'obésité et du diabète [19].

6. Les inhibiteurs de la Kynurénine 3-monooxygénase

6.1 Conception des inhibiteurs avant la structure cristalline du KMO

Les premiers inhibiteurs de la KMO étaient basés sur des analogues de la kynurénine (KYN). Dans ce contexte, des travaux ont montré que la nicotinyalanine ($IC_{50} = 900 \mu M$) était un faible inhibiteur non spécifique de la KMO en provoquant *in vivo* une augmentation des niveaux d'acide kynurénique dans le tissu cérébral du rat [20].

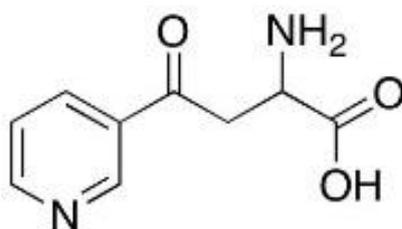


Figure 13 : La structure de la nicotinyalanine.

6.1.1 Les acides 4-phenyl-4-oxobutanoïques

Plusieurs inhibiteurs spécifiques ont montré des résultats prometteurs dans la régulation de l'homéostasie et de l'agonisme des récepteurs NMDA. Parmi ces composés, la m-nitrobenzyl alanine (m-NBA) était l'inhibiteur le plus puissant ($IC_{50} = 0,9 \mu M$) en augmentant les niveaux d'acide kynurénique et avait des propriétés anticonvulsivantes chez le rat. Inspiré par ces résultats, le m-NBA a été utilisé comme structure de départ pour la synthèse des inhibiteurs plus puissants. (R, S) -3,4-dichlorobenzoylalanine (FCE 28833; IC_{50} de $0,2 \mu M$) provoque une augmentation plus durable des niveaux d'acide kynurénique dans le tissu cérébral du rat [6][20].

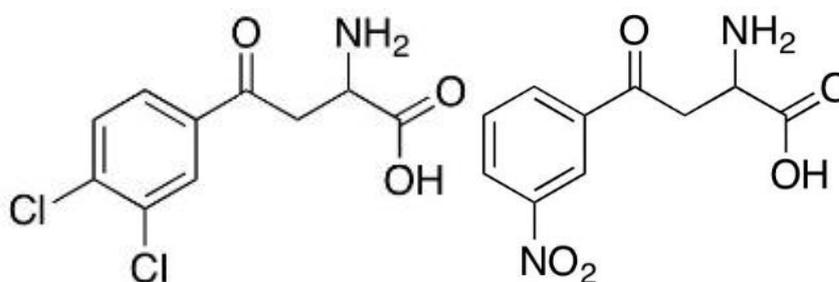


Figure 14 : La structure de m-NBA à droite et FCE 28833A à gauche.

Bien que ces composés aient été parmi les premiers à inhiber la KMO, il a également été démontré plus tard qu'ils agissaient non seulement comme des inhibiteurs mais aussi comme des molécules effectrices. Il a été démontré que la 3,4-dichlorobenzoylalanine et la m-nitrobenzoylalanine se lient

dans le site actif du KMO et stimulent la réduction du NADPH entraînant la formation de l'hydroperoxyflavine instable qui est incapable d'hydroxyler ces molécules, entraînant la libération de H_2O_2 lorsque l'hydroperoxyflavine se décompose [20].

6.1.2 Les sulfonamides

Certains inhibiteurs de cette classe se sont révélés significativement plus puissants que la m-NBA et FCE 28833A, en particulier le Ro 61-8048 ($IC_{50} = 37$ nM). Il a été démontré que ce composé augmente les niveaux de KYN et de KA dans le cerveau grâce à l'inhibition périphérique du KMO, car il ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique [5][6][20][44].

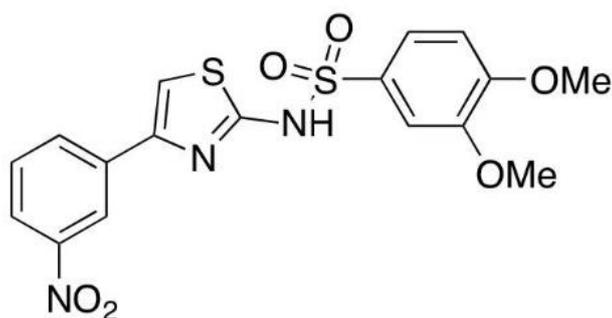


Figure 15 : La structure de Ro 61-8048.

6.1.3 Les acides 4-aryl-4-oxobutanoïques

L'UPF-648 est le meilleur inhibiteur de la KMO appartenant à la famille des acides 4-aryl-4-oxobutanoïques ($IC_{50} = 20$ nM). Il a été démontré que le traitement des souris par l'UPF-648 déplace la KP vers la synthèse de KA. Ce composé a ensuite été utilisé dans la première structure cristalline KMO à résoudre [6][25].

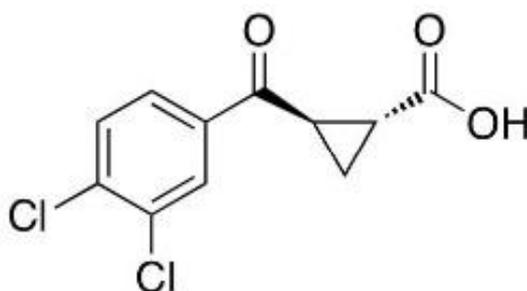


Figure 16 : La structure de UPF-648.

6.2 Conception des inhibiteurs après la structure cristalline du KMO

Après la détermination de la structure KMO, il est devenu possible de concevoir des inhibiteurs KMO avec plus de précision.

6.2.1 Les acides arylpyrimidine carboxyliques

La première classe d'inhibiteurs de la KMO conçue en utilisant les données structurales était les acides arylpyrimidine carboxyliques. Le CHDI-340246 ($IC_{50} = 0,5 \text{ nM}$) s'est révélé être le meilleur composé. Il est hautement sélectif pour la KMO et a montré une puissance à la fois *in vivo* et *in vitro*. Lorsqu'il a été administré par voie orale sur des rats, une augmentation de la KYN et de la KA et une diminution à la fois de QA et de 3-HK dans le cerveau ont été observées [6][9][10][44].

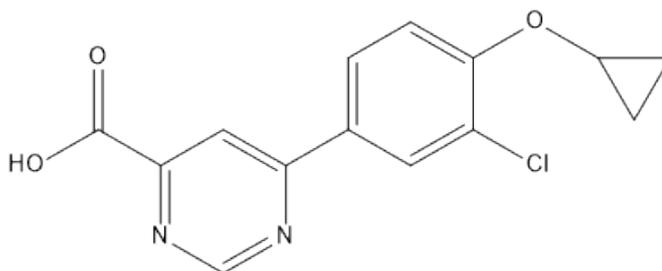


Figure 17 : La structure de CHDI-340246.

6.2.2 Les oxazolidinones

La GSK180 ($IC_{50} = 6 \text{ nM}$) a été développée avec des propriétés physicochimiques appropriées pour l'administration intraveineuse. Le traitement par GSK180 a réduit le 3-HK et augmenté le KA dans les modèles de pancréatite aiguë chez le rat et la souris [44].

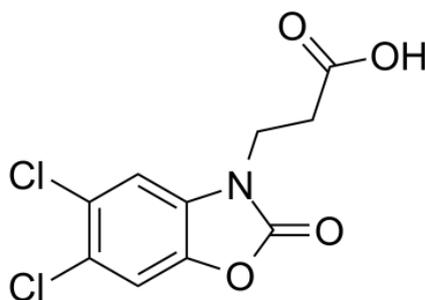


Figure 18 : La structure de GSK180.

6.2.3 Les benzisoxazoles

Les benzisoxazoles sont les inhibiteurs de la KMO les plus puissants trouvés à ce jour. Ils ont été examinés pour leur puissance inhibitrice contre la KMO dans le but de cibler la pancréatite aiguë et le syndrome de dysfonctionnement d'organes multiples. Ils ont une structure similaire à la kynurénine. Le GSK 366 est de loin le plus puissant d'entre eux ($IC_{50} = 0.7\text{nM}$) [6].

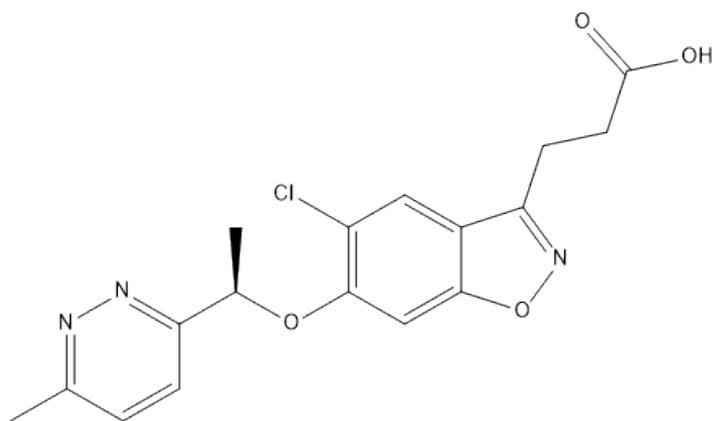


Figure 19 : La structure de GSK366.

Grâce aux techniques de similarité moléculaire, le diclofénac, un médicament anti-inflammatoire connu, a été identifié comme un inhibiteur de la KMO ($IC_{50} = 13,6 \mu M$) [6]. Cette étude ouvre la voie à de futures études utilisant des études de similitudes moléculaires ainsi que la réutilisation de médicaments.

A ce jour-là, il n'existe aucun médicament sur le marché ciblant la Kynurénine 3-monooxygénase.



Chapitre 2 : LE DOCKING MOLÉCULAIRE

Le processus de développement d'un nouveau médicament, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient, dans lequel les essais cliniques succèdent au développement pré-clinique dure environs 12 ans avec un coût global près d'un milliard de dollars. Dans le passé, L'approche traditionnelle de développement d'un nouveau médicament était basée sur le criblage à haut débit (*High-Throughput Screening* ou HTS). Cette approche consiste à tester *in vitro* l'activité biologique d'un très grand nombre de ligand envers une cible thérapeutique d'intérêt, ce qui très coûteux et difficile à mettre en œuvre [1][45].

Pour surmonter les inconvénients des approches traditionnelles, des méthodes plus efficaces ont été introduites pour la découverte de nouveaux médicaments reposant sur le criblage virtuel.

Cette approche permettant de ne sélectionner qu'une partie de la base de données enrichie en molécules susceptibles d'interagir avec la cible protéique. Il permet la prédiction de l'activité des molécules *in silico* de manière rapide et à moindre cout [45][46].

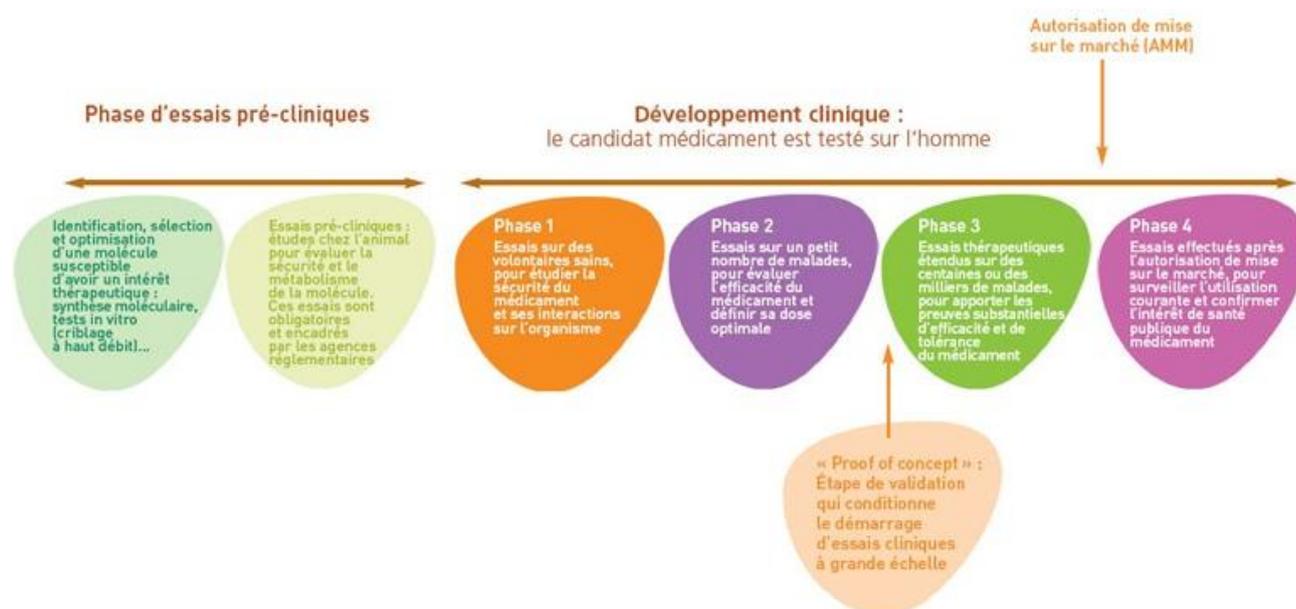


Figure 20 : Le processus de développement d'un médicament « *Drug Design* ». [47]

1. Le criblage virtuel

Le criblage virtuel est une approche théorique permettant de simuler l'activité biologique d'un très grand nombre de ligand pour ne sélectionner que les meilleurs. Cette approche est désormais largement utilisée lors des premières phases de conception d'un nouveau médicament. Le criblage virtuel peut être divisé en deux méthodes selon la disponibilité d'informations structurales :

Le criblage virtuel basé sur la structure de la cible « *Structure based* » et le criblage virtuel basé sur la structure des ligands « *Ligand based* » [46][48].

- Les approches ***ligand-based*** sont souvent appliquées lorsque les informations structurales sur la protéine cible sont rares et analysent les propriétés biologiques et chimiques d'une panoplie de ligands. Ils comprennent des pharmacophores à base de ligand, des modèles de relation quantitative structure-activité (QSAR) ainsi que des calculs de similitude basés sur les propriétés physicochimiques et les formes moléculaires [49].
- Avec l'identification croissante des cibles biologiques et de leurs structures tridimensionnelles, les approches ***structure-based*** sont devenues plus populaires. Elles consistent à estimer la complémentarité structurale de chaque molécule criblée avec le site actif considéré [48][49].

Bien que ces deux approches soient surtout utilisées de manière exclusive, leur combinaison lors du criblage permet de maximiser les chances de succès pour identifier de nouvelles touches "hits"[48][49].

2. Le docking moléculaire

Aussi connue par l'amarrage ou l'arrimage moléculaire, est une procédure *in silico* pour prédire la conformation d'un complexe récepteur-ligand, où la cible biologique d'intérêt thérapeutique (récepteur) est généralement une protéine ou une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) et le principe actif (ligand) est soit une petite molécule soit une autre protéine. Le but de docking moléculaire est de classer les conformations résultant de l'association entre un ligand donné et une protéine cible d'une structure 3D connue grâce à des algorithmes, où les conformations protéine-ligand ou protéine-protéine sont obtenues *in silico* et comparées aux structures obtenues par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN) [1][48][50].

Le docking moléculaire se déroule en deux étapes distinctes et complémentaires :

- La première dite de « ***Docking*** », consiste à rechercher les conformations du ligand (génération de poses) capables à établir des interactions idéales avec le récepteur en utilisant des algorithmes de recherche tels que l'algorithme génétique et l'algorithme de Monte Carlo[48][51].
- La deuxième dite de « ***Scoring*** », consiste à utiliser des méthodes mathématiques et des fonctions de score afin d'évaluer les poses obtenues lors de la première étape [48][51].

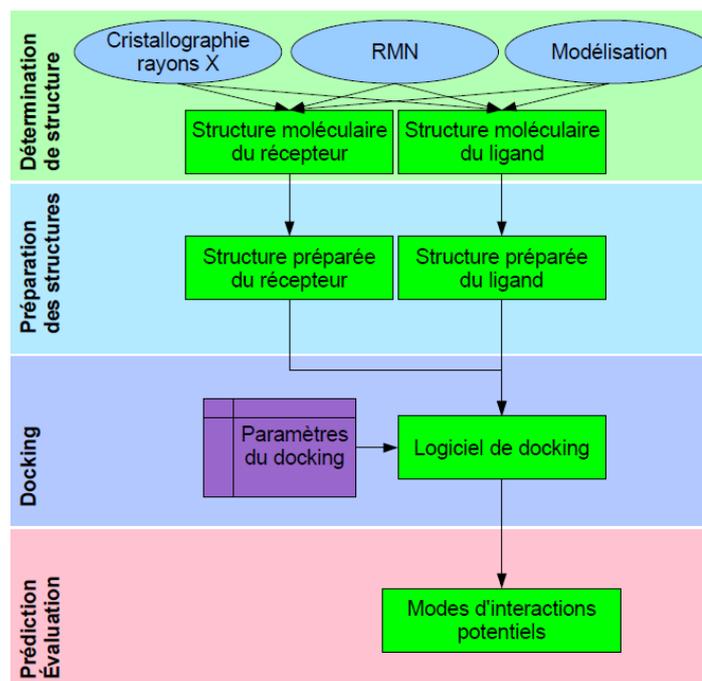


Figure 21 : Les étapes typiques d'un docking moléculaire. [1]

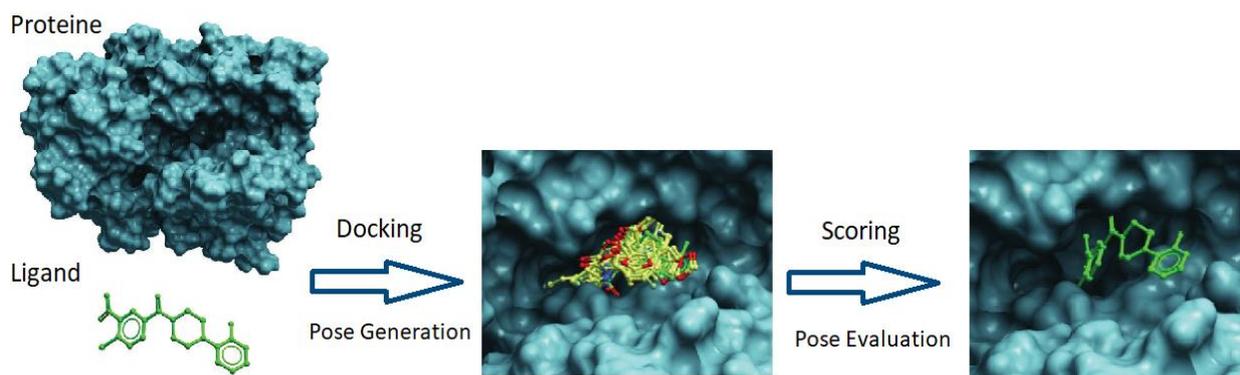


Figure 22 : Les deux étapes de docking moléculaire « Docking » et « Scoring ». [52]

3. Les types du docking moléculaire

Les différents types du docking se distinguent au niveau de leurs conditions d'application et de la nature des informations qu'elles peuvent fournir. La pertinence du choix d'un programme de docking donné repose en premier lieu sur l'adéquation entre ces caractéristiques et celles du système étudié. L'efficacité de l'algorithme choisi sera par ailleurs un compromis entre la rapidité d'exécution et la précision des résultats. Il existe trois type de docking [48] :

- **Le docking rigide** : où la cible et le ligand sont considérés comme corps rigides. Historiquement, le docking rigide a été utilisé pour le développement des premiers logiciels. Ce docking est basé sur le principe dit : "lock-and-key" (principe clef-serrure), selon lequel le

ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure [48].

- **Le docking semi-flexible** : où le ligand est considéré comme corps flexible. C'est le plus couramment utilisé car il permet d'obtenir des résultats plus précis [53][54].
- **Le docking flexible** : où les deux molécules (ligand et cible) sont traitées en tant en compte leur flexibilité. Celui-ci a été développé suite à l'augmentation de la puissance de calcul[48][54].

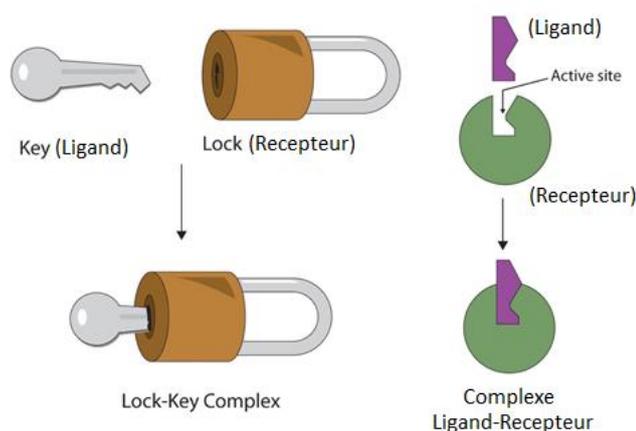


Figure 23 : Représentation du modèle clé-serrure pour le docking rigide. [55]

4. Les outils du docking moléculaire

Pour effectuer un docking moléculaire, il est nécessaire d'avoir un récepteur macromoléculaire de nature protéique, une petite molécule appelée ligand et un programme (logiciel) de docking [54].

4.1 Le récepteur

La majorité des structures protéiques sont disponibles via la *Protein Data Bank* (PDB). C'est la plus grande base de données dans ce domaine. Accessible gratuitement, la PDB compte actuellement plus de 164000 structures macromoléculaires biologiques dont plus de 150000 sont des protéines. Cette banque est universellement considérée comme une ressource de données essentielle pour comprendre les rôles fonctionnels que jouent les macromolécules en biologie et en médecine, elle donne accès à des données structurales tridimensionnelle 3D des macromolécules biologiques (protéines, ADN et ARN). Ces structures sont déterminées par différents techniques telles que la cristallographie aux rayons X et spectroscopie RMN [56][57][58].

Les coordonnées spatiales des structures se trouvent dans un fichier de format pdb, lu par différents logiciels de docking. Les positions atomiques sont spécifiées en coordonnées cartésiennes (x, y, z) en utilisant des unités Ångström [57].

En cas où la cible n'est pas encore déposée au niveau de la PDB, il devient nécessaire de construire la structure 3D de la cible souhaitée en utilisant la modélisation par homologie basée sur la similitude des séquences que contient une autre protéine au niveau de cette banque de donnée [54].

4.2 Les ligands

Le choix du ligand est une étape très importante en docking moléculaire. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules. Nous pouvons obtenir la structure d'un ligand donné sous forme 3D soit par :

- L'utilisation des ligands de la littérature que nous pouvons dessiner, optimiser et sauvegarder dans différents formats (pdb, mol2....etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que ChemDraw, MarvinSketch, ChemSketch.
- La consultation des banques de données de ligands (chimiothèques) fournissant un nombre très important de structures 3D de ligands prêtes pour le docking. Parmi les chimiothèques les plus utilisés, nous pouvons citer la PubChem, Zinc, Chempider [54].

4.3 Les logiciels du docking

Il existe de nombreux logiciels ou programmes de docking moléculaire. Les plus fréquemment cités sont respectivement : AutoDock, GOLD, Glide. Ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques.

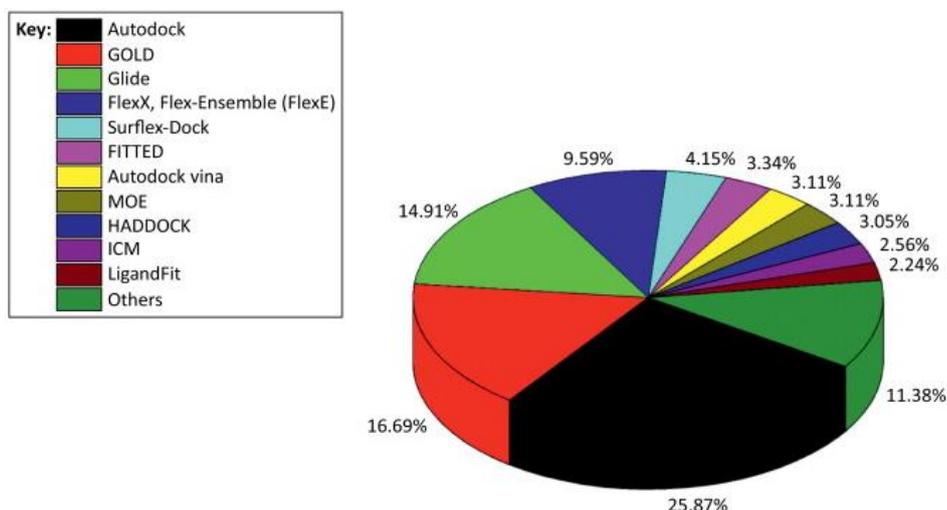


Figure 24 : Logiciels utilisés dans toutes les publications de docking de 1990 à 2013. [59]

Tableau N°1 : Logiciels de docking et de leurs algorithmes. [46]

S.No.	Software tools	Algorithm	Scoring term	Advantages
1.	Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics)	Monte Carlo	Glide score	Lead discovery and lead optimization
2.	AutoDock	Lamarckian genetic algorithm	Empirical free energy function	Adaptability to user defined input
3.	GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking)	Genetic algorithm	GoldScore, ChemScore, ASP (Astex Statistical Potential), CHEMPLP (Piecewise Linear Potential), User defined	Allows atomic overlapping between protein and ligand
4.	Surflex	Surflex-Dock search algorithm	Bohm's scoring function	High accuracy level by extending force-fields
5.	FlexX	Incremental reconstruction	Modified Bohm scoring function	Provides large number of conformations

5. Les interactions protéine-ligand

La reconnaissance moléculaire a lieu lorsqu'un ou plusieurs sites d'interaction au niveau du récepteur et du ligand entrent en contact et définissent ainsi un motif de reconnaissance. Quand le nombre de points d'interaction entre le récepteur et le ligand augmente, l'énergie d'interaction augmente. Le phénomène de reconnaissance souvent combine plusieurs interactions souvent non covalentes. En particulier, les interactions de van der Waals, les liaisons hydrogènes, les interactions ioniques et les interactions hydrophobes [60].

- **Interactions de Van der Waals** : Lorsque deux atomes se rapprochent l'un de l'autre, ils créent une force d'attraction faible et non spécifique qui produit une interaction de Van der Waals. Leur énergie d'interaction est d'environ 0.5 à 1 kcal/mol [60][61].
- **Liaisons Hydrogène** : Elle s'établit lorsqu'un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (donneur) se trouve à une distance d'interaction d'un atome électronégatif (accepteur). La liaison H est directionnelle (dépendance angulaire). Les forces des liaisons hydrogène dans les protéines et les acides nucléiques ne sont que de 2 à 5 kcal/mol [60][61].
- **Interactions ioniques** : Elles résultent d'une force d'attraction électrostatique entre deux atomes de charges opposées. Les liaisons ioniques ont une force variant entre 5 et 10 kcal/mol dans un environnement aqueux [61].
- **Interactions hydrophobes** : La force qui provoque l'agrégation des molécules hydrophobes ou des parties non polaires des molécules plutôt que de se dissoudre dans l'eau est appelée la liaison hydrophobe. La force d'une telle interaction est de 0,37 kcal/mol par groupe CH₂. Par

conséquent, les molécules possédant de longues chaînes alkyles possèdent une valeur plus élevée de force hydrophobe qui peut être plus forte que les liaisons ioniques ou d'autres forces faibles. L'interaction hydrophobe peut aider à lier un médicament à son récepteur, ainsi qu'à stabiliser la structure protéique [61].

- **Interactions Pi-Pi (π - π stacking)** : C'est un type particulier d'interactions non covalentes qui se forment entre deux cycles. Ces interactions jouent un rôle important dans le processus de reconnaissance d'une molécule de ligand et de son récepteur [61].

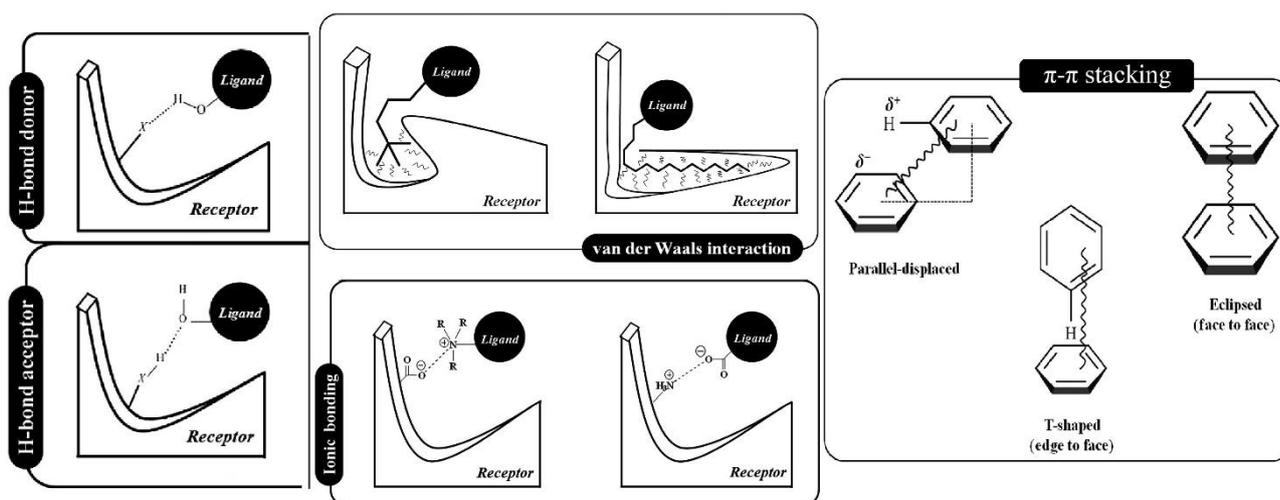


Figure 25 : Illustration des différentes interactions protéine-ligand. [61]



Chapitre 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

Cette étude a pour objectif de proposer de nouveaux inhibiteurs de la Kynurénine 3-monooxygénase (KMO) en utilisant l'approche de modélisation par docking moléculaire. Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé le matériel suivant :

1.1 Ordinateur

Tous les logiciels utilisés ont été installés sous le système d'exploitation Windows 10 professionnel 64 bits (version 2019) dans un micro-ordinateur puissant ayant une mémoire vive (RAM) de 8 GO et un processeur Intel (R) Core (TM) i5 7^{ème} génération.

1.2 Logiciels et Serveurs

Pour réaliser la partie pratique de notre travail, plusieurs logiciels ont été utilisés :

1.2.1 AutoDock

Tous les calculs de docking moléculaire ont été réalisés en utilisant le programme AutoDock 4.2.6. Il se compose de deux sous-programmes principaux: AutoDock4 et AutoGrid4. AutoDock est conçu pour prédire comment de petites molécules se lient à un récepteur de structure 3D connue en s'appuyant sur l'algorithme génétique Lamarckian (AGL) [62]. L'interface graphique AutoDock Tools 1.5.6 a été simultanément utilisée pour faciliter la simulation avec AutoDock tout en permettant de visualiser ses résultats.

1.2.2 Visual Molecular Dynamics (VMD)

VMD 1.9.3 est un programme de modélisation et visualisation moléculaire conçu pour afficher, animer et analyser des assemblages moléculaires [63]. Ce logiciel qui a été développé par l'université de l'Illinois à Urbana-Champaign a été utilisé dans notre travail pour la préparation des protéines et des ligands étudiés. Il a été également utilisé pour la visualisation du positionnement des différents ligands au sein du site actif cible.

1.2.3 Maestro

Le logiciel Maestro 11.8 offre de nombreuses options de visualisation pour répondre aux besoins variés des différentes applications. Il apporte de la clarté à une large gamme de systèmes modélisés[64]. Nous avons utilisé Maestro pour la visualisation des complexes et des interactions

établies entre le site actif de l'enzyme et les inhibiteurs. Ce logiciel, géré et distribué par Schrödinger, a été utilisé aussi pour créer des images de haute qualité des complexes étudiés.

1.2.4 Discovery Studio

Discovery Studio est une suite de logiciels développée et distribuée par Dassault Systemes BIOVIA permettant de simuler des systèmes à petites molécules et macromolécules [65]. Il a été utilisé pour générer les diagrammes 2D des interactions de chaque ligand avec la cible enzymatique KMO simplifiant l'analyse visuelle.

1.2.5 ChemDraw

ChemDraw s'est imposé depuis longtemps comme la référence des logiciels de construction des structures moléculaires. Il est géré et distribué par PerkinElmer [66]. Dans notre travail, nous avons utilisé ChemDraw 3D 16.0 pour la construction et la minimisation d'énergie des structures moléculaire des composés.

1.2.6 OpenBabel

Le logiciel libre OpenBabel 3.0.0 est un système expert en chimie principalement utilisé pour interconvertir des formats de fichiers chimiques [67]. Il nous a servi pour la conversion des fichiers de structures chimiques (e.g. pdb, mol2, sdf, smi).

1.2.7 Microsoft Excel

Microsoft Excel 2019 est un logiciel de la suite bureautique Microsoft Office développé et distribué par Microsoft. Il intègre des fonctions de calcul numérique, de représentation graphique, d'analyse de données et de programmation [68]. Ce logiciel nous a permis de calculer les Log IC₅₀ des inhibiteurs, de tracer la droite de corrélation linéaire et calculer son coefficient.

1.2.8 SwissADME

L'outil SwissADME qui est développé par le groupe de modélisation moléculaire de l'Institut suisse de bioinformatique (SIB) permet d'évaluer si la molécule a des chances d'atteindre sa protéine cible dans l'organisme en termes d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (ADME) [69]. Les paramètres pharmacocinétiques et les propriétés physicochimiques des inhibiteurs proposés ont été prédits à l'aide de ce serveur rapide.

1.2.9 PreADMET

PreADMET est un serveur permettant de prédire, et de calculer *in silico* les paramètres pharmacocinétiques et les propriétés physicochimiques et la toxicité potentielle par différents tests et modèles [70]. Cet outil qui appartient au complexe de recherche en ingénierie de l'université de Yonsei (en Séoul, Corée du sud) a été utilisé pour prédire la toxicité potentielle de nos inhibiteurs.

1.3 Banques de données

1.3.1 Protein Data Bank (PDB)

La PDB est la principale source de données de structures 3D de macromolécules biologiques [58]. La structure 3D de notre enzyme d'intérêt ainsi que les complexes cristallographiques utilisés pour réaliser le test RMSD proviennent de cette banque.

1.3.2 PubChem

PubChem est une banque de données américaine de molécules chimiques gérée par le centre américain pour les informations biotechnologiques (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Cette banque contient principalement de petites molécules, mais également des molécules plus grandes telles que des nucléotides, des glucides, des lipides, des peptides et des macromolécules chimiquement modifiées. Elle collecte les informations sur les structures chimiques, les identifiants, les propriétés chimiques et physiques, les activités biologiques, les données de toxicité...etc [71]. Cette chimiothèque répertorie plus de 102 millions de composés a été utilisée afin d'obtenir les similaires structuraux de notre ligand de base. Les différentes conformations tridimensionnelles des modèles proposés par la PubChem dont les similaires sont téléchargeables sous format sdf.

2. Méthodes

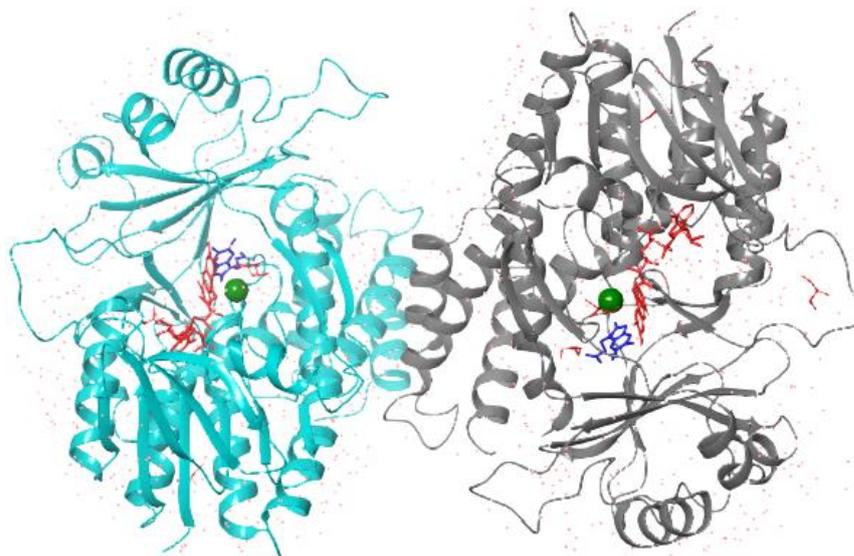
2.1 La sélection de la protéine

La KMO humaine n'est pas disponible dans la banque de données PDB en complexe avec un inhibiteur. Nous avons donc utilisé la KMO de *Pseudomonas fluorescens* (PfKMO) ayant un site actif conservée relativement à celui de l'espèce humaine [13]. À l'heure actuelle, il existe dans la PDB 11 structures cristallographiques de complexes PfKMO-inhibiteur avec une résolution inférieure à 2 Å. Leurs codes pdb ainsi que leurs caractéristiques sont représentés dans le tableau N°2.

Tableau N°2: Code PDB des complexes *Pf*KMO-Inhibiteur avec leurs caractéristiques.

Code PDB	Code de l'inhibiteur	Résolution (Å)	Nombre des chaînes	Nombre d'acides aminés
5NAB	8RK	1.63	2 (A et B)	461
6FOY	E0T	1.65	2 (A et B)	460
5NAG	8R5	1.68	2 (A et B)	461
5MZI	FYK	1.71	2 (A et B)	461
5NAH	8RB	1.75	2 (A et B)	461
5NAE	8R8	1.76	2 (A et B)	461
5N7T	JHY	1.81	2 (A et B)	461
5MZC	8EQ	1.82	2 (A et B)	461
5MZK	OK1	1.82	2 (A et B)	461
5X6Q	7ZR	1.90	1 (A)	463
6FP1	E0Q	1.97	2 (A et B)	460

Parmi ces structures cristallographiques, nous avons choisi celle portant le code **5NAB** car elle possède la plus faible valeur de résolution (1.63 Å).

**Figure 26 :** Représentation par Maestro de la structure 3D de la *Pf*KMO (Code PDB : **5NAB**).

La chaîne A en gris, la chaîne B en cyan, l'inhibiteur **8RK** en bleu, le FAD en rouge, l'ion de chlorure en vert, le glycérol en magenta et les molécules d'eau en rouge.

Le complexe **5NAB** nécessite une préparation avant de l'utiliser pour le docking moléculaire. à l'aide de VMD, la chaîne B, les molécules d'eau, le glycérol, le FAD, l'inhibiteur de référence **8RK**

ainsi que les ions de chlorure ont été éliminés pour ne garder que la chaîne A de l'enzyme. La structure 3D de notre cible préparée de la chaîne A a été exportée sous le format .pdb.

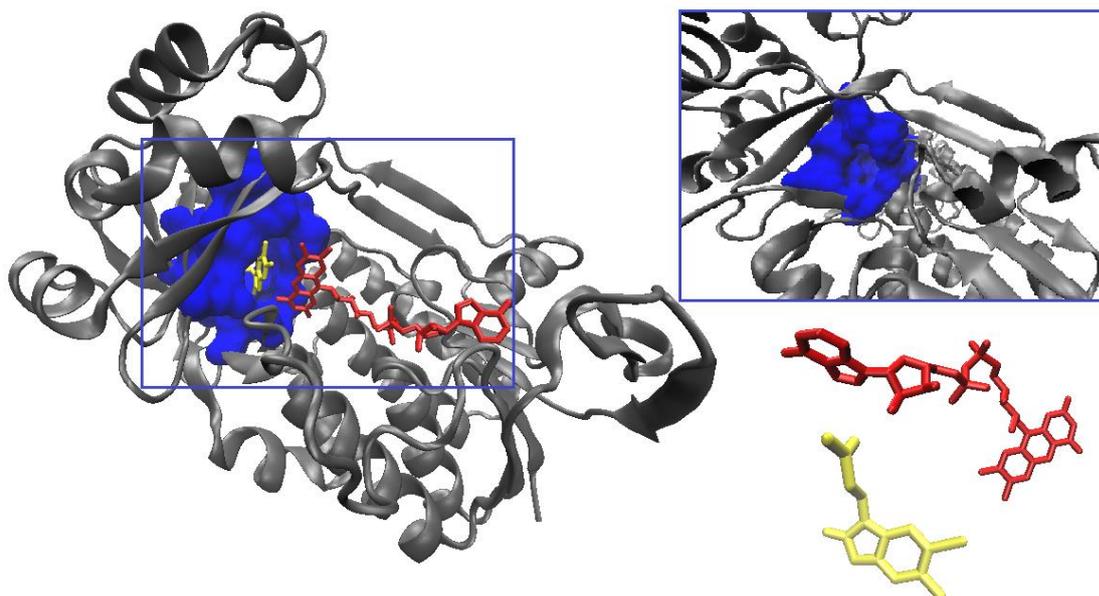


Figure 27 : Représentation par VMD de la chaîne A du complexe **5NAB** et sa cavité catalytique en présence de l'inhibiteur **8RK** (jaune) et le FAD (rouge).

2.2 La construction 3D des Ligands

Les inhibiteurs faisant objet de notre étude ont été construits à l'aide de logiciel ChemDraw 3D. Par la suite, la géométrie de ces inhibiteurs a été optimisée par minimisation de leurs énergies intramoléculaire à l'aide du même programme avant de les exportés sous format mol2.

2.3 Protocole d'utilisation d'AutoDock

La procédure de docking moléculaire par AutoDock s'accomplit en cinq (5) étapes complémentaires :

2.3.1 Préparation de l'enzyme

La protéine doit être préparée à l'aide de sous-programme AutoTors en y ajoutant les hydrogènes polaires manquants. Ensuite, les charges de type "Kollman" ont été assignées avant l'exportation de la protéine sous format pdbqt. Les instructions de cette étape sont :

- ✓ File > Read Molecule > 5nabprot.pdb > Ouvrir
- ✓ Edit > Hydrogens > Add > Select Polar Only > OK
- ✓ Edit > Hydrogens > Merge Non-Polar

- ✓ Edit > Charges > Add Kollman Charges > OK
- ✓ Grid > Macromolecule > Choose > 5nabprot > Select Molecule > OK > Sauvegarder en format PDBQT (5nabprot.pdbqt)

2.3.2 Préparation des inhibiteurs

Les ligands précédemment construits à l'aide de logiciel ChemDraw 3D et enregistrés sous le format pdb ont été traités par AutoTors qui a fait le contrôle de leurs mouvements tout en définissant leurs atomes aromatiques, leurs liaisons flexibles ainsi que leurs angles de torsion. Toutes ces données ont été enregistrées sous le format pdbqt. Cette étape a été réalisée en suivant ces instructions :

- ✓ File > Read Molecule > (sélectionner le fichier pdb de ligand) > Ouvrir
- ✓ Edit > Hydrogens > Add > Select Polar Only > OK
- ✓ Edit > Hydrogens > Merge Non-Polar
- ✓ Ligand > Input > Choose > (sélectionner le ligand) > Select Molecule for AutoDock4 > Ok
- ✓ Ligand > Output > Sauvegarder en format PDBQT

2.3.3 Calcul des grilles de potentielle

Lors de docking moléculaire, l'enzyme *PfKMO* est immergée dans une grille tridimensionnelle englobant largement son site actif et permettant la rotation libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte a été déterminé par les coordonnées $X = 9.923$, $Y = -32.329$, $Z = 46.594$ avec les dimensions $40*40*40$ (Å) qui sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés. L'espacement ou la maille de la grille est fixé par défaut à 0.375 Å.

Toutes ces instructions sont enregistrées dans un fichier texte avec l'extension *gpf* (*Grid Parameters File*). Par la suite, ce fichier est exécuté par le programme *AutoGrid4* qui calcule les énergies d'interaction pour différents types d'atomes de la protéine et le ligand. Les résultats sont générés dans un fichier de format *glg* (*Grid LoG file*) qui sera très utile pour les calculs de docking moléculaire. Pour établir toutes ces étapes, nous avons exécuté ces instructions :

- ✓ Grid > Macromolecule > Open > 5nabprot.pdbqt > Ouvrir > Yes > OK
- ✓ Grid > Set Map Types > Open Ligand > (sélectionner le fichier pdbqt du ligand) > Ouvrir
- ✓ Grid > Grid Box > Center > Remplir les coordonnées X, Y et Z > File > Close saving current
- ✓ Grid > Output > Save GPF > Nom.gpf (Sauvegarder en format GPF)

- ✓ Run > Run AutoGrid > Remplir les cases > Launch

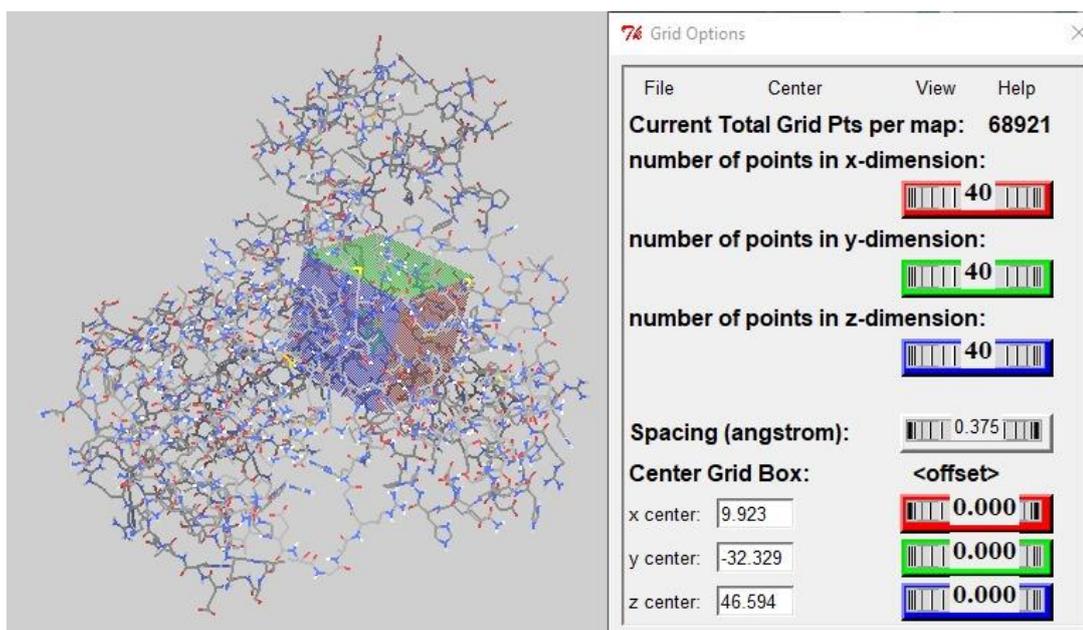


Figure 28 : Position de la boîte de docking dans le site actif de la PfkMO (code PDB : 5NAB) avec ses coordonnées et ses dimensions.

2.3.4 Docking moléculaire

Le docking moléculaire proprement dit est réalisé par le programme AutoDock4 qui nécessite un fichier texte avec l'extension dpf (*Docking Parameters File*). Pour lancer les calculs de docking moléculaire, ce fichier doit contenir les informations et les paramètres suivants :

- Les noms des fichiers contenant le ligand et les grilles de potentiels à utiliser.
- L'état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précisée).
- L'algorithme de recherche à utiliser avec les paramètres associés.

Dans notre étude, l'algorithme génétique de Lamarckian (AGL) a été utilisé avec ses paramètres par défaut. Pour établir cette étape, nous avons respecté les instructions suivantes :

- ✓ Docking > Macromolécule > Set Rigid Filename > 5nabprot.pdbqt > Ouvrir
- ✓ Docking > Ligand > Choose > (sélectionner le ligand) > Select Ligand > Accept
- ✓ Docking > Search Parameters > Genetic Algorithm > Accept
- ✓ Docking > Docking Parameters > Accept
- ✓ Docking > Output > Lamarckian GA 4.2 > Nom.dpf (Sauvegarder en format DPF)
- ✓ Run > Run AutoDock > Remplir les 3 cases > Launch

2.3.5 Analyse des résultats

Les résultats de docking générés par le programme AutoDock4 sont fournis dans un fichier de format dlG (*Docking LoG file*). Ce fichier contient les dix (10) meilleures poses (conformations) simulées de chaque ligand étudié au sein du site actif de l'enzyme, leurs énergies d'interaction en kcal/mol (leurs scores), leurs valeurs de l'écart quadratique moyen (RMSD) ainsi que leurs constantes d'inhibition (Ki) en nM.

La visualisation des interactions établies entre les meilleures conformations générées du ligand et le site actif peut se faire avec l'interface graphique AutoDock à partir du fichier .dlG.

Dans cette étude, nous avons utilisé les deux logiciels Maestro et Discovery Studio Visualizer pour la visualisation des interactions protéine-ligand.

2.4 Tests de fiabilité du programme AutoDock

Avant d'entamer l'étude *in silico* de l'inhibition de la Kynurénine 3-monooxygénase par docking moléculaire, il a été primordial d'évaluer préalablement la fiabilité ou la performance du programme AutoDock. Dans ce contexte, nous avons effectué trois tests de fiabilité :

- L'écart quadratique moyen ou le RMSD (*Root Mean Square Deviation*).
- L'analyse visuelle.
- Le coefficient de corrélation (r).

2.4.1 Le test RMSD

Le programme AutoDock prédit le positionnement d'une ligand au sein du site actif de la protéine. Souvent, la précision des poses de docking est quantifiée par le calcul de la RMSD entre la pose réelle déterminée expérimentalement du ligand dans le récepteur (la pose de référence) et celle calculée par l'algorithme de docking d'AutoDock (Self-docking). Les résultats de simulation sont fiables si les valeurs du RMSD sont inférieures à 2 Å [72].

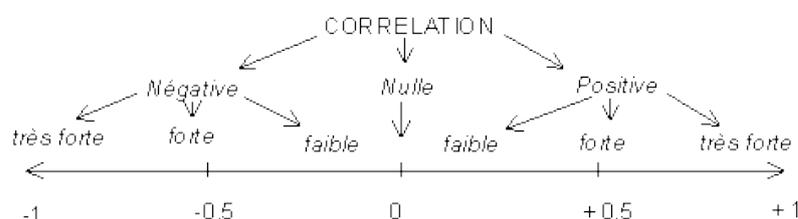
Dans ce travail, le test RMSD a été réalisé sur 100 complexes (protéine-ligand) dont 11 complexes de PfkMO-inhibiteur et 89 complexes pris de façon aléatoire de la PDB.

2.4.2 L'analyse visuelle

L'analyse visuelle qui est une étape complémentaire du test RMSD permet de confirmer les résultats du test RMSD et de vérifier la fiabilité des simulations. Cette visualisation nous permet donc de déterminer si un ligand simulé par AutoDock se superpose avec sa pose de référence.

2.4.3 Le coefficient de corrélation (r)

Le coefficient de corrélation linéaire, dit de Bravais-Pearson (ou de Pearson) permet de mettre en évidence l'intensité et le sens d'une relation linéaire entre deux variables. Cette valeur est comprise entre 1 et -1. La relation devient plus forte quand le coefficient s'approche des valeurs extrêmes 1 (relation positive) ou -1 (relation négative) [73].



Ce test a été utilisé pour évaluer le degré de corrélation linéaire entre les énergies d'interaction (ΔG) de 107 inhibiteurs de la KMO calculées par AutoDock et les valeurs de leurs IC_{50} déterminées expérimentalement et issues la littérature.

2.5 Proposition de nouveaux inhibiteurs

2.5.1 Criblage virtuel d'une collection de similaires

Parmi les 107 inhibiteurs étudiés, nous avons choisi celui ayant présenté le plus faible score (la meilleure énergie d'interaction) pour poursuivre notre étude. Cet inhibiteur est très puissant mais ne peut pas pénétrer la barrière hémato-encéphalique (*blood-brain barrier*, abrégé *BBB*). Afin d'améliorer davantage aussi bien son score (activité inhibitrice) que sa capacité à traverser la BBB, ce composé a été utilisé comme structure de départ pour obtenir une petite chimiothèque de composés similaires via la PubChem.

Avec un taux de similarité de 82%, cette banque de données nous a proposé 352 composés similaires de notre structure de départ. Ces similaires ont été téléchargés sous format sdf puis convertis en mol2 à l'aide du programme OpenBabel. Comme pour les autres ligands, ces similaires ont été préparés et enregistrés en format pdbqt ; format d'entrée requis pour le docking avec AutoDock. Cette collection de similaires a fait l'objet de criblage virtuel.

2.5.2 Modification par substitution

Suite au criblage virtuel, nous avons fait appel à une seconde approche où le composé similaire ayant présenté le meilleur score (la meilleure énergie d'interaction) a subi des modifications structurales par substitution afin d'améliorer son score ainsi que son profil ADMET et plus particulièrement sa capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique. Nous avons effectués des mono-substitutions et des poly-substitutions faisant un total de 62 substitutions. Les groupements fonctionnels ajoutés sur la structure du composé de départ dans différentes positions sont présentés dans la figure N°29.

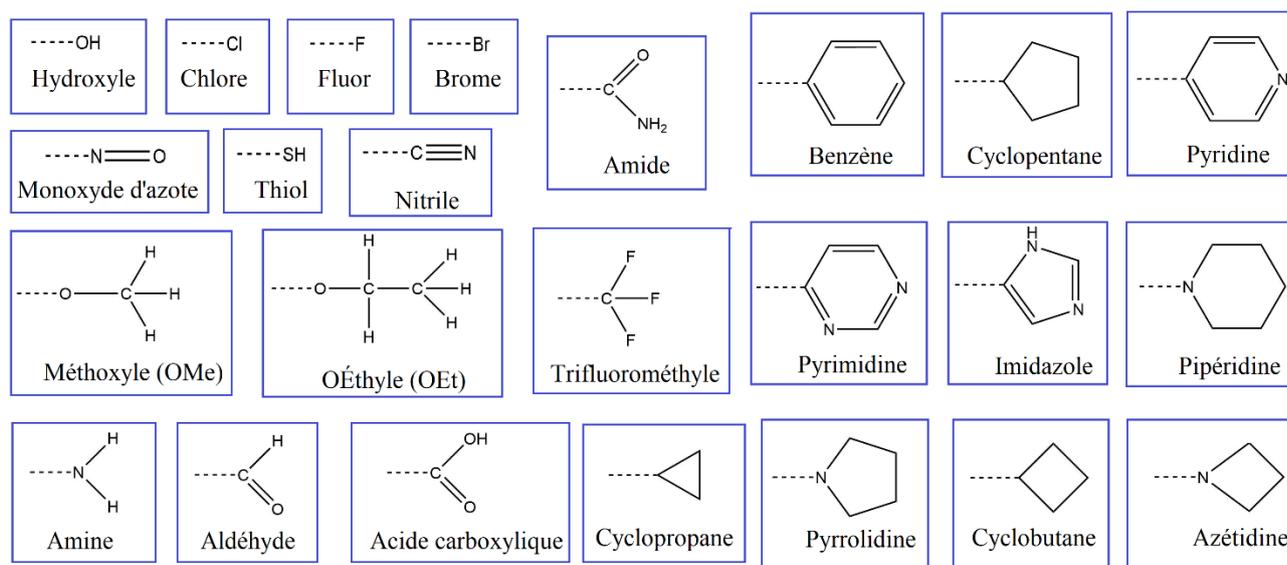


Figure 29 : Les fonctions ajoutés au cours de la mono-substitution.

Ces substitutions ont été effectuées à l'aide du logiciel ChemDraw et enregistrées sous format mol2.

2.6 Les propriétés ADMET

Pour qu'une molécule puissante ayant une affinité qui lui confère une activité biologique puisse parvenir jusqu'à sa cible dans l'organisme, elle doit réussir à passer par divers obstacles pour y arriver avec une concentration suffisante pour que les événements biologiques attendus se produisent. Les études ADMET jouent un rôle crucial étant un élément essentiel de la découverte et du développement des médicaments.

Dans ce travail, nous avons utilisé le serveur SwissADME afin de prédire les propriétés physicochimiques et pharmacocinétique *in silico* régissant les paramètres ADME des composés d'intérêt. Par la suite, plusieurs critères de toxicité ont été prédits via le serveur PreADMET.

2.6.1 Propriétés physicochimiques

◆ La règle de Lipinski (Ro5)

En 1997, Lipinski et *al* ont proposés « la règle de Lipinski » également appelée « règle de 5 » qui permet d'évaluer la biodisponibilité d'un composé chimique par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Selon cette règle, un composé doit valider au moins trois des cinq (3/5) critères suivants pour avoir la chance d'être disponible oralement :

- Le poids moléculaire (PM) ≤ 500 daltons (Da).
- Le nombre d'accepteurs de liaison hydrogène (O et N) ≤ 10 .
- Le nombre de donneurs de liaison hydrogène (OH et NH) $H \leq 5$.
- Le nombre de liaisons rotatives < 15 .
- Le coefficients de partition octanol/eau ($\log P$) ≤ 5 [74].

◆ La règle de Veber

En plus des travaux de Lipinski, des études par Veber et *al* en 2002 suggèrent que les composés qui valident les deux critères suivants, présentaient généralement une bonne biodisponibilité orale :

- La surface polaire de la molécule (TPSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$
- Le nombre de liaisons à libre rotation ≤ 10 [75].

◆ La solubilité dans l'eau

Une mauvaise solubilité des médicaments est l'un des principaux obstacles au processus de découverte et de développement de médicaments. Une solubilité acceptable est une condition préalable pour atteindre des concentrations médicamenteuses suffisamment élevées pour obtenir un effet thérapeutique [76].

◆ Accessibilité à la synthèse

L'évaluation de l'accessibilité synthétique d'un composé est un aspect important dans le processus de la conception des médicaments car dans certains cas, les composés conçus *in silico* ne peuvent pas être synthétisés [77]. Dans notre travail, l'accessibilité à la synthèse chimique a été évaluée en valeurs allant de 1 (très facile à synthétiser) jusqu'à 10 (très difficile à synthétiser).

2.6.2 Propriétés pharmacocinétiques

◆ L'absorption gastro-intestinal

Pour le développement de produits pharmaceutiques oraux, l'étude des processus de perméabilité intestinale des médicaments est cruciale. Pour qu'un médicament soit absorbé, accède au sang puis d'attendre sa cible, il doit être capable de traverser le tractus gastro-intestinal [78]. La barrière intestinale couvre une surface d'environ 400 m² comprenant une monocouche de cellules organisées en cryptes et en villosités. Elle possède des fonctions métaboliques, digestives et immunologiques. Le transport des molécules à travers cette barrière est médié par des processus passifs ou actifs [78][79].

◆ La perméabilité BBB

La barrière hémato-encéphalique (BBB) chez l'homme est formée par des jonctions serrées spécialisées entre les cellules endothéliales qui tapissent les capillaires cérébraux. C'est une barrière de perméabilité rigoureuse et hautement sélective séparant le cerveau du sang circulant. La BBB empêche la plupart des composés externes (98%) de pénétrer dans le système nerveux central (SNC) afin de maintenir l'homéostasie du SNC [80].

De nombreux composés testés ont échoué en raison du manque de capacité à pénétrer la barrière hémato-encéphalique plutôt que du manque de puissance, ce qui a provoqué un goulot d'étranglement dans la découverte de médicaments cibles du SNC [80].

◆ L'inhibition des Cytochromes P450

Les enzymes CYP sont considérées comme l'une des familles d'enzymes les plus importantes car elles jouent un rôle dominant dans la biotransformation d'un vaste nombre de médicaments. Elles existent sous plusieurs isoformes (e.g. CYP1A2, CYP2D6). Les interactions médicamenteuses résultent de l'induction ou l'inhibition d'une ou de plusieurs enzymes du cytochrome P450 par des médicaments. Cela cause une diminution du métabolisme des autres molécules métabolisées par les isoformes inhibées, d'en augmenter leur concentration plasmatique, de prolonger leurs effets thérapeutiques et de déclencher éventuellement des effets indésirables voir même toxique [81][82].

C'est pour cela que l'évaluation du potentiel d'un médicament candidat à inhiber ou à inactiver les enzymes du cytochrome P450 (CYP) demeure une partie importante dans le processus de découverte et de développement de médicaments pharmaceutiques [83].

2.6.3 Tests de toxicité

Pendant le développement du médicament, la sécurité est toujours le problème le plus important qui doit être évalué dans les phases des essais précliniques et cliniques. De nombreuses méthodes *in silico* ont été développées dans laquelle la toxicité peut être prédite directement à partir de la structure chimique. Ces approches de toxicologie *in silico* aident à réduire les expériences sur les animaux, en nous faire gagner du temps et de l'argent. Nous avons utilisé le serveur PreADMET afin de prédire la toxicité potentielle de nos inhibiteurs d'intérêt.

◆ Le test d'AMES

Le test de mutation bactérienne reverse (test d'Ames) est l'un des tests les plus largement utilisés pour l'identification des substances mutagènes. Ce test consiste en des sous-tests parallèles dans lesquels chacune des souches bactériennes testées de *Salmonella typhimurium* est exposée à la substance d'intérêt. Chaque souche a une mutation différente dans un gène nécessaire à la synthèse de l'histidine indispensable à sa croissance. Si l'exposition à la substance d'intérêt permet à la cellule mutée de produire l'histidine nécessaire pour se développer sur un milieu de culture dépourvu de ce dernier, la substance est considéré comme un mutagène [84].

◆ Le test de la cancérogénicité

Pour prédire si une substance ou un produit donné, a un pouvoir carcinogène pour l'homme, les études se fondent actuellement sur les données des essais biologiques sur la cancérogénicité chez deux espèces des rongeurs, généralement le rat et la souris [85][86].

◆ Le test de l'inhibition de hERG

La toxicité cardiaque est l'un des effets secondaires et une des principales causes de retrait de médicaments lors de la découverte de médicaments. Les candidats-médicaments provoquent souvent un blocage indésirable du canal des ions potassium de hERG (*human ether-a-go-go-related gene*) qui entraîne un syndrome du QT long (LQTS), et conduit éventuellement à des arythmies ventriculaires fatales et à une mort subite [87].

◆ Les tests de la toxicité aigue

Le test de la toxicité aigüe sur les algues : Il mesure les effets d'inhibition de la croissance d'une population exposée aux solutions testées sur une période de 72h. Ce test sensible qui permet de détecter des effets toxiques à faible concentration est inclus dans l'ensemble de base des tests éco-

toxicologiques recommandés par l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) et est légalement exigé pour de nouveaux produits chimiques [88][89].

Le test de la toxicité aigüe de Daphnia : L'une des raisons pour lesquelles *Daphnia magna* est un animal d'essai couramment utilisé en toxicologie aquatique est qu'il est facilement cultivé en laboratoire, les Daphnia sont également parmi les organismes les plus sensibles. Le test est réalisé dans un milieu synthétique, auxquels le composé à tester est ajouté à différentes concentrations maintenues constantes pendant la durée de l'essai [90].

Le test de la toxicité aigüe sur les poissons : Les petits poissons couramment utilisés comme modèles de recherche en toxicologie sont en grande partie des espèces d'eau douce, comme le tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le medaka japonais (*Oryzias latipes*) [91].

Le Medaka japonais est fréquemment utilisé pour les tests de toxicité. Les tests peuvent évaluer la neurotoxicité chez les embryons en développement, les effets toxiques sur le phénotype sexuel, ou l'hépatotoxicité chez les poissons adultes [92].

Le tête-de-boule (*fathead minnow* en anglais) s'est avérée susceptible d'être cultivée en continu dans des laboratoires du monde entier car cette espèce est tolérante à plusieurs types d'eau, et son cycle de reproduction/ développement est relativement bien défini. Le tête-de-boule a été utilisé dans de nombreux tests allant de la létalité de 48 h aux tests de cycle de vie partiel et complet pour l'évaluation des risques potentiels de nouveaux produits chimiques [91].



Chapitre 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Tests de fiabilité du programme AutoDock

Pour évaluer la fiabilité du programme AutoDock, nous avons appliqué trois tests :

1.1 Le test RMSD

Ce test a été effectué sur cent (100) complexes protéine-ligand tirés de manière arbitraire de la PDB. Il consiste à calculer le RMSD entre la position d'un ligand simulée par le logiciel et celle de référence (expérimentale). Les prédictions sont jugées fiables si les valeurs de RMSD sont inférieures à 2 Å[72].

Les 100 complexes étudiés avec leurs codes PDB et leurs valeurs de RMSD obtenues sont représentés dans l'annexe N°1. Le diagramme circulaire ci-dessous (figure N°30) représente les résultats de ce test donnés en pourcentage (%), à deux intervalles. Alors que l'histogramme (figure N°31) les représente en pourcentage (%) à divers intervalles.

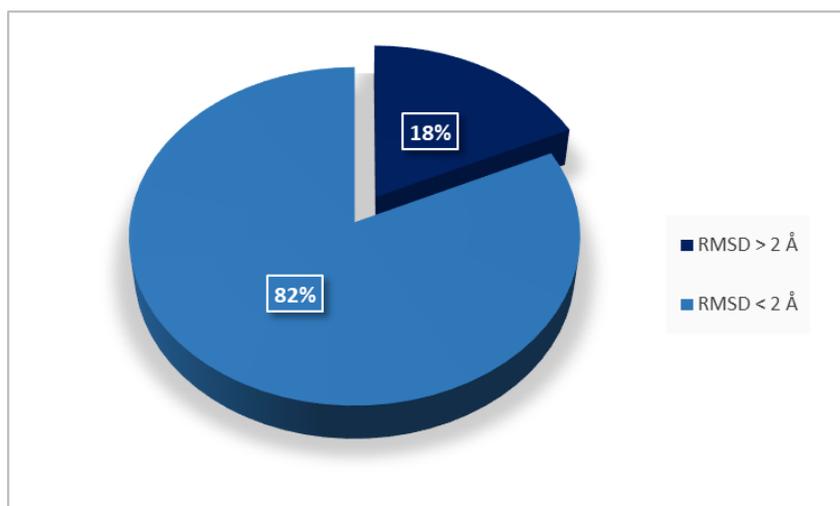


Figure 30 : Résultats en pourcentage du test RMSD par AutoDock à deux intervalles.

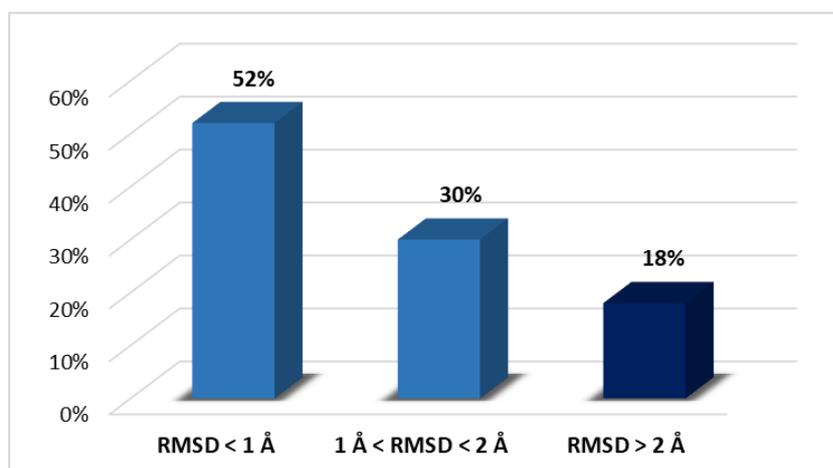


Figure 31 : Histogramme en pourcentage du test RMSD par AutoDock à divers intervalles.

Il est montré dans la figure N°30 que 82% des valeurs RMSD sont inférieures à 2 Å, tandis que seulement 18% sont supérieures à cette valeur seuil (2 Å). Ceci montre l'efficacité d'AutoDock à reproduire correctement des poses cristallographiques. Il est également à souligner que la totalité des onze complexes *Pf*KMO-Inhibiteur testés ont affiché un RMSD inférieur à 2 Å (voir tableau N°3). De plus, la figure N°31 révèle que plus de la moitié des complexes testés avaient un RMSD inférieure à 1 Å. La moyenne calculée des RMSD des 100 complexes est de 1,3 Å. Les résultats obtenus sont en accord avec travaux de Chikhi A. et Bensegueni A. (2008) [93] et Gabb J. et *al* (1997) [94] ce qui prouve la fiabilité du logiciel AutoDock.

1.2 L'analyse visuelle

Suite au test par RMSD, l'analyse visuelle est une étape primordiale pour vérifier davantage la fiabilité des simulations de docking par AutoDock et en même temps de confirmer les résultats de RMSD. Cette visualisation permet donc de déterminer si un ligand simulé se superpose avec sa pose de référence. Dans notre étude, l'analyse visuelle a été effectuée sur quatre (4) complexes parmi les onze (11) complexes *Pf*KMO-Inhibiteur testés afin de nous assurer de la performance d'AutoDock envers les inhibiteurs de notre enzyme cible. Il s'agit bien des complexes **5NAB**, **6FP1**, **5NAE** et **6FPH**. La figure N°32 représente les résultats de cette visualisation.

Tableau N°3: Les valeurs de RMSD des onze complexes *Pf*KMO-Inhibiteur étudiés.

N°	Code PDB	Code des ligands	RMSD
1	5NAB	8RK	0.27
2	6FP1	E0Q	0.30
3	5N7T	JHY	0.40
4	5NAE	8R8	0.43
5	6FPH	E1W	0.45
6	5FN0	JHY	0.48
7	6FP0	E0N	0.56
8	5NAG	8R5	0.64
9	5NAH	8RB	0.85
10	6FOZ	E0H	1.61
11	6FOY	E0T	1.67

Comme le montre la figure N°32, les modèles des ligands **8RK**, **E0Q**, **8R8**, **E1W** simulés par AutoDock (colorés en rouge) présentent des conformations spatiales parfaitement superposables à

celles déterminées expérimentalement par cristallographie (colorés en bleu). Cela témoigne davantage de la fiabilité du programme AutoDock pour l'étude *in silico* de l'inhibition de *PfKMO*.

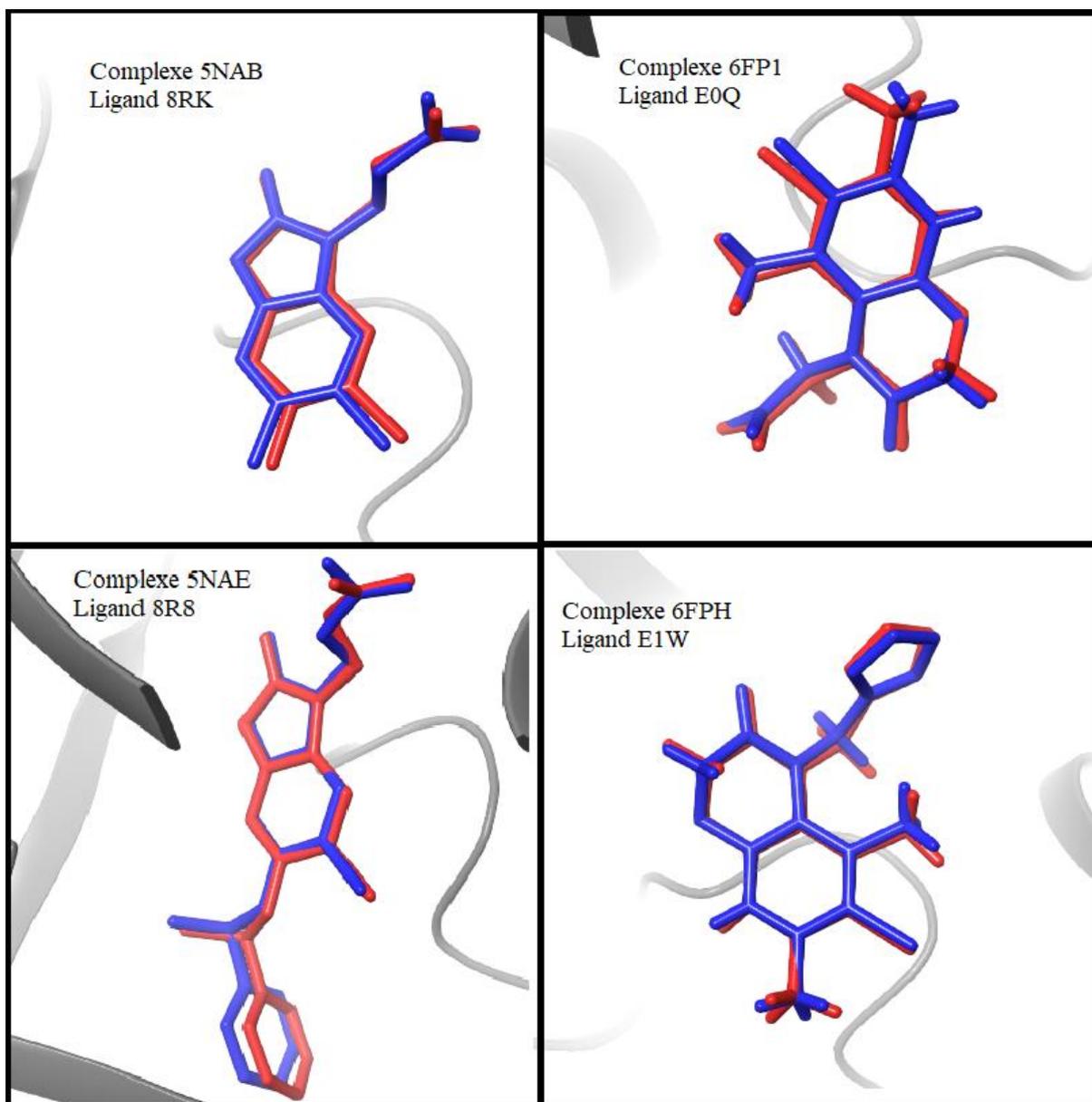


Figure 32 : Comparaison entre les poses du ligand simulés par AutoDock (en rouge) et les poses obtenues par cristallographie aux rayons X (en bleu).

1.3 Le coefficient de corrélation (r)

Ce test a pour but d'évaluer le degré de corrélation linéaire existant entre les énergies d'interaction (ΔG) des inhibiteurs de la KMO calculés par AutoDock et les valeurs de leurs IC_{50} déterminées expérimentalement. Pour réaliser ce test, nous avons utilisé 107 inhibiteurs de la KMO issus de la littérature. Nous avons employé les valeurs de $\text{Log } IC_{50}$ car les valeurs des IC_{50} sont très divergentes.

Les résultats des énergies d'interactions des inhibiteurs étudiés, leurs IC₅₀, ainsi que leurs Log IC₅₀ sont représentés dans le tableau N°4. Les structures de ces composés sont représentés dans l'annexe N°2.

Tableau N°4 : Les énergies d'interaction des 107 inhibiteurs de la KMO, leurs IC₅₀ et Log IC₅₀.

Composé	IC ₅₀ (μM)	Log IC ₅₀	ΔG (kcal/mol)	Référence
C1	0.12	-0,921	-8.76	[95]
C2	0.9	-0,046	-7.59	[96]
C3	0.2	-0,699	-8.40	[97]
C4	0.0005	-3,301	-9.11	[10]
C5	900	2,954	-7.14	[98]
C6	13.6	1,134	-6.72	[99]
C7	0.003	-2,523	-10.46	[16]
C8	0.0043	-2,367	-8.73	[16]
C9	0.06	-1,222	-8.60	[16]
C10	6.309	0,800	-7.37	[15]
C11	1	0,000	-7.68	[15]
C12	0.050	-1,301	-8.00	[15]
C13	5.011	0,700	-8.40	[15]
C14	2.511	0,400	-8.41	[15]
C15	0.631	-0,200	-8.20	[15]
C16	2.511	0,400	-8.55	[15]
C17	3.162	0,500	-8.07	[15]
C18	1.995	0,300	-7.87	[15]
C19	0.125	-0,903	-8.13	[15]
C20	0.501	-0,300	-8.06	[15]
C21	0.025	-1,602	-8.27	[15]
C22	0.079	-1,102	-8.39	[15]
C23	0.630	-0,201	-8.38	[15]
C24	1	0,000	-7.86	[15]
C25	5.011	0,700	-8.00	[15]
C26	0.039	-1,409	-8.30	[15]
C27	3.162	0,500	-7.86	[15]
C28	0.063	-1,201	-8.51	[15]
C29	0.5	-0,301	-8.64	[13]

C30	0.1	-1,000	-8.80	[15]
C31	0.039	-1,409	-8.22	[15]
C32	0.1	-1,000	-8.80	[15]
C33	0.012	-1,921	-8.27	[15]
C34	0.005	-2,301	-8.40	[15]
C35	0.079	-1,102	-8.56	[15]
C36	0.04	-1,398	-9.46	[6]
C37	0.012	-1,921	-8.60	[14]
C38	0.012	-1,921	-9.45	[14]
C39	0.01	-2,000	-8.72	[14]
C40	0.025	-1,602	-9.30	[14]
C41	0.031	-1,509	-8.27	[14]
C42	0.002	-2,699	-10.39	[14]
C43	0.005	-2,301	-10.75	[14]
C44	0.003	-2,523	-10.67	[14]
C45	0.005	-2,301	-10.87	[14]
C46	0.002	-2,699	-10.42	[14]
C47	9.31	0,969	-5.97	[95]
C48	123.4	2,091	-7.73	[95]
C49	85.6	1,932	-7.72	[95]
C50	100.8	2,003	-7.83	[95]
C51	4.3	0,633	-8.50	[95]
C52	72.1	1,858	-7.54	[95]
C53	0.4	-0,398	-8.97	[95]
C54	6.3	0,799	-7.62	[95]
C55	2.4	0,380	-8.43	[95]
C56	0.0016	-2,796	-9.13	[100]
C57	0.1	-1,000	-7.66	[100]
C58	5.77	0,761	-7.28	[101]
C59	2.68	0,428	-7.97	[101]
C60	0.114	-0,943	-9.73	[101]
C61	0.47	-0,328	-9.08	[101]
C62	0.24	-0,620	-9.42	[101]
C63	0.056	-1,252	-9.18	[101]
C64	0.076	-1,119	-9.13	[101]

C65	0.056	-1,252	-9.86	[101]
C66	0.039	-1,409	-8.75	[101]
C67	0.019	-1,721	-8.87	[101]
C68	0.1	-1,000	-8.66	[102]
C69	1.9	0,279	-7.59	[102]
C70	0.32	-0,495	-8.18	[102]
C71	0.58	-0,237	-7.27	[102]
C72	0.9	-0,046	-6.96	[102]
C73	0.5	-0,301	-8.06	[102]
C74	0.0006	-3,222	-9.12	[10]
C75	0.038	-1,420	-8.10	[10]
C76	0.99	-0,004	-8.00	[10]
C77	0.34	-0,469	-8.07	[10]
C78	16.7	1,223	-6.99	[10]
C79	1.3	0,114	-8.53	[10]
C80	0.0032	-2,495	-9.42	[10]
C81	0.09	-1,046	-9.43	[10]
C82	0.012	-1,921	-9.30	[10]
C83	0.14	-0,854	-7.90	[10]
C84	0.01	-2,000	-8.39	[10]
C85	0.26	-0,585	-7.80	[10]
C86	0.002	-2,699	-9.75	[10]
C87	0.012	-1,921	-9.70	[10]
C88	0.025	-1,602	-10.17	[10]
C89	4	0,602	-7.79	[10]
C90	1.7	0,230	-6.80	[10]
C91	0.011	-1,959	-8.32	[10]
C92	0.019	-1,721	-9.04	[10]
C93	0.076	-1,119	-7.81	[10]
C94	0.038	-1,420	-8.27	[10]
C95	0.005	-2,301	-8.82	[10]
C96	0.022	-1,658	-8.51	[10]
C97	6.51	0,814	-7.95	[10]
C98	0.017	-1,770	-8.50	[10]
C99	0.032	-1,495	-8.49	[10]

C100	0.0007	-3,155	-9.10	[10]
C101	0.06	-1,222	-8.75	[10]
C102	0.006	-2,222	-9.21	[10]
C103	0.049	-1,310	-9.20	[10]
C104	0.0015	-2,824	-9.61	[10]
C105	0.012	-1,921	-9.51	[10]
C106	0.002	-2,699	-9.18	[10]
C107	0.057	-1,244	-9.91	[10]

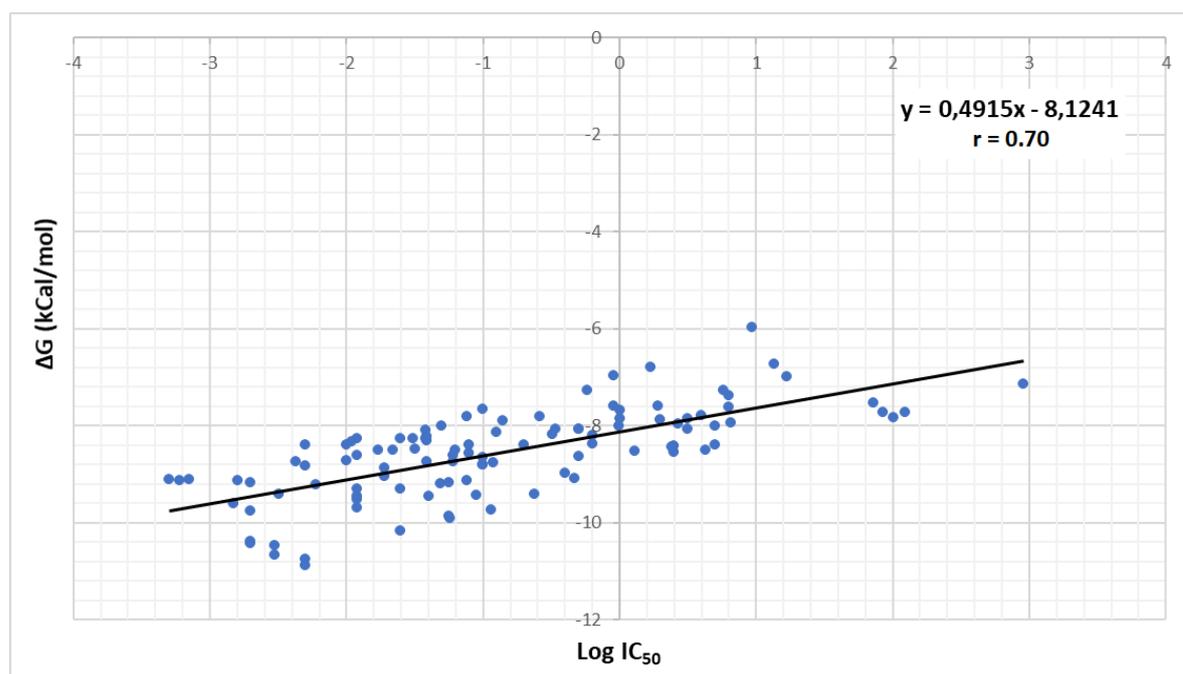


Figure 33 : Corrélation linéaire entre les Log IC₅₀ et les énergies d'interaction (ΔG) des 107 inhibiteurs étudiés.

L'analyse par régression linéaire réalisée entre les énergies d'interaction et les IC₅₀ (Log IC₅₀) des 107 inhibiteurs étudiés génère un nuage de points (voir figure N°33) avec un coefficient de corrélation égal à 0.70 et montre ainsi que ces deux variables évoluent dans le même sens et presque avec la même intensité. Il existe donc une certaine corrélation linéaire positive entre ces deux variables. Ces résultats prouvent, encore une fois, que le programme AutoDock est hautement performant, conformément aux travaux de Mokrani E. H. qui ont également révélés un coefficient de corrélation nettement supérieur à 0.5 [54].

Conclusion

Les différents tests utilisés dans cette étude pour évaluer la qualité de programme AutoDock, le test RMSD, l'analyse visuelle et l'étude de la corrélation nous ont permis de conclure que AutoDock est

un programme hautement performant et fiable. Il peut donc être utilisé, sans grands risque d'erreurs, pour étudier *in silico* l'inhibition de KMO par différents ligands.

2. Etude des interactions de *Pf*KMO-inhibiteur

À l'issue du test de corrélation linéaire, nous avons sélectionné le composé **C45** (voir tableau N°4) qui a révélé le meilleur score (-10.87 kcal/mol) parmi les 107 inhibiteurs étudiés. Ce composé faisant partie de la classe des benzisoxazoles inhibe fortement la KMO aussi bien théoriquement que expérimentalement avec un IC₅₀ égale à 5 nM.

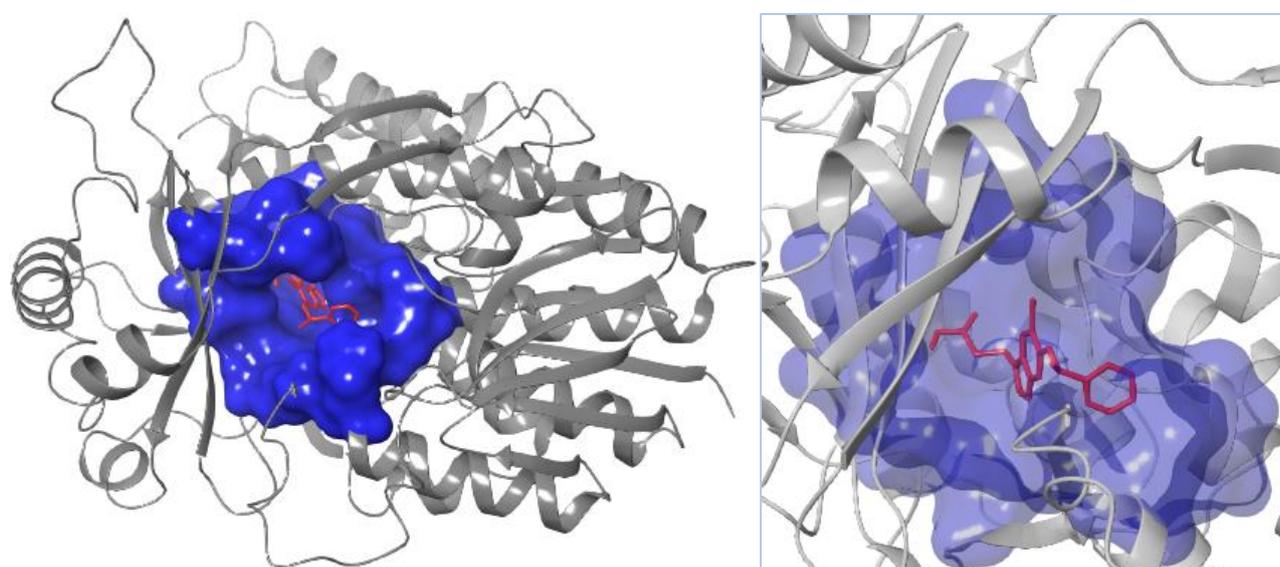


Figure 34 : Représentation par Maestro du positionnement du **C45** dans le site actif de la *Pf*KMO.

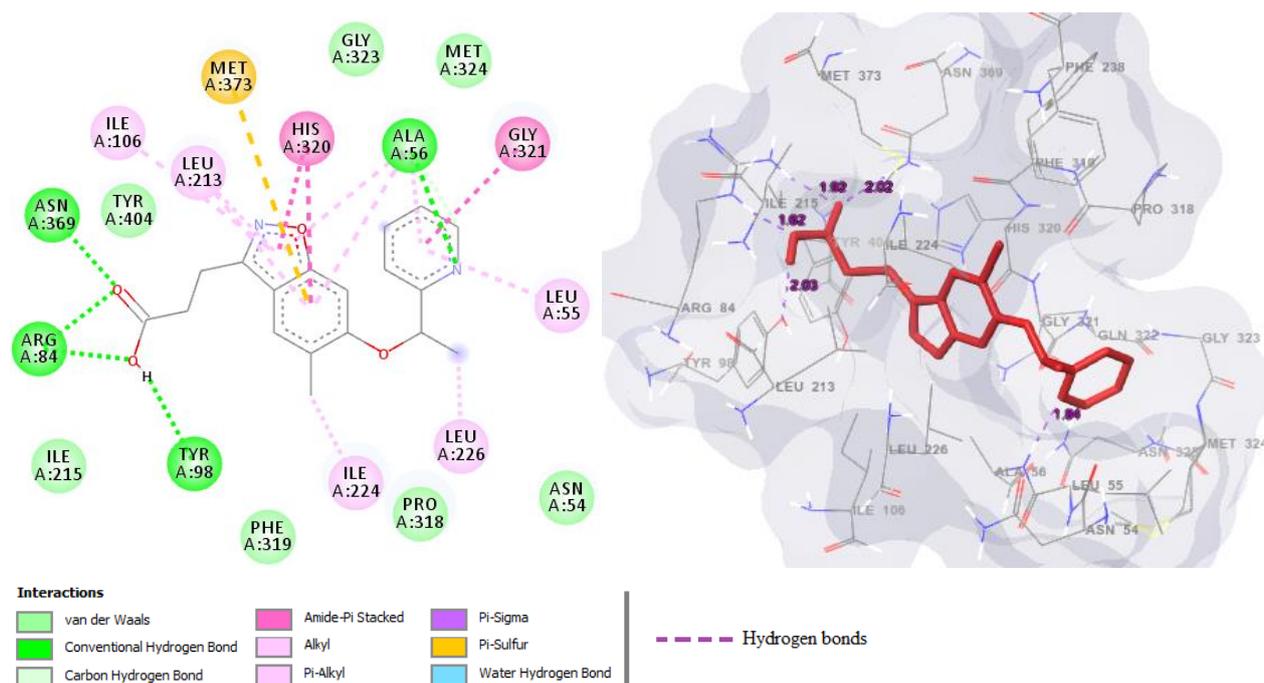


Figure 35 : Diagrammes des interactions entre le ligand **C45** et la *Pf*KMO.

L'analyse visuelle montre que le composé **C45** se place correctement dans la cavité catalytique de l'enzyme ou il établit 5 liaisons hydrogène :

- La première est formée entre l'azote (N) de cycle pipéridine de l'inhibiteur et la fonction amine (NH₂) du résidu ALA56 avec une distance de 1.84 Å.
- La deuxième est observée entre l'oxygène (O) de groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et le groupement amine secondaire (NH) du résidu ARG84 avec une distance de 1.62 Å.
- La troisième est située entre le groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et l'oxygène (O) de groupement hydroxyle (OH) du résidu TRY98 avec une distance de 2.03 Å.
- Les deux dernières liaisons hydrogène font intervenir le deuxième oxygène (O) du groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur qui se lie avec le groupement amine (NH₂) de l'ASN369 (distance de 2.02 Å), ainsi que la fonction amine (NH₂) de l'ARG84 avec une distance de 1.92 Å.

Le complexe *Pf*KMO-Composé **C45** est également stabilisé par de nombreuses interactions hydrophobes avec les 11 résidus : LEU55, ALA56, TYR98, ILE106, LEU213, ILE215, ILE224, PRO318, PHE319, MET373, TYR404.

Nous avons simulé au préalable les propriétés pharmacocinétiques de composé **C45** (voir tableau N°5 et figure N°36) à l'aide du serveur SwissADME, ce composé a présenté un résultat négatif inhérent à la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique. L'objectif principal de notre travail est de proposer de nouveaux inhibiteurs capables de franchir cette barrière et peut ainsi atteindre la cible au niveau du système nerveux central, tout en améliorant leurs score.

Tableau N°5 : Les propriétés pharmacocinétiques de composé **C45**.

Propriétés	Composé C45
GI absorption	Élevée
BBB perméabilité	Non
CYP1A2 inhibition	Oui
CYP2C19 inhibition	Oui
CYP2C9 inhibition	Oui
CYP2D6 inhibition	Non
CYP3A4 inhibition	Non

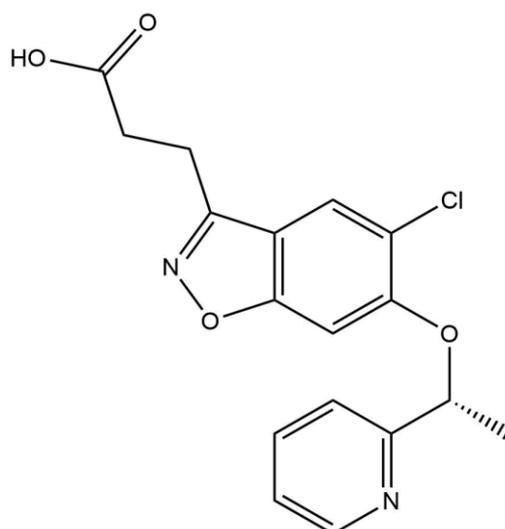


Figure 36 : La structure du composé C45.

3. Proposition de nouveaux inhibiteurs

3.1 Criblage virtuel d'une collection de similaires

Le composé **C45** a été pris comme structure de départ afin de rechercher dans la PubChem des composés similaires, cette chimiothèque nous a fournis une collection de 352 composés similaires avec un taux de similarité allant jusqu'au 82 %. Le docking moléculaire de ces similaires avec la *PfKMO* fait ressortir 46 composés (13.06% du total des similaires) présentent une énergie d'interaction inférieure à celle du composé de départ (-10.87 kcal/mol). Les numéros d'accession, ainsi que les scores de docking des 352 composés similaires sont représentés dans l'annexe N°3. Le tableau N°6 ci-dessous affiche les 10 meilleurs similaires classés selon leurs score.

Tableau N°6 : Numéro d'accession et score des dix (10) meilleurs inhibiteurs obtenus suite au docking moléculaire de la collection de similaires du composé **C45**.

Composé	Numéro d'accession CID	ΔG (kcal/mol)
S185	CID_121415087	-12,06
S276	CID_135139688	-12,02
S158	CID_121415048	-11,89
S159	CID_121415049	-11,82
S163	CID_121415057	-11,74
S102	CID_68920380	-11,70
S162	CID_121415052	-11,67

S182	CID_121415083	-11,66
S219	CID_121415172	-11,64
S203	CID_121415130	-11,62

Le criblage virtuel de la collection de similaires chimiques du composé **C45** fait ressortir le composé **S185** comme le meilleur inhibiteur potentiel de notre cible avec une énergie d'interaction égale à -12.06 kcal/mol.

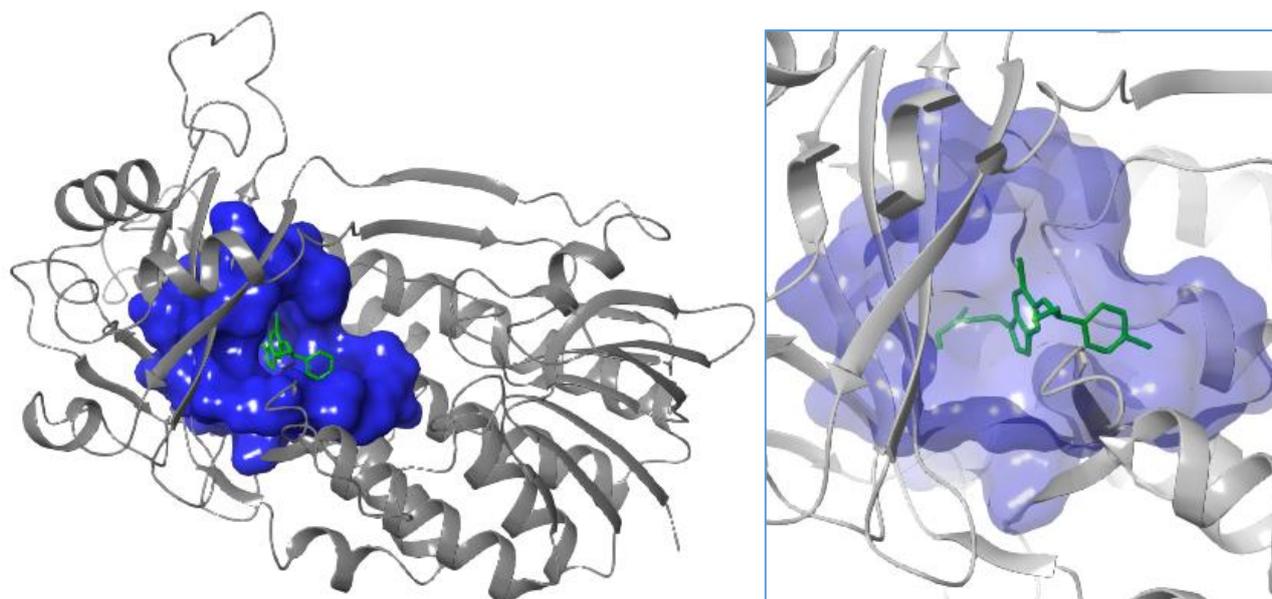


Figure 37 : Représentation par Maestro du positionnement du composé **S185** dans le site actif de la *PfKMO*.

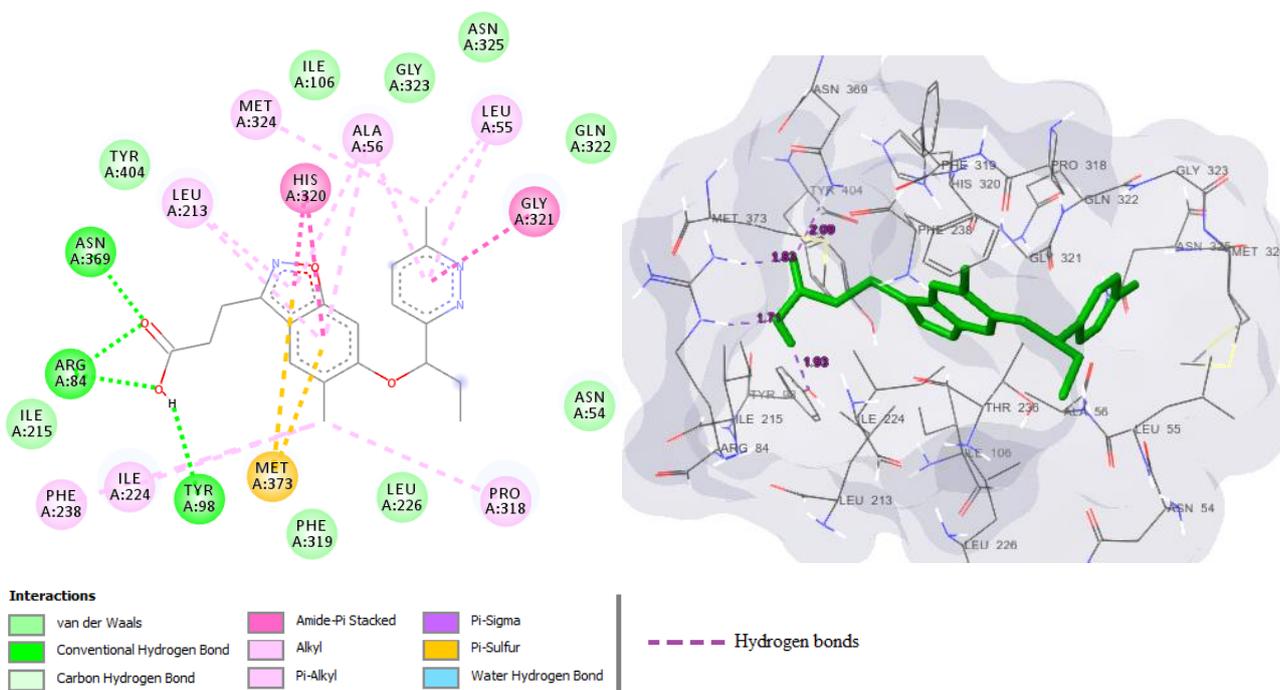


Figure 38 : Diagrammes des interactions entre le ligand **S185** et la *PfKMO*.

La visualisation du mode d'interaction de composé **S185** au sein du site actif de la *PfKMO* révèle la mise en place de quatre (4) liaisons hydrogène :

- La première est formée entre l'oxygène (O) de groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et le groupement amine secondaire (NH) du résidu ARG84 avec une distance de 1.71 Å.
- La deuxième est située entre le groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et l'oxygène (O) de groupement hydroxyle (OH) du TRY98 avec une distance de 1.93 Å.
- Les deux autres liaisons hydrogène font intervenir le deuxième oxygène (O) de groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et le de groupement amine (NH₂) du résidu ASN369 (distance de 2.09 Å), ainsi qu'avec la fonction amine (NH₂) du résidu ARG84 (distance de 1.83 Å).

De plus, plusieurs interactions hydrophobes sont formées entre l'inhibiteur (**S185**) et les 13 résidus LEU55, ALA56, TYR98, ILE106, LEU213, ILE215, ILE224, LEU226, PRO318, PHE319, MET324, MET373, et TYR404 du site actif de l'enzyme.

En tenant compte de la marge d'erreur de 2 kcal/mol tolérée par AutoDock, l'amélioration de l'énergie d'interaction pour le composé **S185** n'est pas significative. De plus, ce composé s'est avéré incapable de franchir la barrière BBB pour atteindre son lieu d'action au niveau du SNC (tableau N°7). Par conséquent, nous avons fait appel à seconde approche basée sur la modification de la structure du composé **S185** en y introduisant des groupes fonctionnels dans différentes positions, dans l'espoir de proposer de nouveaux inhibiteurs plus puissants avec un meilleur profil ADME.

Tableau N°7 : Les propriétés pharmacocinétiques de composé **S185**.

Propriétés	Composé S185
GI absorption	Élevée
BBB perméabilité	Non
CYP1A2 inhibition	Oui
CYP2C19 inhibition	Oui
CYP2C9 inhibition	Oui
CYP2D6 inhibition	Non
CYP3A4 inhibition	Oui

3.2 Modification par substitution

Le composé **S185** a subi plusieurs modifications structurales différentes positions afin d'améliorer non seulement son affinité à l'égard de la cible, mais aussi son profil ADMET, particulièrement sa capacité à franchir la barrière BBB.

3.2.1 Les mono-substitutions

Dans un premier temps, une série de mono-substitution du composé **S185** sur les positions R1 et R2 (voir figure N°39) a été réalisé en faisant appel à 24 substituants. Le docking moléculaire des 48 composés qui en résultent fait ressortir le composé **M22** comme meilleur inhibiteur de la KMO (tableau N°8).

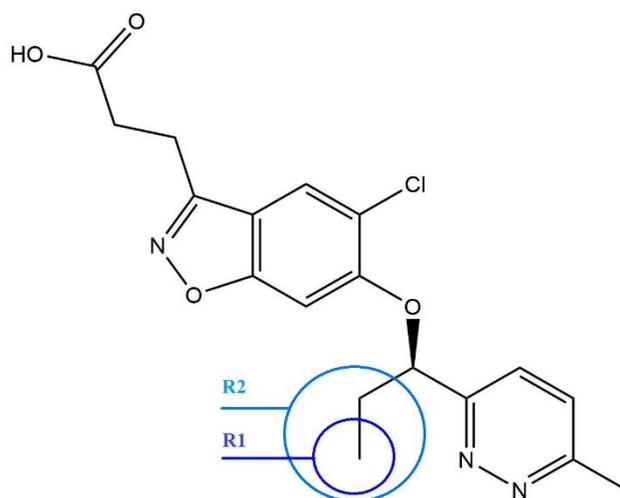


Figure 39 : Représentation des positions des radicaux R1 et R2 dans la structure de base du composé **S185**.

Tableau N°8 : Les énergies d'interaction (scores) des 48 composés monosubstitués et leurs BBB perméabilité.

Composé mono-substitué	R1	R2	Score (kcal/mol)	BBB Perméabilité
M1	OMe		-11.69	Non
M2	OEt		-11.99	Non
M3	OH		-11.15	Non
M4	COOH		-10.91	Non
M5	COH		-11.92	Non
M6	NH ₂		-12.05	Non
M7	NO		-11.67	Non

M8	SH		-11.66	Non
M9	Cl		-12.14	Non
M10	F		-11.57	Non
M11	CF ₃		-11.77	Non
M12	Br		-12.48	Non
M13	CN		-12.28	Non
M14	CONH ₂		-12.41	Non
M15	Benzène		-12.92	Non
M16	Cyclopentane		-12.39	Non
M17	Pyridine		-12.56	Non
M18	Pyrimidine		-12.94	Non
M19	Imidazole		-11.70	Non
M20	Cyclobutane		-12.64	Non
M21	Cyclopropane		-12.26	Non
M22	Pipéridine		-13.42	Non
M23	Pyrrolidine		-13.16	Non
M24	Azétidine		-12.77	Non
M25		OMe	-11.77	Non
M26		OEt	-11.91	Non
M27		OH	-11.23	Non
M28		COOH	-10.75	Non
M29		COH	-11.68	Non
M30		NH ₂	-11.49	Non
M31		NO	-11.81	Non
M32		SH	-11.92	Non
M33		Cl	-11.86	Non
M34		F	-11.49	Non
M35		CF ₃	-11.54	Non
M36		Br	-12.09	Non
M37		CN	-11.89	Non
M38		CONH ₂	-11.50	Non
M39		Benzène	-12.96	Non
M40		Cyclopentane	-12.91	Non
M41		Pyridine	-12.82	Non
M42		Pyrimidine	-12.76	Non

M43		Imidazole	-12.57	Non
M44		Cyclobutane	-12.84	Non
M45		Cyclopropane	-12.36	Non
M46		Pipéridine	-13.30	Non
M47		Pyrrolidine	-12.82	Non
M48		Azétidine	-12.49	Non

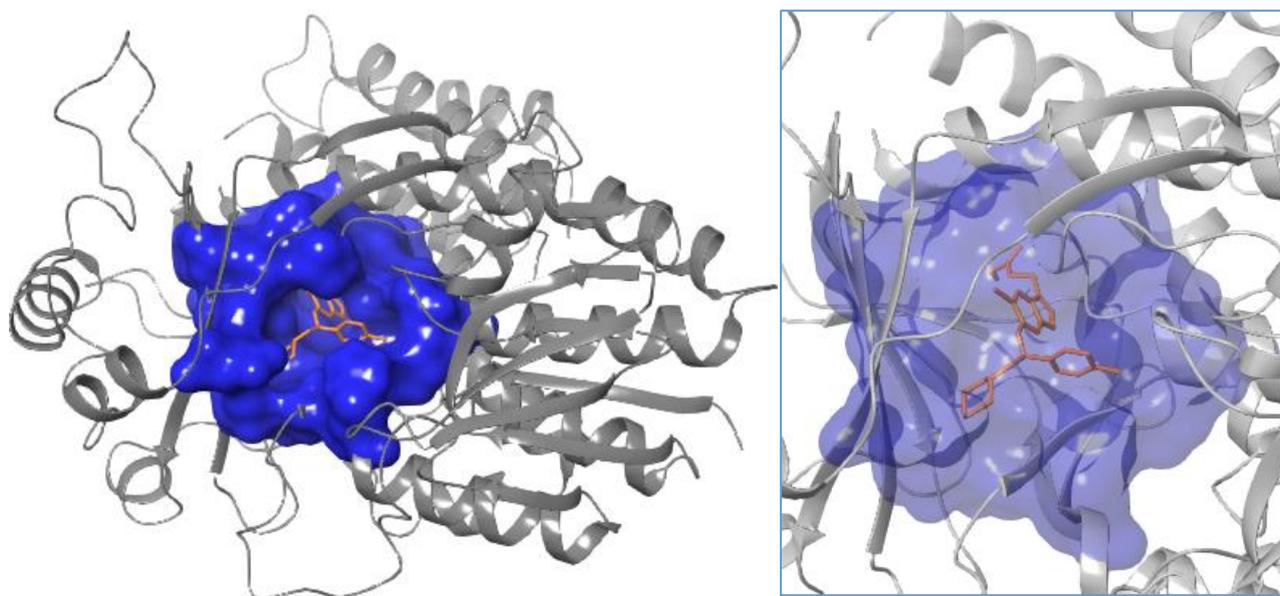


Figure 40 : Représentation par Maestro du positionnement du composé M22 dans le site actif de la PfkMO.

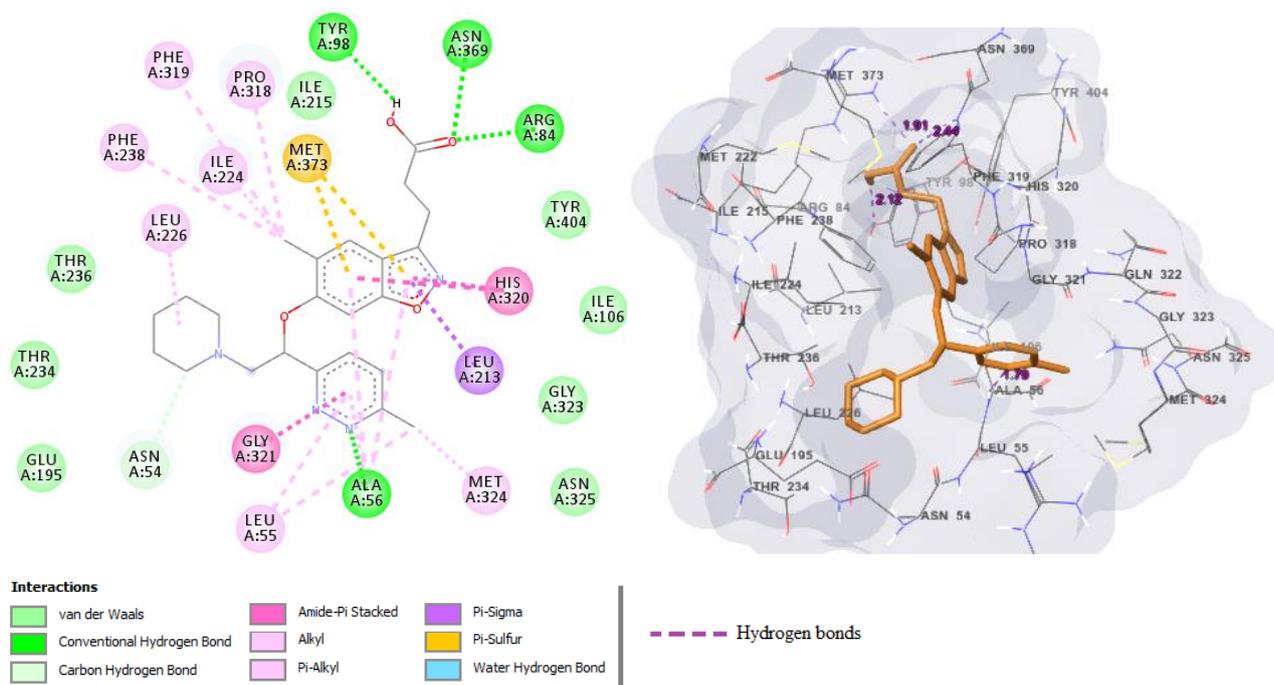


Figure 41 : Diagrammes des interactions entre le ligand M22 et la PfkMO.

L'introduction du groupement pipéridine en position R1 à la place du méthyle (CH₃) dans la structure de départ (composé **S185**) améliore l'énergie d'interaction pour la cible qui passe de -12,06 kcal/mol dans le cas du composé **S185** à -13,42 kcal/mol dans le cas du composé **M22**. L'analyse visuelle révèle la présence de 4 liaisons hydrogène.

- La première est située entre l'azote (N) de cycle pyridazine de l'inhibiteur et la fonction amine (NH₂) du résidu ALA56 avec une distance de 1,79 Å.
- La deuxième est formée entre la fonction carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et l'oxygène (O) de groupement hydroxyle (OH) du résidu TRY98 avec une distance de 2.12 Å.
- Les deux dernières liaisons hydrogène font intervenir le deuxième oxygène (O) de groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur qui se lie aussi bien avec la fonction amine (NH₂) du résidu ASN369, qu'avec la fonction amine (NH₂) du résidu ARG84 (distance de 2.44 Å et de 1.91 Å respectivement).

De plus, de nombreuses interactions hydrophobes participent à la stabilité du complexe **M22-PfKMO**. Ces interactions font intervenir les 13 résidus : LEU55, ALA56, TYR98, LEU213, ILE215, ILE224, LEU226, PHE238, PRO318, PHE319, MET324, MET373 et TYR404 du site actif de l'enzyme.

Cependant, le composé **M22** ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique (BBB) pour atteindre sa cible bien qu'il présente un bon score. Raison pour laquelle, nous avons poursuivi nos investigations dans la recherche de nouveaux inhibiteurs aussi puissants tout en présentant un meilleur profil ADMET.

3.2.2 Les poly-substitutions

Le composé **M22** a subi une série de poly-substitution dans plusieurs positions qui sont R3, R4, et R5 (voir figure N°42) pour diminuer davantage son énergie d'interaction tout en améliorant son profil ADMET, particulièrement sa perméabilité au BBB. Dans cette optique, nous avons utilisé 14 nouveaux groupements (tableau N°9), lesquels sont introduits dans de nouvelles positions de la structure de départ (R3, R4 et R5). Il est à souligner que les groupements utilisés lors de la mono-substitution (figure N°29 et tableau N°8) ont été également utilisés lors de la poly-substitution. Ces derniers n'ont pas été représentés dans le tableau N°9 car leur introduction n'a pas donné de résultats satisfaisants.

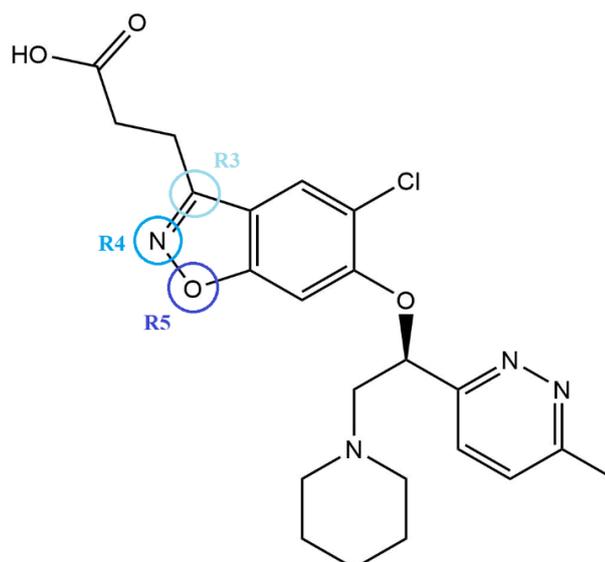


Figure 42 : Représentation des positions des radicaux R3, R4 et R5 dans la structure du composé **M22**.

Tableau N°9 : Les énergies d'interaction (scores) des 14 composés poly-substitués et leurs BBB perméabilité.

Composé poly-substitué	R3-R4-R5	Score (kcal/mol)	BBB perméabilité
P1	C=C-O	-12.63	Non
P2	C=N-C	-13.92	Non
P3	C=C-C	-14.20	Oui
P4	C=N-N	-13.49	Non
P5	C=C-N	-12.74	Non
P6	N-C-O	-13.18	Non
P7	N-N=C	-13.53	Non
P8	N-C=C	-13.50	Non
P9	N-N-O	-12.88	Non
P10	N-C=N	-12.96	Non
P11	C-O-C	-13.12	Non
P12	C-O-N	-12.18	Non
P13	N-O-C	-12.85	Non
P14	N-O-N	-13.11	Non

Parmi les 14 composés du tableau N°9, le composé **P3** se révèle comme meilleur inhibiteur de la KMO obtenu dans cette étude avec un score de -14.20 kcal/mol. Mieux encore, ce dernier est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique pour arriver au SNC où se trouve l'enzyme cible.

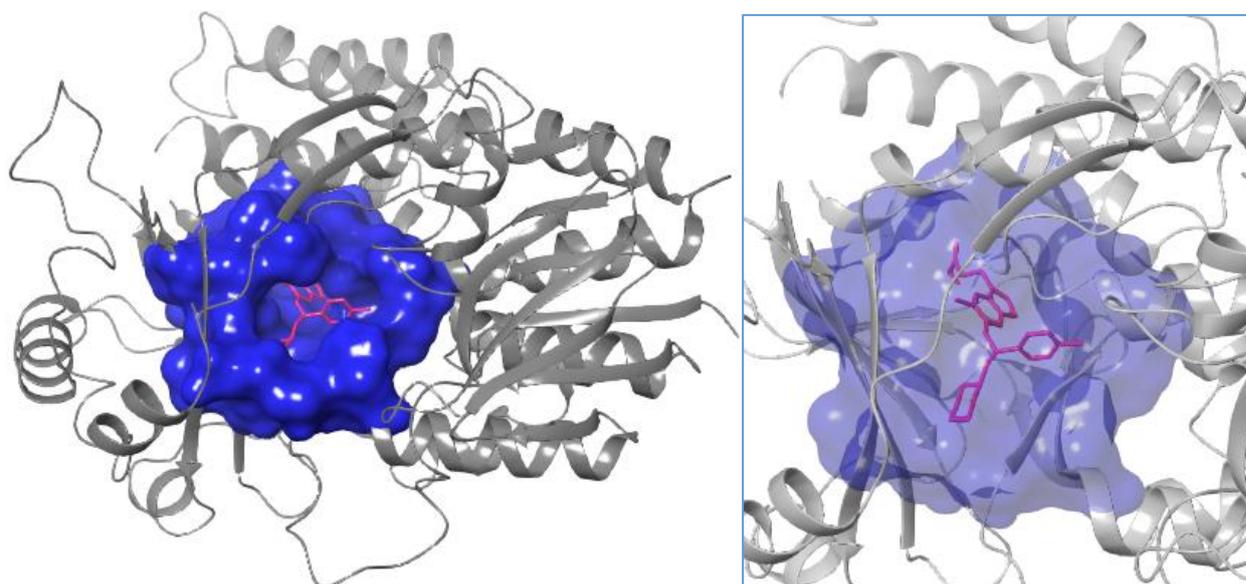


Figure 43 : Représentation par Maestro du positionnement du composé **P3** dans le site actif de la *PfKMO*.

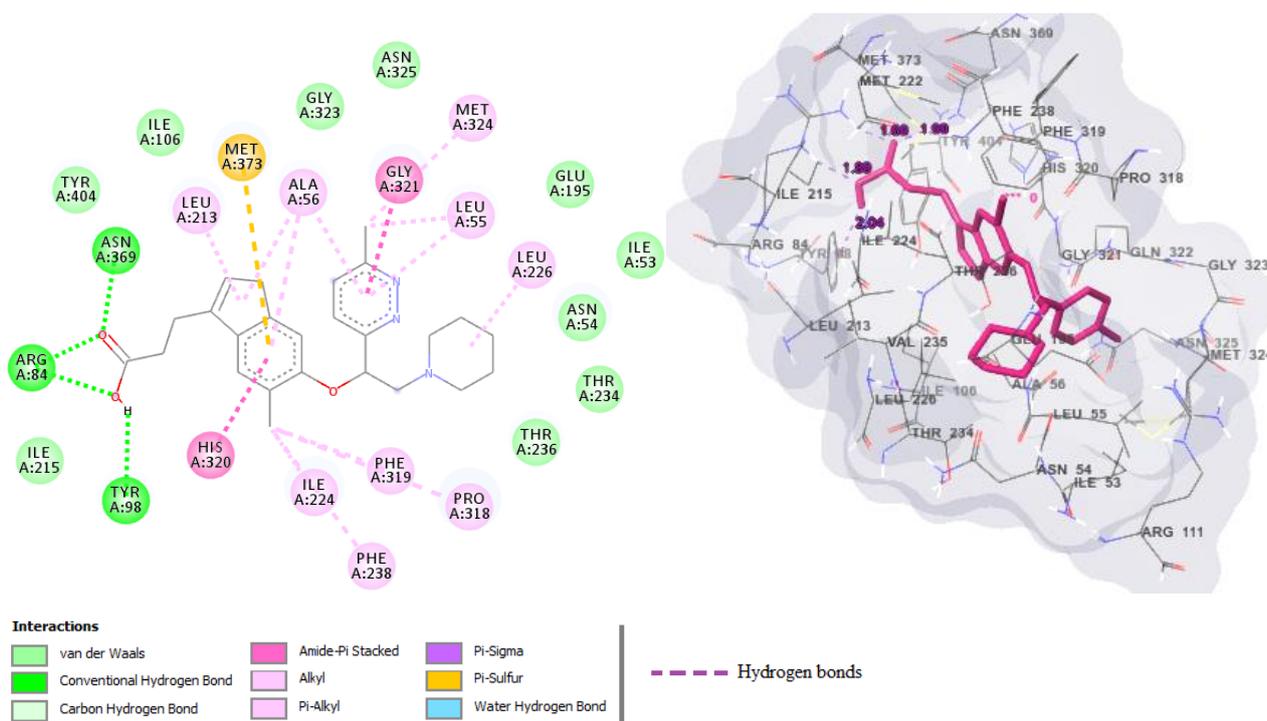


Figure 44 : Diagrammes des interactions entre le ligand **P3** et la *PfKMO*.

L'analyse visuelle montre que le composé **P3** inhibe le site actif de la *PfKMO* en faisant intervenir 4 liaisons hydrogène :

- La première est établie entre l'oxygène (O) de groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et la fonction amine secondaire (NH) du résidu ARG84 avec une distance de 1.89 Å.
- La deuxième est formée, quant à elle, entre la fonction carboxyle (COOH) de l'inhibiteur et l'oxygène (O) de groupement hydroxyle (OH) du résidu TRY98 avec une distance de 2.04 Å.
- Les deux dernières liaisons hydrogène font intervenir le deuxième oxygène (O) de groupement carboxyle (COOH) de l'inhibiteur qui se lie avec la fonction amine (NH₂) du résidu ASN369, ainsi qu'avec celle du résidu ARG84 avec des distances respectives de 1.99 Å et 1.69 Å.

Treize (13) interactions hydrophobiques interviennent pour stabiliser d'avantage ce complexe **P3-PfKMO** incluant les résidus : LEU55, ALA56, TYR98, LEU213, ILE215, ILE224, LEU226, PRO318, PHE319, MET324, PHE238, MET373 et TYR404 du site actif de l'enzyme.

Résidus clés dans le site actif de la *PfKMO*

La visualisation des interactions des nouveaux inhibiteurs proposés ainsi que ceux existants déjà montre que les acides aminés ARG84, TYR98, ASN369 jouent un rôle essentiel dans le site actif de la *PfKMO* car ils établissent des liaisons hydrogènes avec le composé **M22** (meilleur composé monosubstitué), aussi avec le composé **P3** (meilleur composé dans cette étude). L'importance également des résidus ALA56, LEU213, ILE215, ILE224, PRO318, PHE319, MET373 et TYR404 est à souligner car participent à la stabilisation des complexes enzyme-inhibiteur.

4. Les propriétés ADMET

En plus d'une puissante activité inhibitrice, il est essentiel qu'un bon candidat médicament ait un bon profil ADMET. Dans ce contexte et pour compléter notre étude, nous avons évalué certaines propriétés physicochimiques en appliquant la règle de Lipinski de 5 et celle de Veber. De plus, nous avons également déterminé certaines propriétés pharmacocinétiques, ainsi que la toxicité potentielle de nos meilleurs inhibiteurs. La **Donépézil** a été utilisée comme molécule de référence. Ce composé est l'un des traitements disponibles de la maladie d'Alzheimer en tant qu'inhibiteur de l'acétylcholinestérase [103]. À titre de rappel, il n'existe aucun médicament sur le marché ciblant notre enzyme, la Kynurénine 3-monooxygénase.

4.1 Propriétés physicochimiques

Les résultats obtenus à l'aide du serveur SwissADME dans le tableau N°10 révèlent que les composés **S185**, **M22**, **P3** et **Donépézil** respectent parfaitement les règles de Lipinski et Veber, ce qui indique que ces composés peuvent être administrés par voie orale sans poser de problèmes. Cependant, nous avons noté une faible solubilité de tous ces composés dans l'eau ce qui rend leurs solubilités dans le sang un peu difficile. Ce problème peut être résolu lors de l'optimisation de ces composés. Concernant l'accessibilité à la synthèse, ce critère a été évalué par un nombre allant de 1 à 10 où la difficulté de synthèse d'un composé est augmentée avec l'augmentation de sa valeur. Les résultats obtenus montrent que la synthèse chimique de tous les composés mentionnés dans le tableau semble être réalisable expérimentalement avec des valeurs inférieures à 5.

Tableau N°10 : Propriétés physicochimiques des composés **S185**, **M22**, **P3** et la **Donépézil** à partir de serveur SwissADME.

Propriétés	Donépézil	S185	M22	P3
Score	/	-12,06	-13.42	-14.20
Formule	C ₂₄ H ₂₉ NO ₃	C ₁₈ H ₁₈ CIN ₃ O ₄	C ₂₂ H ₂₅ CIN ₄ O ₄	C ₂₄ H ₂₈ CIN ₃ O ₃
PM (g/mol)	379.49	375.81	444.91	441.95
n.LF	6	7	8	8
n.ON	4	7	8	6
n.OHNH	0	1	1	1
Log P	4.00	3.09	2.74	3.43
TPSA Å ²	38.77	98.34	101.58	75.55
Règle de Lipinski	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme
Règle de Veber	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme	Parfaitement conforme
Solubilité dans l'eau	Peu soluble	Peu soluble	Peu soluble	Peu soluble
Accessibilité à la synthèse	3.62	3.82	4.17	4.30

PM = poids moléculaire. **n.ON** = nombre d'accepteur d'hydrogène. **n.OHNH** = nombre de donneur d'hydrogène. **n.LF** = nombre de liaison flexible. **LogP** = logarithme du coefficient de partage eau/octanol. **TPSA** = surface polaire topologique.

4.2 Propriétés pharmacocinétiques

Une analyse des propriétés pharmacocinétiques a été effectuée en utilisant le serveur SwissADME afin d'aller vers le composé ayant le plus de chance d'être un candidat médicament. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau N°11.

Tableau N°11 : Propriétés pharmacocinétiques des composés **S185**, **M22**, **P3** et la **Donépézil** à partir de serveur SwissADME.

Propriétés	Donépézil	S185	M22	P3
GI absorption	Élevée	Élevée	Élevée	Élevée
BBB perméabilité	Oui	Non	Non	Oui
CYP1A2 inhibition	Non	Oui	Oui	Non
CYP2C19 inhibition	Non	Oui	Oui	Non
CYP2C9 inhibition	Non	Oui	Non	Non
CYP2D6 inhibition	Oui	Non	Oui	Oui
CYP3A4 inhibition	Oui	Oui	Oui	Oui

GI = Gastro Intestinal. **BBB** = Blood Brain Barrier. **CYP** = famille de Cytochrome P450.

Comme le montre le tableau N°11, la **Donépézil**, ainsi que les composés **S185**, **M22** et **P3**, ont présenté une absorption gastro-intestinale élevée. Autrement dit, ces composés peuvent traverser la barrière gastro-intestinale pour atteindre la circulation sanguine. La **Donépézil** et le composé **P3** présentent une capacité élevée à franchir la barrière hémato-encéphalique contrairement aux composés **S185** et **M22**. Ce critère est très important dans notre cas car la cible se trouve dans le système nerveux central. Concernant l'inhibition des différentes isoformes du cytochrome P450, les résultats montrent que la **Donépézil** et le composé **P3** ont un effet inhibiteur potentiel envers seulement 2 parmi les 5 isoformes du cytochrome P450 et pour les deux autres composés (**S185** et **M22**) contrairement aux composés **S185** et **M22** qui inhibent 4 parmi les 5 isoformes de CYP. L'inhibition de ces enzymes est une source importante d'interactions médicamenteuses indésirables car des changements dans leurs activités enzymatiques peuvent affecter le métabolisme des médicaments.

4.3 Tests de toxicité

Le serveur PreADMET a été utilisé pour simuler la toxicité potentielle des composés d'intérêts. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°12.

Il s'avère que tous les composés ainsi que la **Donépézil** ont un effet mutagène potentiel qui se traduit par leur possibilité à induire des changements dans le matériel génétique. Cependant, il a été prédit que tous ces composés n'ont aucun effet cancérigène sur les souris ou les rats. Nous avons également noté un risque moyen d'inhibition du gène hERG par le composé **P3** et la **Donépézil**, contre un faible risque par les composés **S185** et **M22**. L'inhibition de ce gène provoque des problèmes cardiaques associés au rythme cardiaque. De plus, les résultats obtenus des tests de toxicité aiguë sur les différentes espèces aquatiques étaient prometteurs pour tous les composés, en particulier pour le composé **P3**, qui a obtenu des valeurs nettement inférieures à celles observées pour tous les composés y compris la **Donépézil** ce qui suggère que la toxicité aiguë de ce composé est relativement faible.

Tableau N°12 : Résultats des tests *in silico* de toxicité des composés **S185**, **M22**, **P3** et la **Donépézil** à partir de serveur PreADMET.

Paramètre	Donépézil	S185	M22	P3
Test d'Ames	mutagène	mutagène	mutagène	mutagène
Cancérogénicité pour les souris	négative	négative	négative	négative
Cancérogénicité pour les rats	négative	négative	négative	négative
hERG inhibition	Risque médium	Risque faible	Risque faible	Risque médium
Algae-at	0.0104476	0.0159016	0.0100469	0.00602444
Daphnia-at	0.0239157	0.0365653	0.019723	0.0101264
Medaka-at	0.0011081	0.00283516	0.000947906	0.000247143
Minnow-at	0.00212956	0.00201793	0.00143914	0.00064731

En conclusion, le composé **P3** a présenté un profil ADMET favorable pour une application biologique ce qui ouvre la voie à son optimisation et développement, en tant que candidat médicament.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

L'objectif principal de notre travail était de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs par docking moléculaire avec AutoDock de la cible thérapeutique Kynurénine 3-monooxygénase.

Tout d'abord, nous avons jugé utile d'évaluer la fiabilité du programme AutoDock par le biais de trois tests différents. Le premier test consiste à calculer l'écart quadratique moyen ou le RMSD qui permet d'évaluer la déviation de la pose du ligand simulée par AutoDock vis-à-vis de celle déterminée expérimentalement. Parmi les 100 complexes protéines-ligands tirés arbitrairement de la PDB, 82 complexes ont présenté de faibles valeurs de RMSD parfaitement dans les normes, c'est-à-dire, inférieur à 2 Å. Une analyse visuelle a été réalisée sur quatre complexes issus de la PDB portant les codes suivants : **5NAB**, **6FP1**, **5NAE** et **6FPH** a montré que le modèle des ligands simulé par AutoDock se superpose avec celui Co-cristallisé. Un dernier test a permis d'évaluer le degré de corrélation existant entre les énergies d'interaction (ΔG) des 107 inhibiteurs de la KMO (issus de la littérature) simulés avec AutoDock et les valeurs expérimentales de leurs IC_{50} . Avec un coefficient de corrélation égal à 0.70, le programme AutoDock est suffisamment fiable et peut être utilisé sans grands risques d'erreurs, pour simuler les interactions des complexes *Pf*KMO-Inhibiteur étudiés.

Parmi les 107 inhibiteurs de la KMO étudiés, le composé **C45** a été prédit d'avoir la meilleure activité inhibitrice à l'égard de la KMO avec une énergie d'interaction de -10.87 kcal/mol. Cependant, ce composé a été prédit d'être incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique. Afin d'améliorer aussi bien son affinité envers la cible que ses propriétés ADMET, nous avons réalisé un criblage virtuel d'une collection de similaires chimiques du composé **C45** issus de la *PubChem*. Ce criblage fait ressortir le composé **S185** comme meilleur inhibiteur de la *Pf*KMO (énergie d'interaction = -12.06 kcal/mol) parmi les 352 composés criblés. À l'instar du composé **C45**, le composé **S185** est incapable de franchir la barrière hémato-encéphalique.

Par la suite, une série de substitutions structurales a été menée sur le composé **S185** en vue d'améliorer davantage aussi bien son affinité à l'égard de la cible que ses propriétés ADMET. Parmi les 62 composés testés, le composé **P3** se présente comme nouvel inhibiteur de la KMO avec une énergie d'interaction de -14.20 kcal/mol. Mieux encore, l'étude prédictive de ses propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité potentielle nous renseigne de manière positive sur le profil ADMET du composé **P3** particulièrement sa bonne capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique pour atteindre son lieu d'action.

En termes de perspectives d'avenir et afin d'approfondir notre recherche, une étude expérimentale complémentaire *in vitro* et/ou *in vivo* est nécessaire pour vérifier et confirmer les résultats théoriques obtenus *in silico* au cours de notre travail.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- [1] A. Grosdidier, « Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives », Thèse de doctorat en Pharmacie : Université Joseph Fourier, France., 2007.
- [2] A. Sethi, K. Joshi, K. Sasikala, et M. Alvala, « Molecular Docking in Modern Drug Discovery: Principles and Recent Applications », *Drug Discovery and Development - New Advances*, 2020, doi: 10.5772/intechopen.85991.
- [3] A. M. Dar et S. Mir, « Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges », *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, vol. 8, n° 2, 2017, doi: 10.4172/2155-9872.1000356.
- [4] G. M. Morris *et al.*, « Software News and Updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility », *Journal of Computational Chemistry*, vol. 30, n° 16, p. 2785-2791, 2009, doi: 10.1002/jcc.21256.
- [5] J. R. Smith, J. F. Jamie, et G. J. Guillemin, « Kynurenine-3-monooxygenase: A review of structure, mechanism, and inhibitors », *Drug Discovery Today*, vol. 21, n° 2, p. 315-324, 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2015.11.001.
- [6] R. S. Phillips, E. C. Iradukunda, T. Hughes, et J. Phillip Bowen, « Modulation of enzyme activity in the kynurenine pathway by kynurenine monooxygenase inhibition », *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 6, 2019, doi: 10.3389/fmolb.2019.00003.
- [7] M. R. D. Taylor, « High-Resolution Structural Studies of Kynurenine 3-Monooxygenase », Thèse de doctorat en Chimie : Université de Edinburgh, Royaume-Uni., 2017.
- [8] S. A. Amin, N. Adhikari, T. Jha, et S. Gayen, « First molecular modeling report on novel arylpyrimidine kynurenine monooxygenase inhibitors through multi-QSAR analysis against Huntington's disease: A proposal to chemists! », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 26, n° 23, p. 5712-5718, 2016, doi: 10.1016/j.bmcl.2016.10.058.
- [9] V. Beaumont *et al.*, « The novel KMO inhibitor CHDI-340246 leads to a restoration of electrophysiological alterations in mouse models of Huntington's disease », *Experimental Neurology*, vol. 282, p. 99-118, 2016, doi: 10.1016/j.expneurol.2016.05.005.
- [10] L. M. Toledo-Sherman *et al.*, « Development of a series of aryl pyrimidine kynurenine monooxygenase inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of Huntingtons disease », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 58, n° 3, p. 1159-1183, 2015, doi: 10.1021/jm501350y.
- [11] M. Citron, « Alzheimer's disease: Strategies for disease modification », *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, n° 5, p. 387-398, 2010, doi: 10.1038/nrd2896.
- [12] K. H. Chang, M. L. Cheng, H. Y. Tang, C. Y. Huang, Y. R. Wu, et C. M. Chen, « Alternations of Metabolic Profile and Kynurenine Metabolism in the Plasma of Parkinson's Disease », *Molecular Neurobiology*, vol. 55, n° 8, p. 6319-6328, 2018, doi: 10.1007/s12035-017-0845-3.
- [13] D. J. Mole *et al.*, « Kynurenine-3-monooxygenase inhibition prevents multiple organ failure in

- rodent models of acute pancreatitis », *Nature Medicine*, vol. 22, p. 202-209, 2016, doi: 10.1038/nm.4020.
- [14] A. L. Walker *et al.*, « Development of a Series of Kynurenine 3-Monooxygenase Inhibitors Leading to a Clinical Candidate for the Treatment of Acute Pancreatitis », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 60, n° 8, p. 3383-3404, 2017, doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00055.
- [15] J. Liddle *et al.*, « The discovery of potent and selective kynurenine 3-monooxygenase inhibitors for the treatment of acute pancreatitis », *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 27, n° 9, p. 2023-2028, 2017, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.02.078.
- [16] J. P. Hutchinson *et al.*, « Structural and mechanistic basis of differentiated inhibitors of the acute pancreatitis target kynurenine-3-monooxygenase », *Nature Communications*, vol. 8, 2017, doi: 10.1038/ncomms15827.
- [17] M. Favennec, « Etude de la voie des kynurénines dans l'obésité humaine », Thèse de doctorat en Physiologie : Université du Droit et de la Santé -Lille II, France., 2015.
- [18] J. Savitz, « The kynurenine pathway: a finger in every pie », *Molecular Psychiatry*, vol. 25, n° 1, p. 131-147, 2019, doi: 10.1038/s41380-019-0414-4.
- [19] Y. Lu, M. Shao, et T. Wu, « Kynurenine-3-monooxygenase: A new direction for the treatment in different diseases », *Food Science and Nutrition*, vol. 8, p. 711-719, 2020, doi: 10.1002/fsn3.1418.
- [20] H. B. Bell, « Characterisation of the Active Site of Kynurenine 3-Monooxygenase », Thèse de doctorat en Chimie : Université de Edinburgh, Royaume-Uni., 2016.
- [21] B. J. Kim, S. H. Lee, et J. M. Koh, « Clinical insights into the kynurenine pathway in age-related diseases », *Experimental Gerontology*, vol. 130, p. 110793, 2019, doi: 10.1016/j.exger.2019.110793.
- [22] J. Clària *et al.*, « Orchestration of Tryptophan-Kynurenine Pathway, Acute Decompensation, and Acute-on-Chronic Liver Failure in Cirrhosis », *Hepatology*, vol. 69, n° 4, p. 1686-1701, 2019, doi: 10.1002/hep.30363.
- [23] V. X. Tan et G. J. Guillemin, « Kynurenine Pathway Metabolites as Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis », *Frontiers in Neuroscience*, vol. 13, p. 1013, 2019, doi: 10.3389/fnins.2019.01013.
- [24] R. Schwarcz et T. W. Stone, « The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises », *Neuropharmacology*, vol. 112, n° B, p. 237-247, 2016, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.003.
- [25] G. Castellano-Gonzalez *et al.*, « Kynurenine 3-Monooxygenase Activity in Human Primary Neurons and Effect on Cellular Bioenergetics Identifies New Neurotoxic Mechanisms », *Neurotoxicity Research*, vol. 35, n° 3, p. 530-541, 2019, doi: 10.1007/s12640-019-9997-4.
- [26] K. V. Sathyaikumar, C. Breda, R. Schwarcz, et G. Flaviano, « Assessing and Modulating Kynurenine Pathway Dynamics in Huntington's Disease: Focus on Kynurenine 3-Monooxygenase », *Methods in Molecular Biology*, vol. 1780, p. 397-413, 2018, doi: 10.1007/978-1-4939-7825-0_18.

- [27] M. Wilkinson, « Structural Dynamics and Ligand Binding in Kynurenine-3- monooxygenase », Thèse de doctorat en Chimie : Université de Edinburgh, Royaume-Uni., 2013.
- [28] H. T. Kim *et al.*, « Structural Basis for Inhibitor-Induced Hydrogen Peroxide Production by Kynurenine 3-Monooxygenase », *Cell Chemical Biology*, vol. 25, n° 4, p. 426-438.e4, 2018, doi: 10.1016/j.chembiol.2018.01.008.
- [29] M. Amaral *et al.*, « Structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition », *Nature*, vol. 496, n° 7445, p. 382-385, 2013, doi: 10.1038/nature12039.
- [30] K. R. Crozier et G. R. Moran, « Heterologous expression and purification of kynurenine-3-monooxygenase from *Pseudomonas fluorescens* strain 17400 », *Protein Expression and Purification*, vol. 51, n° 2, p. 324-333, 2007, doi: 10.1016/j.pep.2006.07.024.
- [31] A. M. O. Swaih, « Functional and Localization Studies of Human Kynurenine », Thèse de doctorat : Université de Leicester, Royaume-Uni., 2016.
- [32] G. Milne, « Inhibition Studies of Kynurenine 3-Monooxygenase », Thèse de doctorat en chimie : Université de St. Andrews, Royaume-Uni., 2013.
- [33] E. Wirthgen, A. Hoeflich, A. Rebl, et J. Günther, « Kynurenic Acid: The Janus-faced role of an immunomodulatory tryptophan metabolite and its link to pathological conditions », *Frontiers in Immunology*, vol. 8, p. 1957, 2018, doi: 10.3389/fimmu.2017.01957.
- [34] O. S. Khalil, « Effects on brain development of prenatal inhibition of kynurenine-3-monooxygenase », Thèse de doctorat : Université de Glasgow, Royaume-Uni., 2014.
- [35] J. M. Lee *et al.*, « Involvement of quinolinic acid in the neuropathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis », *Neuropharmacology*, vol. 112, n° Pt B, p. 346-364, 2016, doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.05.011.
- [36] I. Wonodi *et al.*, « Downregulated kynurenine 3-monooxygenase gene expression and enzyme activity in schizophrenia and genetic association with schizophrenia endophenotypes », *Archives of General Psychiatry*, vol. 68, n° 7, p. 665-674, 2011, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.71.
- [37] Y. Wang, X. Yuan, Y. Kang, et X. Song, « Tryptophan-kynurenine pathway as a novel link between gut microbiota and schizophrenia: A review », *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 18, n° 4, p. 897-905, 2018, doi: 10.4314/tjpr.v18i4.30.
- [38] E. Rojewska, A. Piotrowska, W. Makuch, B. Przewlocka, et J. Mika, « Pharmacological kynurenine 3-monooxygenase enzyme inhibition significantly reduces neuropathic pain in a rat model », *Neuropharmacology*, vol. 102, p. 80-91, 2016, doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.040.
- [39] H. Kubo *et al.*, « Absence of kynurenine 3-monooxygenase reduces mortality of acute viral myocarditis in mice », *Immunology Letters*, vol. 181, p. 94-100, 2016, doi: 10.1016/j.imlet.2016.11.012.
- [40] X. Zheng *et al.*, « Kynurenine 3-monooxygenase is a critical regulator of renal ischemia–reperfusion injury », *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 51, p. 1-14, 2019, doi: 10.1038/s12276-019-0210-x.

- [41] H. Jin *et al.*, « Prognostic significance of kynurenine 3-monooxygenase and effects on proliferation, migration, and invasion of human hepatocellular carcinoma », *Scientific Reports*, vol. 5, 2015, doi: 10.1038/srep10466.
- [42] T. T. Huang *et al.*, « Kynurenine 3-monooxygenase upregulates pluripotent genes through β -catenin and promotes triple-negative breast cancer progression », *EBioMedicine*, vol. 54, p. 102717, 2020, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102717.
- [43] H. A. Aziz, A. S. G. Abdel-Salam, M. A. I. Al-Obaide, H. W. Alobydi, et S. Al-Humaiish, « Kynurenine 3-Monooxygenase gene associated with Nicotine initiation and addiction: Analysis of novel regulatory features at 5' and 3'-Regions », *Frontiers in Genetics*, vol. 9, 2018, doi: 10.3389/fgene.2018.00198.
- [44] K. R. Jacobs, G. Castellano-Gonzalez, G. J. Guillemin, et D. B. Lovejoy, « Major Developments in the Design of Inhibitors along the Kynurenine Pathway », *Current Medicinal Chemistry*, vol. 24, n° 23, p. 2471-2495, 2017, doi: 10.2174/0929867324666170502123114.
- [45] F. Martz, « Développement d'une nouvelle méthode de docking basée sur les mécanismes enzymatiques et guidée par des groupes prosthétiques », Thèse de doctorat en Chimie : Université Paris Sud, France., 2014.
- [46] A. Tripathi et K. Misra, « Molecular Docking: A Structure-Based Drug Designing Approach », *JSM Bioinformatics, Genomics and Proteomics*, vol. 2, n° 1, p. 1015, 2017.
- [47] GlaxoSmithKline, « Découvrir de nouveaux médicaments », 2020. <https://fr.gsk.com/fr-fr/recherche/découvrir-de-nouveaux-médicaments/> (consulté le mars 28, 2020).
- [48] F. Louacheni, « Développement d'un portail web pour le criblage virtuel sur la grille de calcul », Mémoire de Master en Informatique : Institut de la Francophonie pour l'Informatique, Vietnam., 2014.
- [49] M. N. Drwal et R. Griffith, « Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening », *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 10, n° 3, p. e395-e401, 2013, doi: 10.1016/j.ddtec.2013.02.002.
- [50] R. Dias et W. F. J. de Azevedo, « Molecular Docking Algorithms », *Current Drug Targets*, vol. 9, n° 12, p. 1040-1047, 2008, doi: 10.2174/138945008786949432.
- [51] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, et M. Cui, « Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery », *Current Computer Aided-Drug Design*, vol. 7, n° 2, p. 146-157, 2012, doi: 10.2174/157340911795677602.
- [52] A. Tripathi et V. A. Bankaitis, « Molecular Docking: From Lock and Key to Combination Lock », *Journal of Molecular Medicine and Clinical Applications*, vol. 2, n° 1, 2017, doi: 10.16966/2575-0305.106.
- [53] S. Agarwal et M. Ranjana, « An overview of Molecular Docking », *JSM Chemistry*, vol. 4, n° 2, p. 1024, 2016.
- [54] E. H. Mokrani, « Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique », Mémoire de Magister en Biochimie : Université des Frères Mentouri Constantine-1, Algérie., 2012.

- [55] BioAI | Medium, « Molecular Docking », 2019. <https://medium.com/bioai/molecular-docking-c0bb7b0449db> (consulté le mars 28, 2020).
- [56] H. M. Berman *et al.*, « The protein data bank », *Nucleic Acids Research*, vol. 28, n° 1, p. 235-242, 2000, doi: 10.1093/nar/28.1.235.
- [57] S. K. Burley *et al.*, « Protein Data Bank: The single global archive for 3D macromolecular structure data », *Nucleic Acids Research*, vol. 47, 2018, doi: 10.1093/nar/gky949.
- [58] PDB, « Protein Data Bank », 2020. <https://www.rcsb.org/> (consulté le avr. 28, 2020).
- [59] Y. C. Chen, « Beware of docking! », *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 36, n° 2, p. 78-95, 2015, doi: 10.1016/j.tips.2014.12.001.
- [60] M. Wais Hosseini | Université Louis Pasteur, « Introduction à la chimie supramoléculaire », 2011. <http://lcco.u-strasbg.fr/wp-content/uploads/2011/09/Cours-Supramol-copie.pdf> (consulté le mars 29, 2020).
- [61] K. Roy, S. Kar, et R. N. Das, *Background of QSAR and Historical Developments*. 2015.
- [62] The Scripps Research Institute, « AutoDock 4.2.6 », 2013. <http://autodock.scripps.edu/> (consulté le mai 12, 2020).
- [63] Université de l'Illinois à Urbana-Champaign, « Visual Molecular Dynamics 1.9.3 », 2020. <https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/> (consulté le mai 12, 2020).
- [64] Schrödinger, « Maestro 11.8 », 2020. <https://www.schrodinger.com/maestro> (consulté le mai 12, 2020).
- [65] BIOVIA, « Discovery Studio Visualizer ». <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download> (consulté le mai 12, 2020).
- [66] PerkinElmer, « ChemDraw 16.0 », 2020. <https://www.perkinelmer.com/fr/category/chemdraw> (consulté le mai 12, 2020).
- [67] « Open Babel 3.0.0 », 2020. http://openbabel.org/wiki/Main_Page (consulté le mai 12, 2020).
- [68] Microsoft, « Excel 2019 », 2019. <https://www.microsoft.com/fr-fr/microsoft-365/excel> (consulté le mai 12, 2020).
- [69] Swiss Institute of Bioinformatics, « SwissADME », 2020. <http://www.swissadme.ch/index.php> (consulté le mai 20, 2020).
- [70] Université de Yonsei, « PreADMET », 2020. <https://preadmet.bmdrc.kr/> (consulté le mai 20, 2020).
- [71] National Library of Medicine, « PubChem », 2020. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (consulté le mai 12, 2020).
- [72] E. Lopez-Camacho, M. J. Garcia-Godoy, J. Garcia-Nieto, A. J. Nebro, et J. F. Aldana-Montes, « A New Multi-objective Approach for Molecular Docking Based on RMSD and Binding Energy », *Algorithms for Computational Biology*, p. 65-77, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-38827-4 6.

- [73] P. Schober et L. A. Schwarte, « Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation », *Anesthesia and Analgesia*, vol. 126, n° 5, p. 1763-1768, 2018, doi: 10.1213/ANE.0000000000002864.
- [74] C. A. Lipinski, O. Franc0 I, B. W. Dominy, et P. J. Feeney, « Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings », *Advanced Drug Delivery Reviews* 23, vol. 46, n° 1-3, p. 3-26, 1997, doi: 10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
- [75] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, et K. D. Kopple, « Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 45, n° 12, p. 2615-2623, 2002, doi: 10.1021/jm020017n.
- [76] C. A. S. Bergström et P. Larsson, « Computational prediction of drug solubility in water-based systems: Qualitative and quantitative approaches used in the current drug discovery and development setting », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 540, n° 1-2, p. 185-193, 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.044.
- [77] Y. Fukunishi, T. Kurosawa, Y. Mikami, et H. Nakamura, « Prediction of synthetic accessibility based on commercially available compound databases », *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 54, n° 12, p. 3259-3267, 2014, doi: 10.1021/ci500568d.
- [78] D. Dahlgren et H. Lennernäs, « Intestinal permeability and drug absorption: predictive experimental, computational and in vivo approaches », *Pharmaceutics*, vol. 11, n° 8, p. 411, 2019, doi: 10.3390/pharmaceutics11080411.
- [79] W. Akik, « Étude de la perméabilité intestinale des médicaments par la reconstitution du transporteur BCRP / ABCG2 dans des protéoliposomes », Mémoire de Master en Sciences Pharmaceutiques : Université de Montréal, Canada., 2017.
- [80] Z. Gao, Y. Chen, X. Cai, R. Xu, et C. Sahinalp, « Predict drug permeability to blood-brain-barrier from clinical phenotypes: Drug side effects and drug indications », *Bioinformatics*, vol. 33, n° 6, p. 901-908, 2017, doi: 10.1093/bioinformatics/btw713.
- [81] A. Mathis, « Le rôle des cytochromes P450 dans les interactions médicamenteuses et environnementales rencontrées à l'officine », Thèse de doctorat en Pharmacie : Université de lorraine, France., 2012.
- [82] D. K. Badyal et A. P. Dadhich, « Cytochrome P450 and drug interactions », *Indian Journal of Pharmacology*, vol. 33, n° 4, p. 248-259, 2001.
- [83] D. O. Nettleton et H. J. Einolf, « Assessment of Cytochrome P450 Enzyme Inhibition and Inactivation in Drug Discovery and Development », *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 11, n° 4, p. 382-403, 2011, doi: 10.2174/156802611794480882.
- [84] D. D. Levy *et al.*, « Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test) », *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 848, 2019, doi: 10.1016/j.mrgentox.2019.07.004.
- [85] G. Goodman et R. Wilson, « Predicting the carcinogenicity of chemicals in humans from rodent bioassay data », *Environmental Health Perspectives*, vol. 94, p. 195-218, 1991, doi: 10.2307/3431313.

- [86] D. E. Johnson, « Estimating Human Cancer Risk from Rodent Carcinogenicity Studies: The Changing Paradigm for Pharmaceuticals », *Journal of Drug Metabolism & Toxicology*, vol. 3, n° 6, 2012, doi: 10.4172/2157-7609.1000e114.
- [87] H. M. Lee *et al.*, « Computational determination of hERG-related cardiotoxicity of drug candidates », *BMC Bioinformatics*, vol. 20, n° Suppl 10, 2019, doi: 10.1186/s12859-019-2814-5.
- [88] N. Nyholm et T. Kalqvist, « Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater Algae », *Environmental Toxicology*, vol. 8, n° 8, p. 689-703, 1989, doi: 10.1002/etc.5620080807.
- [89] M. T. Palumbo et M. Mingazzini, « Toxicity Test With Algae: Evaluation of the Sensitivity Related To the Use of Biomass Versus Growth Rate Endpoint », *16th International MESAEP Symposium on Environmental Pollution*, 2011.
- [90] D. M. M. Adema, « Daphnia magna as a test animal in acute and chronic toxicity tests », *Hydrobiologia*, vol. 59, p. 125-134, 1978, doi: 10.1007/BF00020773.
- [91] G. T. Ankley et D. L. Villeneuve, « The fathead minnow in aquatic toxicology: Past, present and future », *Aquatic Toxicology*, vol. 78, n° 1, p. 91-102, 2006, doi: 10.1016/j.aquatox.2006.01.018.
- [92] S. Padilla *et al.*, *Use of Medaka in toxicity testing*, n° Suppl 39. 2009.
- [93] A. Chikhi et A. Bensegueni, « Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Freeware », *Journal of Computer Science & Systems Biology*, vol. 1, n° 1, p. 81-86, 2008, doi: 10.4172/jcsb.1000007.
- [94] H. A. Gabb, R. M. Jackson, et M. J. E. Sternberg, « Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information », *Journal of Molecular Biology*, vol. 272, n° 1, p. 106-120, 1997, doi: 10.1006/jmbi.1997.1203.
- [95] S. Zhang *et al.*, « A brain-permeable inhibitor of the neurodegenerative disease target kynurenine 3-monooxygenase prevents accumulation of neurotoxic metabolites », *Communications Biology*, vol. 2, 2019, doi: 10.1038/s42003-019-0520-5.
- [96] R. Pellicciari *et al.*, « Modulation of the Kynurenine Pathway in Search for New Neuroprotective Agents. Synthesis and Preliminary Evaluation of (m-Nitrobenzoyl)alanine, a Potent Inhibitor of Kynurenine-3-hydroxylase », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 37, n° 5, p. 647-655, 1994, doi: 10.1021/jm00031a015.
- [97] C. Speciale, H. Q. Wu, M. Cini, M. Marconi, M. Varasi, et R. Schwarcz, « (R,S)-3,4-dichlorobenzoylalanine (FCE 28833A) causes a large and persistent increase in brain kynurenic acid levels in rats », *European Journal of Pharmacology*, vol. 315, n° 3, p. 263-267, 1996, doi: 10.1016/S0014-2999(96)00613-9.
- [98] R. Carpenedo *et al.*, « Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities », *Neuroscience*, vol. 61, n° 2, p. 237-244, 1994, doi: 10.1016/0306-4522(94)90227-5.
- [99] S. Shave, K. McGuire, N. T. Pham, D. J. Mole, S. P. Webster, et M. Auer, « Diclofenac Identified as a Kynurenine 3-Monooxygenase Binder and Inhibitor by Molecular Similarity

- Techniques », *ACS Omega*, vol. 3, n° 3, p. 2564-2568, 2018, doi: 10.1021/acsomega.7b02091.
- [100] D. M. Lowe *et al.*, « Lead discovery for human kynurenine 3-monooxygenase by high-throughput RapidFire mass spectrometry », *Journal of Biomolecular Screening*, vol. 19, n° 4, p. 508-515, 2014, doi: 10.1177/1087057113518069.
- [101] S. Röver, A. M. Cesura, P. Huguenin, R. Kettler, et A. Szente, « Synthesis and biochemical evaluation of N-(4-phenylthiazol-2-yl)benzenesulfonamides as high-affinity inhibitors of kynurenine 3-hydroxylase », *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 40, n° 26, p. 4378-4385, 1997, doi: 10.1021/jm970467t.
- [102] J. F. Reinhard, « Pharmacological manipulation of brain kynurenine metabolism », *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1035, p. 335-349, 2004, doi: 10.1196/annals.1332.020.
- [103] R. Cacabelos, « Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics », *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, vol. 3, n° 3, p. 303-333, 2007.



ANNEXES



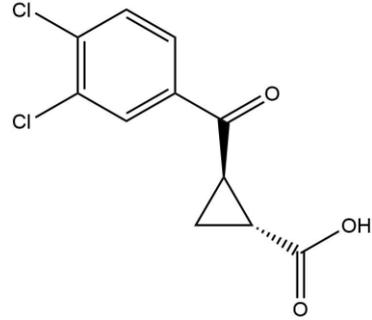
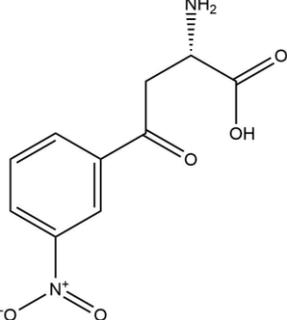
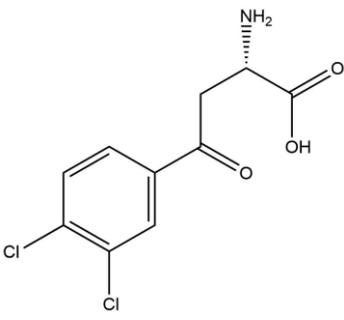
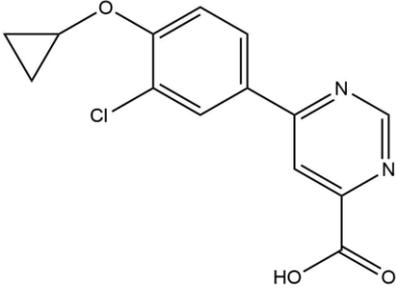
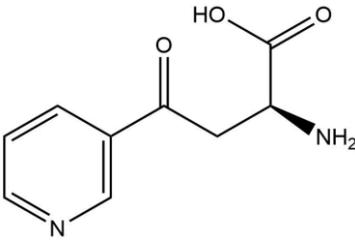
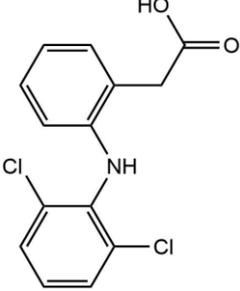
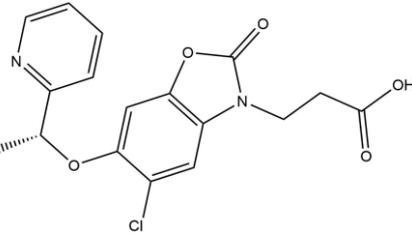
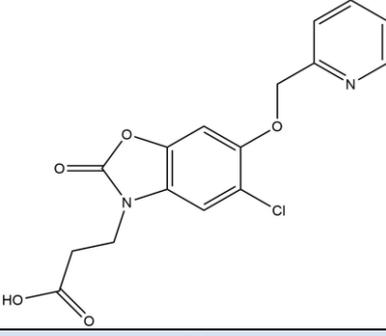
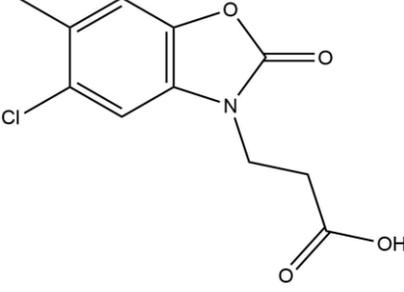
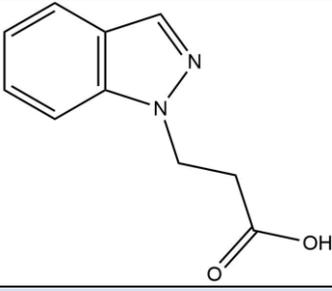
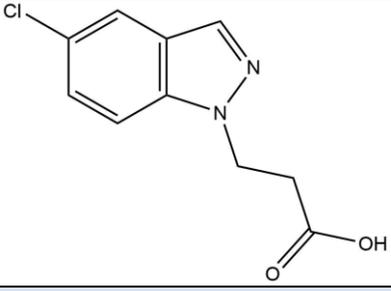
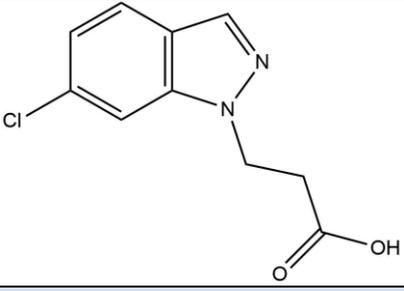
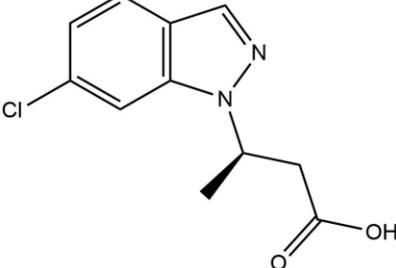
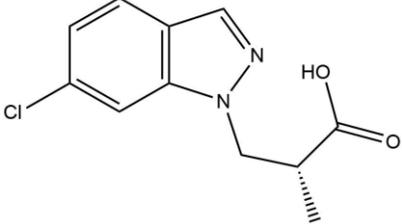
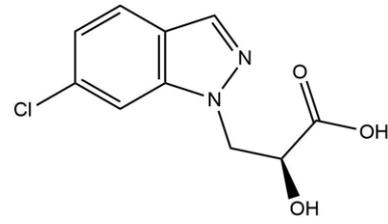
Annexe N°1 : Les valeurs de RMSD de 100 complexes étudiés.

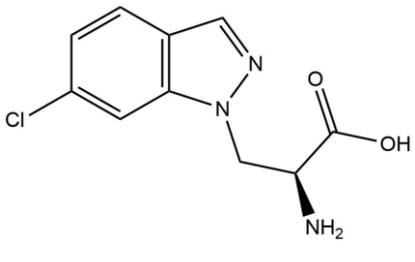
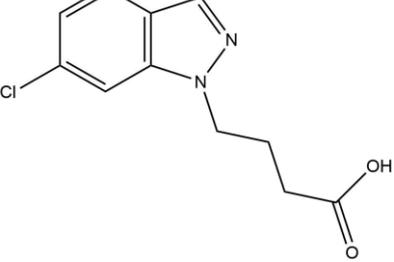
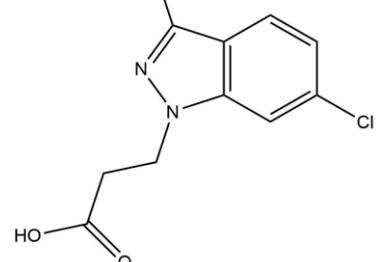
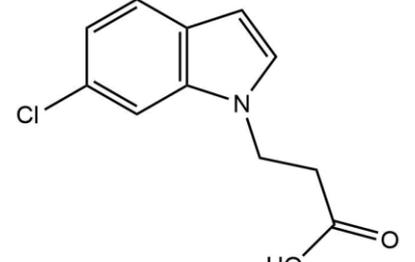
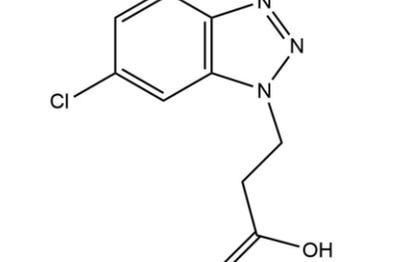
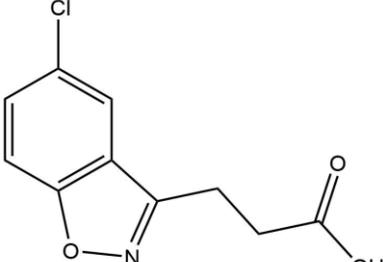
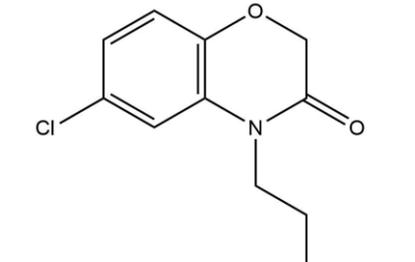
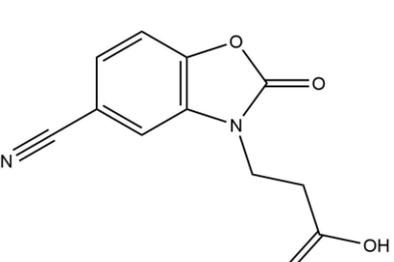
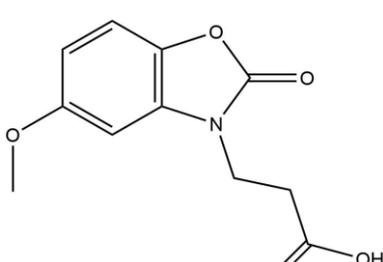
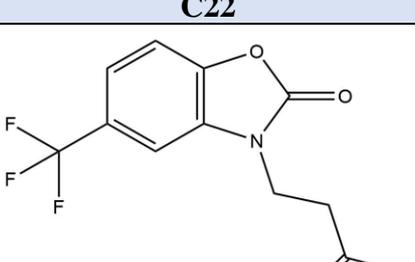
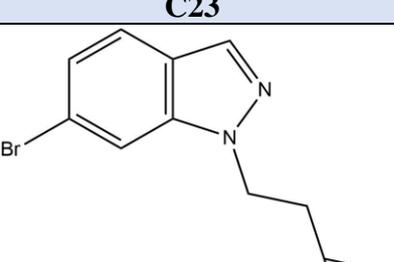
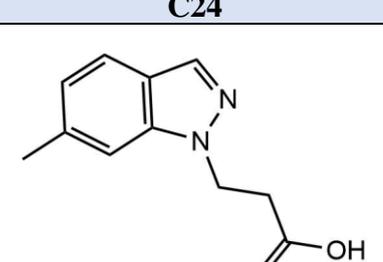
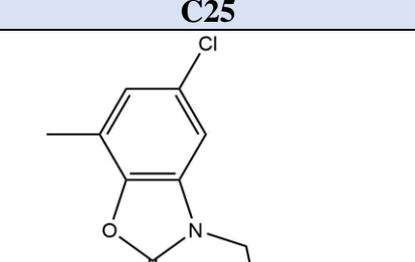
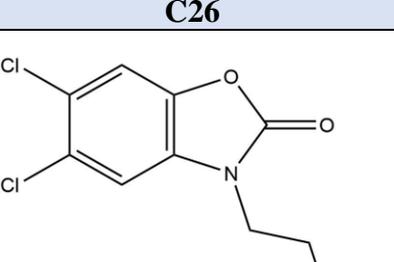
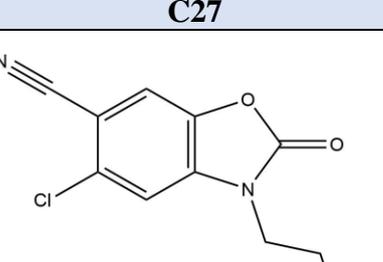
N°	Code PDB	Code des ligands	RMSD (A°)
1	1DOJ	1Z0	2.18
2	1GYM	MYG	1.83
3	1H3C	R79	1.22
4	1YDT	IQB	1.00
5	1Z89	62P	0.51
6	2F6T	1C2	0.58
7	2H5A	X1P	0.63
8	2Q8I	RDC	0.47
9	2RJP	886	0.85
10	2V5Z	SAG	1.83
11	2V60	C17	1.07
12	2V61	C18	1.14
13	3BJC	WAN	2.68
14	3CTT	3CU	0.68
15	3DBS	GD9	0.65
16	3E9K	3XH	1.88
17	3ENE	NPZ	0.69
18	3G5E	Q74	0.25
19	3HVG	EV0	0.52
21	3I1Y	33N	0.72
22	3K5G	BJC	1.48
23	3KOO	24D	0.93
24	3L54	LXX	0.46
25	3MJW	WYF	0.49
26	3MSJ	EV3	5.21
27	3PI5	3P5	0.69
28	3PIY	585	0.83
29	3SN7	540	0.47
30	3SNI	546	0.81
31	3VEU	0GO	1.55
32	3VF3	0GS	0.80
33	3VV6	B00	2.06

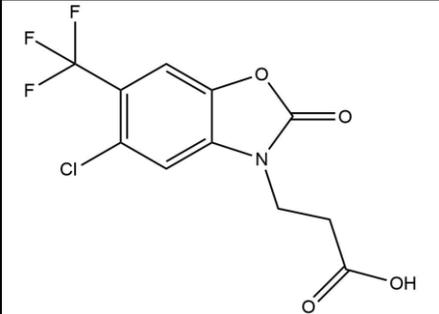
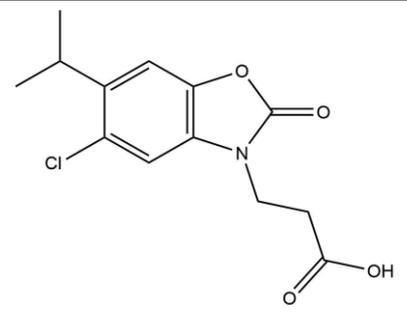
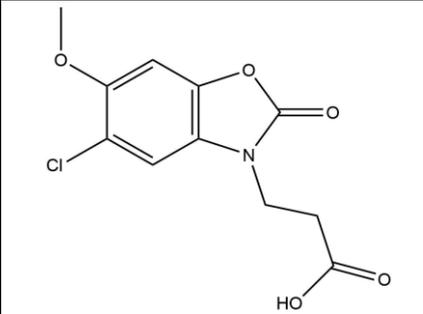
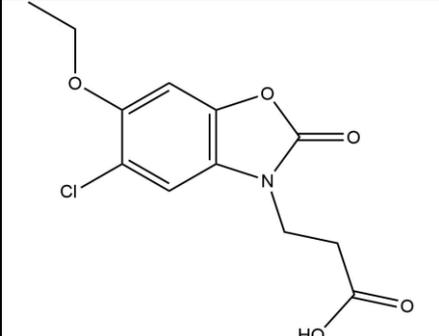
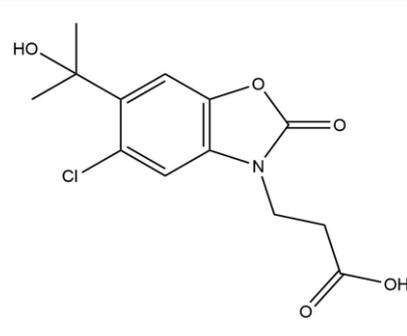
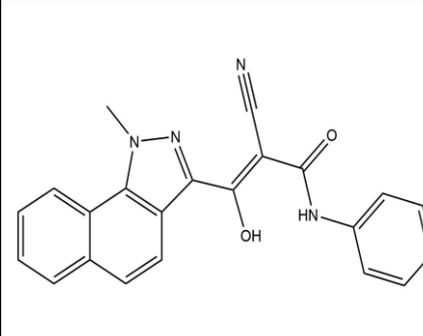
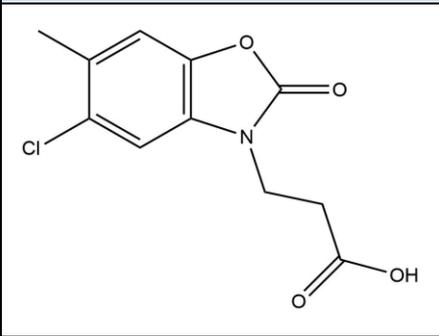
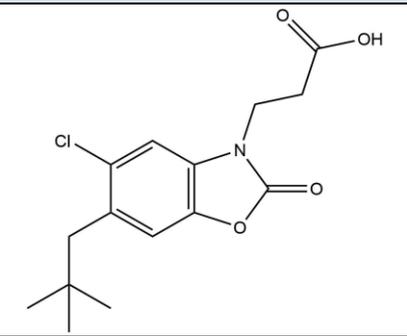
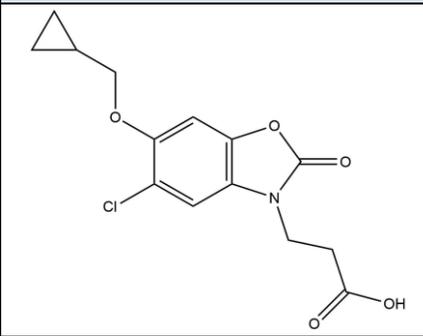
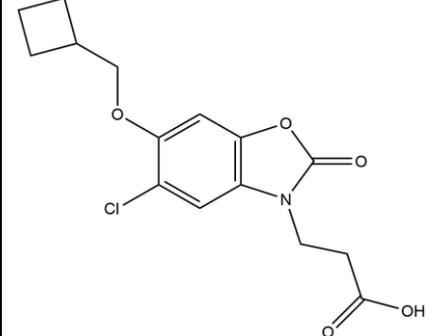
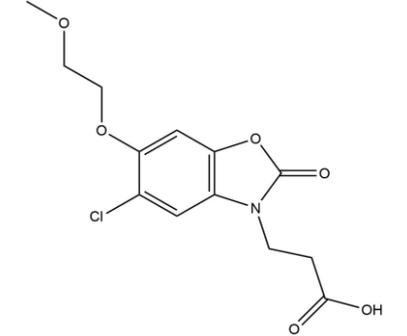
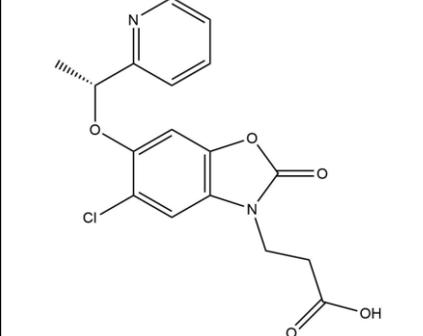
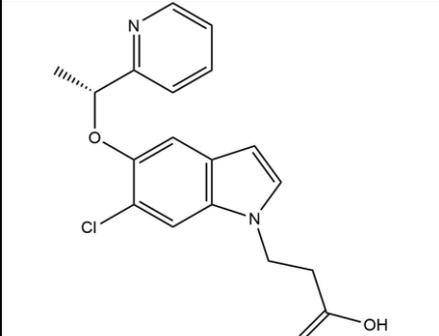
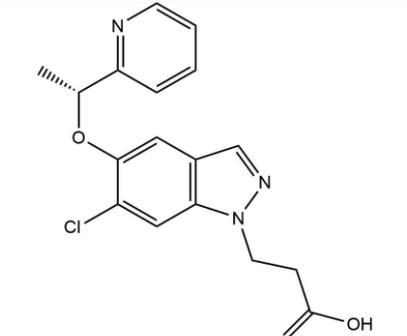
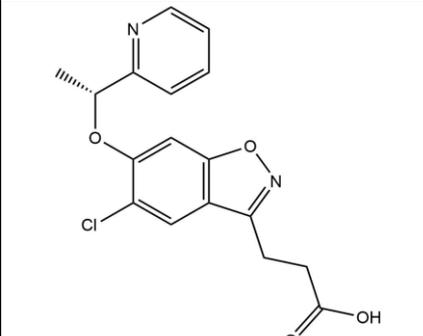
34	3WB4	0B3	2.33
35	3WB5	0B4	2.34
36	3WI2	P98	0.72
37	3WS8	X4C	0.66
38	4ACC	7YG	1.09
39	4ACD	GR9	1.01
40	4ACG	6LQ	0.93
41	4ACH	KDI	1.12
42	4B00	15F	1.23
43	4BC5	5FX	1.08
44	4BDS	THA	0.65
45	4EY7	E20	0.61
46	4GDY	0X1	1.82
47	4GE4	0KE	1.31
48	4GE7	0K5	1.71
49	4GE9	0L0	2.47
50	4GEB	0LD	2.41
51	4GID	0GH	1.66
52	4J36	1HR	0.56
53	4JP9	1M5	0.49
54	4KZ0	1UJ	0.78
55	4LXA	1YS	1.28
56	4QEM	HC4	1.48
57	4QER	STL	1.56
58	4QF7	C0R	1.16
59	4QF8	SPD	1.88
60	4QGD	PZZ	2.68
61	4RFZ	3OV	0.66
62	4URK	A82	0.78
63	4Y2H	49K	0.62
64	4ZPG	4QF	0.61
65	5AXP	4LK	0.71
66	5CLM	52K	0.55
67	5E80	5KP	0.89
68	5FN0	JHY	0.48

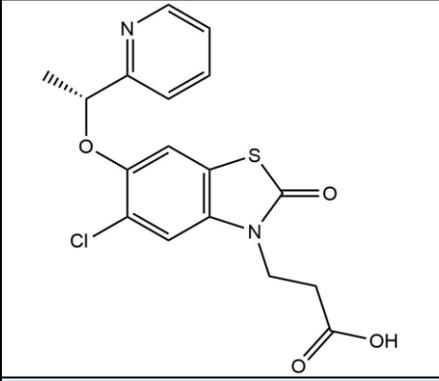
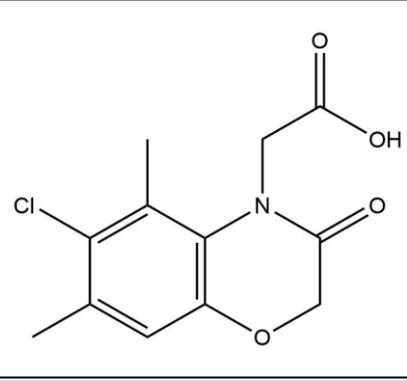
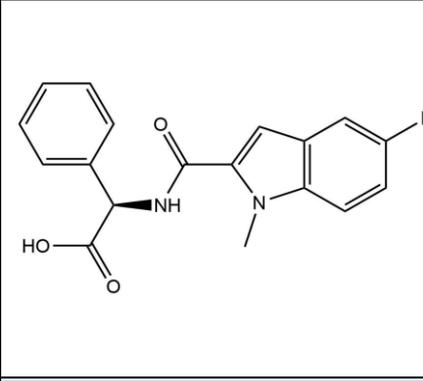
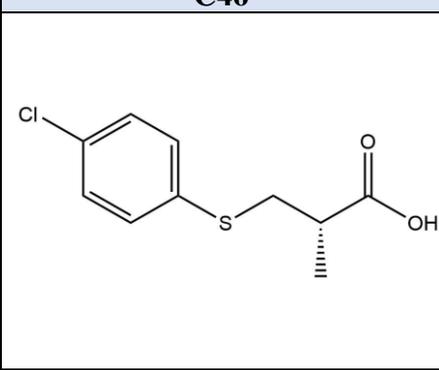
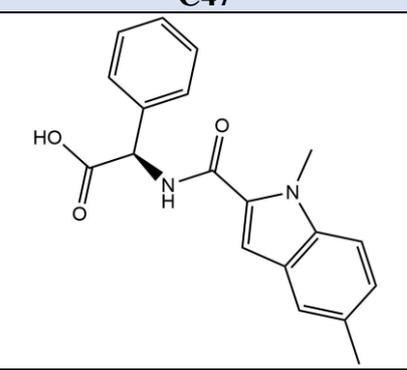
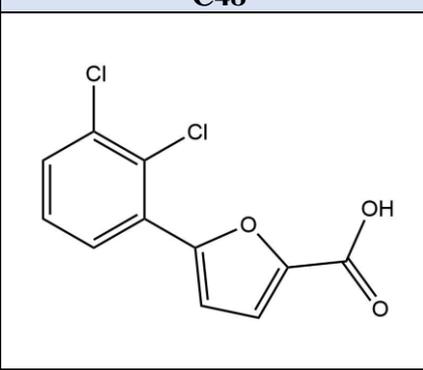
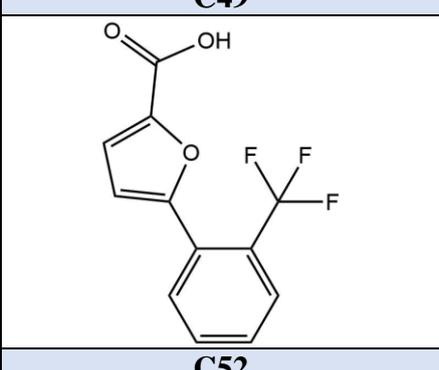
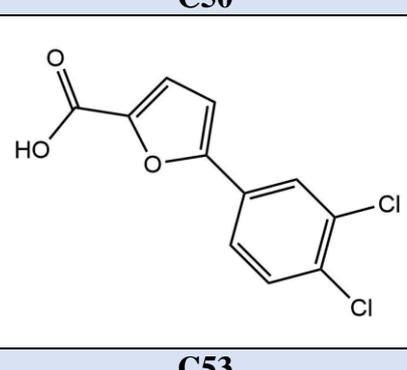
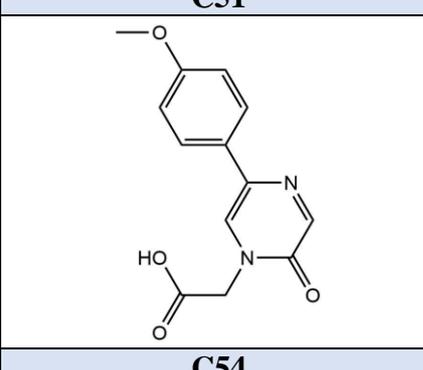
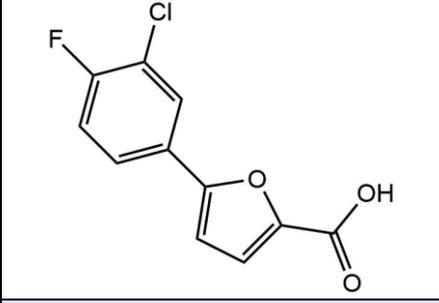
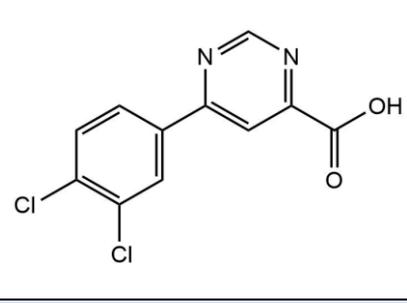
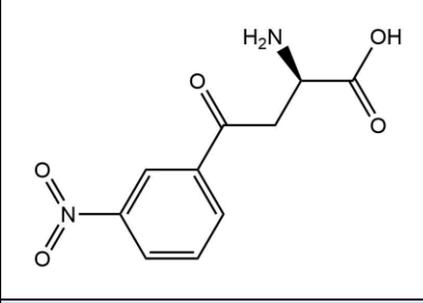
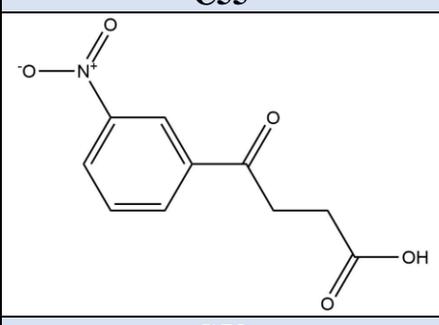
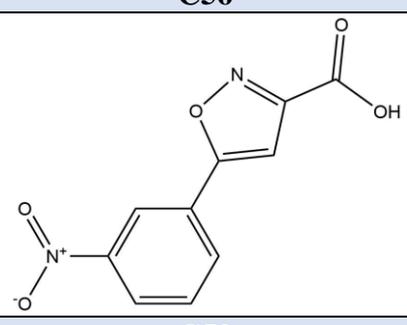
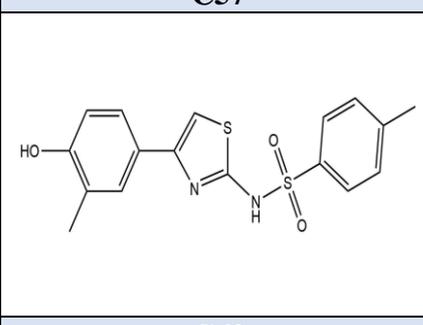
69	5I3Y	68K	3.01
70	5IKQ	JMS	0.41
71	5N7T	JHY	0.40
72	5NAB	8RK	0.27
73	5NAE	8R8	0.49
74	5NAG	8R5	0.64
75	5NAH	8RB	0.85
76	5P2P	DHG	2.69
77	5UWF	8Q7	0.55
78	5WQK	7NC	0.49
79	6AUW	W80	3.75
80	6B3T	CJ7	2.56
81	6DI5	GJ7	0.56
82	6DI9	GJJ	2.16
83	6EP4	DME	1.30
84	6EN5	BJ2	0.88
85	6EQQ	H19	4.89
86	6ESJ	PRM	4.45
87	6EVR	BZW	0.80
88	6FOY	E0T	1.67
89	6FOZ	E0H	1.61
90	6FP0	E0N	0.56
91	6FP1	E0Q	0.30
92	6FPH	E1W	0.45
93	6H0U	FKB	0.96
94	6NV7	L3J	0.78
95	6NW3	L4J	0.75
96	6QAB	HUQ	1.80
97	6QAC	HUT	1.61
98	6QAD	HUZ	2.35
99	6QAE	HUK	3.22
100	6S90	L0Z	1.14

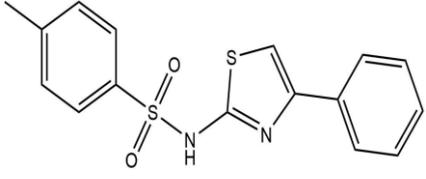
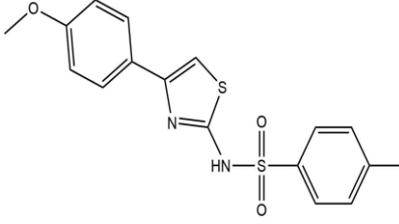
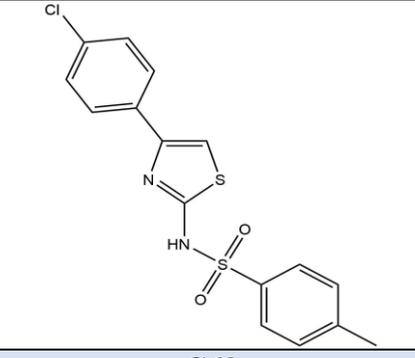
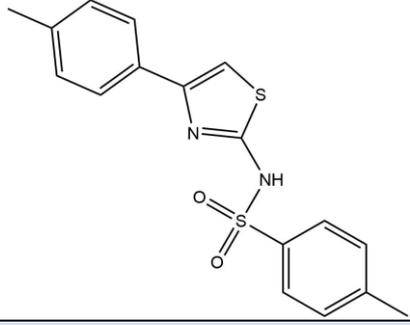
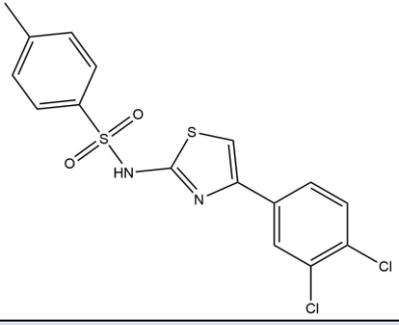
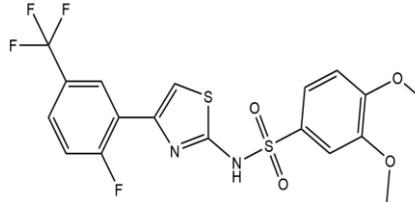
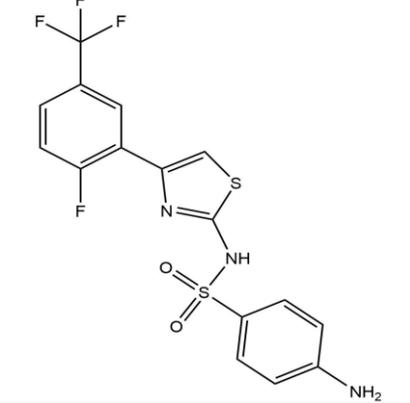
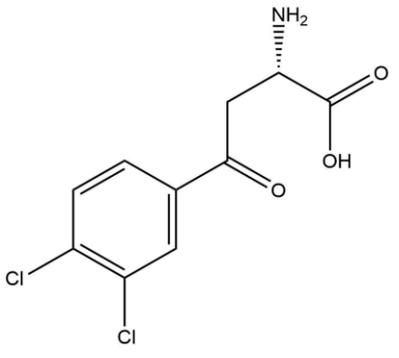
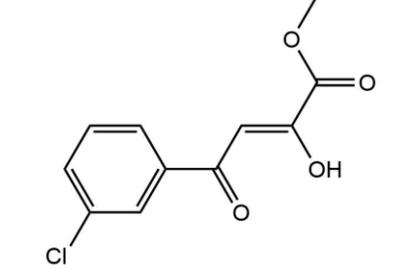
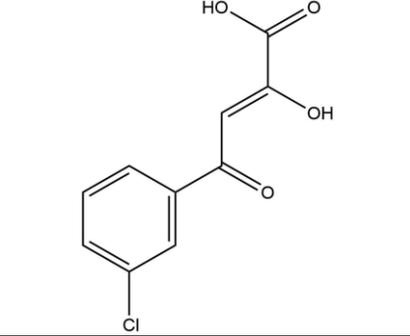
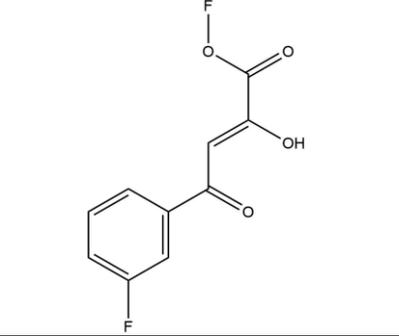
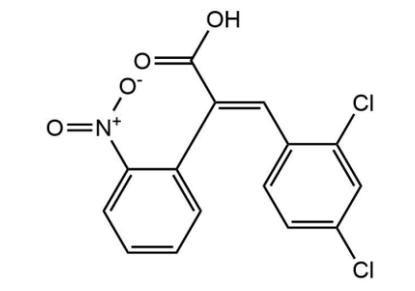
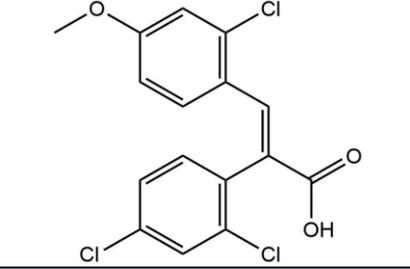
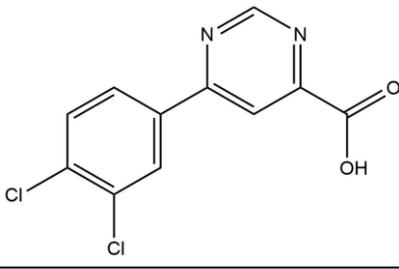
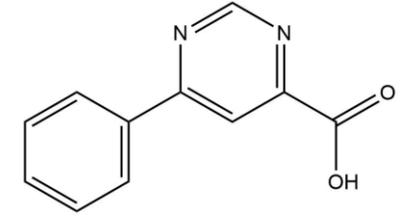
Annexe N°2 : Les structure des 107 inhibiteurs utilisés dans le test de corrélation linéaire.

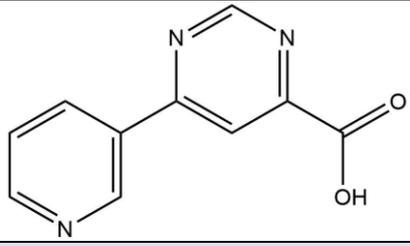
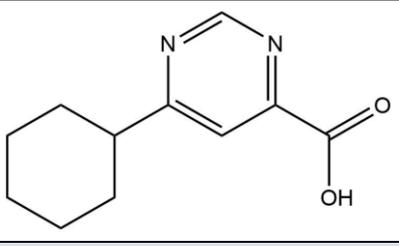
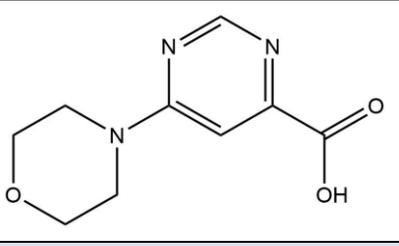
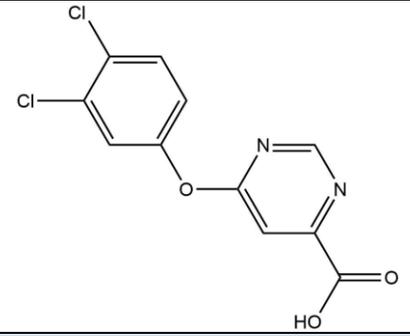
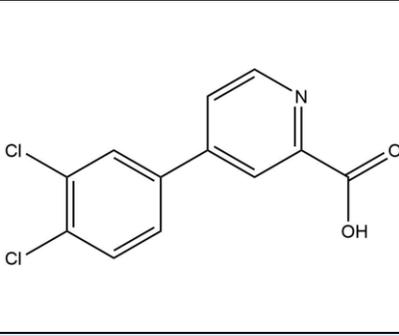
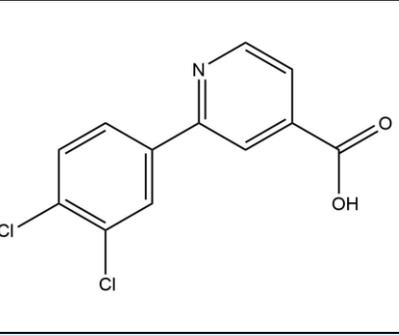
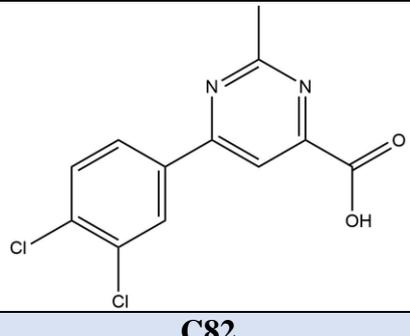
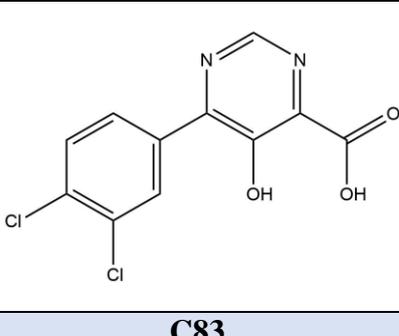
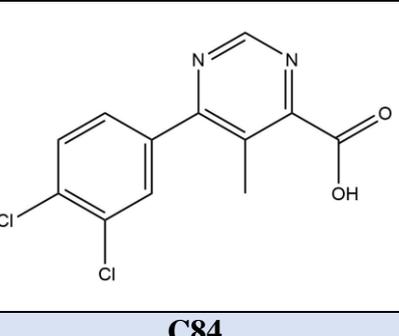
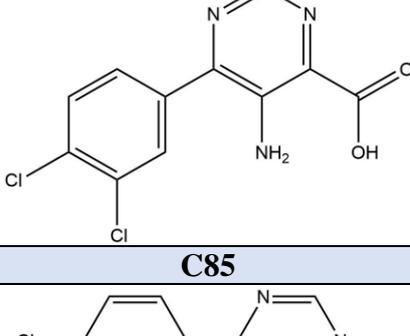
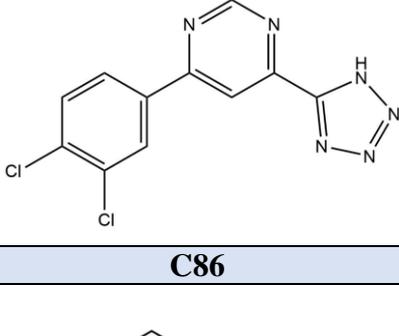
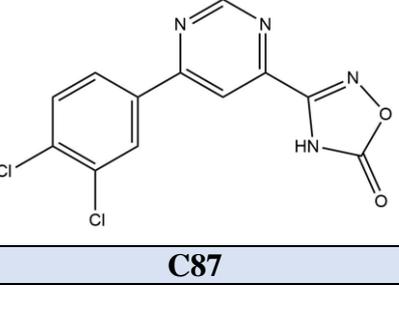
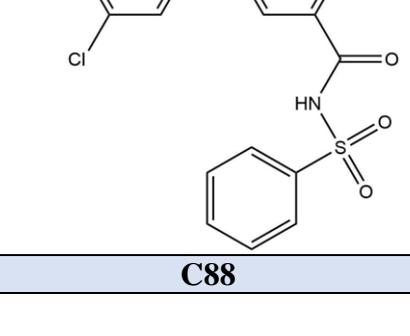
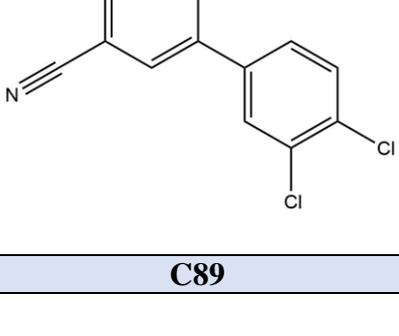
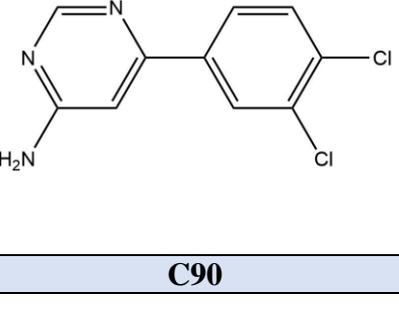
		
C1	C2	C3
		
C4	C5	C6
		
C7	C8	C9
		
C10	C11	C12
		
C13	C14	C15

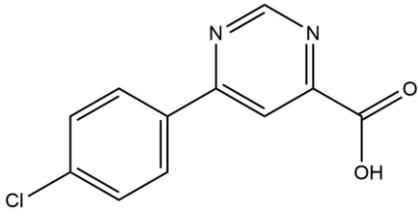
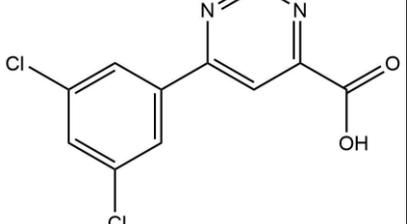
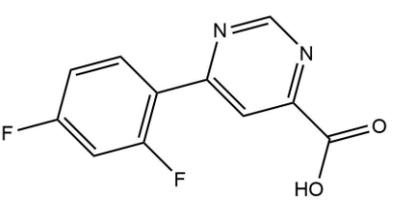
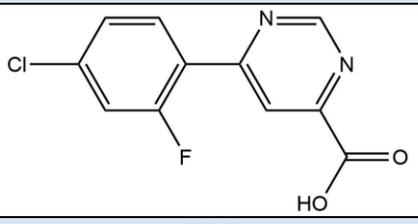
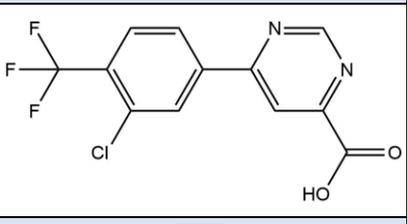
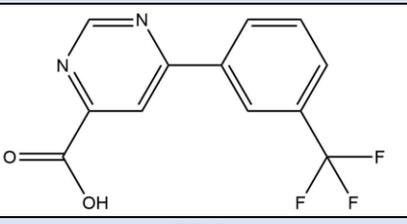
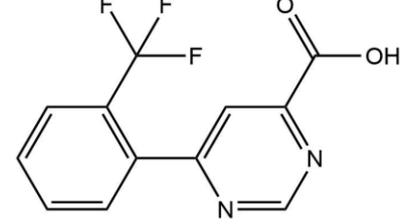
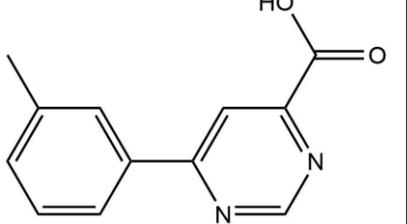
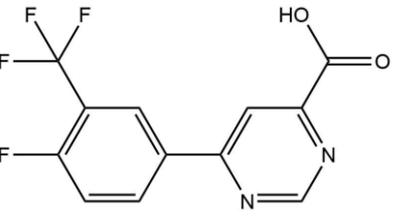
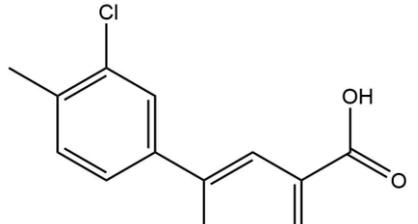
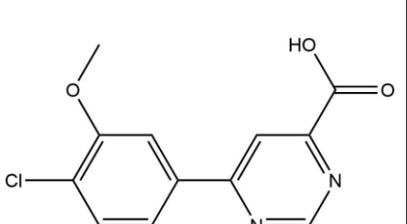
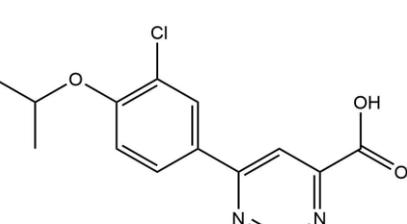
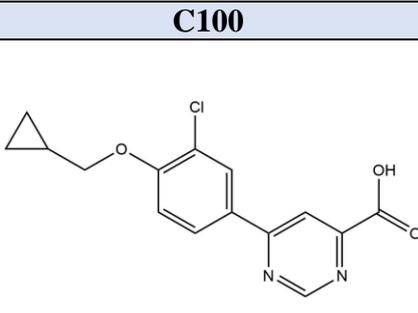
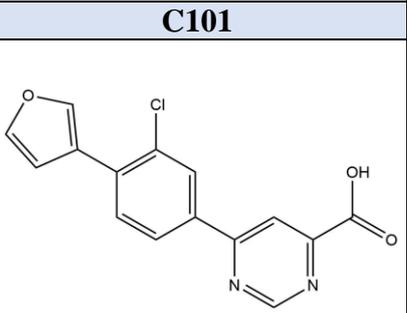
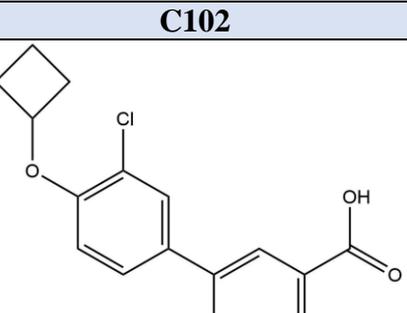
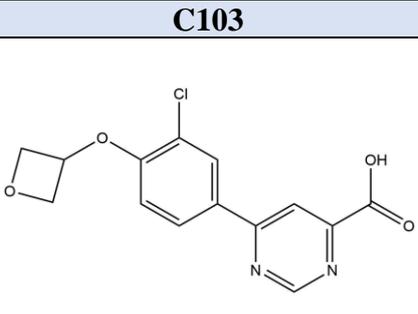
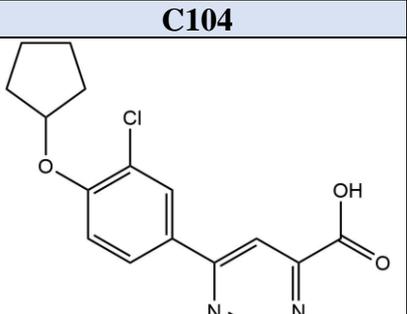
		
C16	C17	C18
		
C19	C20	C21
		
C22	C23	C24
		
C25	C26	C27
		
C28	C29	C30

		
C31	C32	C33
		
C34	C35	C36
		
C37	C38	C39
		
C40	C41	C42
		
C43	C44	C45

		
C46	C47	C48
		
C49	C50	C51
		
C52	C53	C54
		
C55	C56	C57
		
C58	C59	C60

		
C61	C62	C63
		
C64	C65	C66
		
C67	C68	C69
		
C70	C71	C72
		
C73	C74	C75

		
C76	C77	C78
		
C79	C80	C81
		
C82	C83	C84
		
C85	C86	C87
		
C88	C89	C90

		
C91	C92	C93
		
C94	C95	C96
		
C97	C98	C99
		
C100	C101	C102
		
C103	C104	C105
		
C106	C107	

Annexe N°3 : Les numéros d'accèsion et les scores des 352 composés similaires.

Composé	Numéro d'accèsion CID	ΔG (kcal/mol)
S1	CID_3282927	-6.30
S2	CID_3338828	-8.33
S3	CID_3636031	-7.48
S4	CID_3844768	-8.46
S5	CID_4262354	-6.98
S6	CID_4266611	-8.96
S7	CID_4303704	-7.29
S8	CID_10202432	-7.69
S9	CID_10208599	-6.90
S10	CID_10310005	-8.90
S11	CID_11591324	-8.90
S12	CID_11619338	-8.59
S13	CID_11698895	-10.13
S14	CID_11847058	-8.36
S15	CID_12024409	-8.45
S16	CID_12352186	-7.44
S17	CID_13015692	-7.27
S18	CID_13015695	-8.58
S19	CID_13015696	-9.12
S20	CID_13977073	-7.96
S21	CID_15084649	-7.36
S22	CID_15084685	-8.55
S23	CID_18675770	-8.96
S24	CID_19701552	-7.30
S25	CID_21985930	-7.78
S26	CID_21985932	-7.77
S27	CID_23368499	-7.29
S28	CID_23444815	-7.97
S29	CID_23549380	-8.53
S30	CID_24589989	-9.28
S31	CID_24748253	-10.76
S32	CID_24958862	-8.25

S33	CID_24962443	-10.68
S34	CID_25002758	-9.59
S35	CID_25003109	-9.75
S36	CID_29139466	-9.57
S37	CID_29140033	-9.11
S38	CID_30284828	-9.49
S39	CID_30284858	-9.04
S40	CID_30582418	-9.05
S41	CID_33993521	-7.95
S42	CID_39332786	-9.19
S43	CID_39339593	-9.39
S44	CID_39340672	-8.84
S45	CID_39342452	-9.59
S46	CID_39352114	-9.54
S47	CID_39352491	-9.26
S48	CID_42225073	-9.95
S49	CID_42225074	-9.43
S50	CID_42225075	-9.87
S51	CID_42225076	-9.94
S52	CID_42225077	-9.51
S53	CID_42225078	-9.88
S54	CID_42225079	-9.57
S55	CID_42630415	-9.79
S56	CID_44248243	-8.69
S57	CID_44337866	-7.43
S58	CID_44428917	-7.94
S59	CID_44428918	-8.64
S60	CID_44428919	-8.14
S61	CID_44428920	-8.49
S62	CID_45513049	-8.62
S63	CID_45513205	-8.22
S64	CID_45513454	-8.44
S65	CID_47081888	-9.46
S66	CID_51897037	-9.59
S67	CID_51897038	-9.05

S68	CID_55312171	-9.82
S69	CID_56292915	-9.38
S70	CID_56507988	-9.93
S71	CID_56528327	-10.36
S72	CID_56710576	-8.24
S73	CID_58018395	-7.17
S74	CID_58018433	-9.07
S75	CID_58018494	-9.20
S76	CID_58018536	-8.08
S77	CID_58018607	-9.31
S78	CID_58018828	-7.79
S79	CID_58018875	-7.88
S80	CID_58018939	-7.85
S81	CID_58018947	-5.76
S82	CID_58019007	-10.24
S83	CID_58688772	-7.67
S84	CID_58688815	-8.33
S85	CID_58688829	-10.58
S86	CID_59520432	-9.38
S87	CID_59674962	-9.79
S88	CID_59675025	-10.23
S89	CID_66644413	-8.78
S90	CID_66758585	-7.64
S91	CID_66778973	-6.86
S92	CID_67297286	-10.48
S93	CID_68442825	-10.50
S94	CID_68443422	-9.27
S95	CID_68444859	-10.32
S96	CID_68694432	-10.74
S97	CID_68877979	-7.53
S98	CID_68917681	-10.68
S99	CID_68917685	-9.81
S100	CID_68920339	-5.46
S101	CID_68920346	-9.33
S102	CID_68920380	-9.48

S103	CID_68920393	-10.36
S104	CID_68920526	-10.41
S105	CID_68920979	-7.68
S106	CID_68922988	-11.13
S107	CID_68922992	-11.16
S108	CID_68923201	-9.67
S109	CID_68923208	-10.26
S110	CID_68923354	-5.58
S111	CID_70885093	-9.98
S112	CID_72026238	-9.26
S113	CID_85946597	-8.26
S114	CID_86268764	-9.29
S115	CID_87138046	-11.03
S116	CID_87138047	-7.88
S117	CID_89179858	-10.86
S118	CID_89343832	-8.23
S119	CID_89766964	-10.05
S120	CID_89766988	-9.22
S121	CID_90426797	-8.67
S122	CID_90808261	-5.10
S123	CID_91133706	-7.31
S124	CID_91535871	-6.93
S125	CID_91687270	-8.01
S126	CID_92405430	-8.54
S127	CID_92405431	-9.34
S128	CID_92405432	-9.36
S129	CID_93735084	-10.58
S130	CID_93735108	-11.31
S131	CID_93735126	-10.34
S132	CID_93735178	-9.89
S133	CID_93735188	-10.06
S134	CID_93735213	-9.23
S135	CID_93735231	-9.34
S136	CID_95217108	-8.14
S137	CID_95217109	-8.21

S138	CID_97435369	-9.71
S139	CID_101235361	-8.56
S140	CID_101346008	-5.94
S141	CID_104629631	-8.73
S142	CID_106535488	-6.42
S143	CID_106535840	-8.04
S144	CID_115110767	-9.11
S145	CID_115113759	-9.59
S146	CID_118254085	-7.92
S147	CID_118491960	-10.36
S148	CID_118492118	-10.60
S149	CID_118536059	-9.69
S150	CID_121415026	-10.80
S151	CID_121415029	-9.67
S152	CID_121415031	-11.07
S153	CID_121415033	-9.81
S154	CID_121415035	-7.89
S155	CID_121415036	-10.87
S156	CID_121415041	-10.90
S157	CID_121415044	-9.35
S158	CID_121415048	-11.94
S159	CID_121415049	-11.54
S160	CID_121415050	-11.14
S161	CID_121415051	-9.50
S162	CID_121415052	-11.67
S163	CID_121415057	-11.60
S164	CID_121415058	-9.95
S165	CID_121415059	-11.26
S166	CID_121415060	-10.83
S167	CID_121415063	-11.37
S168	CID_121415065	-10.76
S169	CID_121415066	-10.86
S170	CID_121415067	-9.77
S171	CID_121415068	-9.97
S172	CID_121415069	-10.61

S173	CID_121415071	-9.70
S174	CID_121415073	-11.04
S175	CID_121415074	-11.23
S176	CID_121415076	-10.14
S177	CID_121415077	-10.12
S178	CID_121415078	-9.26
S179	CID_121415079	-11.41
S180	CID_121415080	-11.08
S181	CID_121415081	-10.61
S182	CID_121415083	-11.66
S183	CID_121415084	-9.70
S184	CID_121415086	-10.79
S185	CID_121415087	-12.06
S186	CID_121415088	-10.62
S187	CID_121415092	-11.14
S188	CID_121415093	-8.62
S189	CID_121415094	-10.53
S190	CID_121415097	-11.22
S191	CID_121415099	-10.81
S192	CID_121415107	-9.70
S193	CID_121415109	-10.79
S194	CID_121415115	-11.16
S195	CID_121415116	-11.13
S196	CID_121415117	-11.29
S197	CID_121415118	-11.00
S198	CID_121415121	-9.92
S199	CID_121415122	-11.37
S200	CID_121415123	-10.80
S201	CID_121415127	-10.01
S202	CID_121415129	-10.59
S203	CID_121415130	-11.62
S204	CID_121415131	-10.89
S205	CID_121415134	-10.89
S206	CID_121415137	-9.53
S207	CID_121415138	-8.23

S208	CID_121415140	-9.74
S209	CID_121415142	-10.38
S210	CID_121415143	-9.88
S211	CID_121415144	-10.36
S212	CID_121415145	-8.50
S213	CID_121415146	-11.59
S214	CID_121415147	-9.45
S215	CID_121415148	-10.28
S216	CID_121415162	-11.00
S217	CID_121415168	-11.16
S218	CID_121415171	-9.75
S219	CID_121415172	-11.64
S220	CID_121415177	-10.93
S221	CID_121415179	-10.95
S222	CID_121415180	-11.03
S223	CID_121415183	-10.52
S224	CID_121415185	-9.67
S225	CID_121415187	-9.47
S226	CID_121415188	-9.76
S227	CID_121415191	-11.00
S228	CID_121415195	-10.32
S229	CID_121415196	-11.19
S230	CID_121415199	-9.76
S231	CID_121415202	-9.63
S232	CID_121415203	-10.94
S233	CID_121415204	-10.73
S234	CID_121415206	-9.86
S235	CID_121415208	-8.86
S236	CID_121415209	-10.57
S237	CID_121415212	-9.97
S238	CID_121427681	-10.50
S239	CID_121427698	-11.55
S240	CID_121427740	-10.44
S241	CID_125430097	-3.78
S242	CID_125430098	-4.78

S243	CID_129895497	-3.42
S244	CID_131899336	-7.96
S245	CID_132188634	-7.36
S246	CID_132188635	-8.73
S247	CID_132188638	-7.10
S248	CID_132188639	-8.83
S249	CID_132188642	-8.17
S250	CID_132188644	-8.48
S251	CID_132188645	-9.02
S252	CID_132188647	-6.71
S253	CID_132188648	-7.93
S254	CID_132188650	-8.65
S255	CID_132188652	-8.92
S256	CID_132188669	-6.11
S257	CID_132188670	-8.19
S258	CID_132188679	-6.17
S259	CID_132188680	-6.25
S260	CID_132188692	-6.50
S261	CID_132207506	-7.90
S262	CID_132207507	-8.03
S263	CID_132207511	-6.57
S264	CID_132207660	-10.39
S265	CID_132207844	-6.53
S266	CID_132207845	-9.76
S267	CID_132207871	-9.46
S268	CID_132286033	-2.33
S269	CID_135133635	-10.08
S270	CID_135133757	-11.10
S271	CID_135138962	-10.29
S272	CID_135138965	-7.55
S273	CID_135138973	-9.83
S274	CID_135139150	-10.42
S275	CID_135139686	-8.47
S276	CID_135139688	-11.33
S277	CID_135140553	-10.33

S278	CID_135244237	-8.42
S279	CID_135589642	-7.17
S280	CID_135894508	-9.86
S281	CID_136087040	-7.62
S282	CID_136203485	-9.23
S283	CID_136401499	-7.97
S284	CID_136401517	-7.64
S285	CID_136401572	-7.54
S286	CID_136401583	-9.50
S287	CID_136401586	-7.67
S288	CID_136477397	-7.48
S289	CID_136500455	-9.12
S290	CID_136500489	-9.02
S291	CID_136500640	-8.52
S292	CID_136500645	-9.17
S293	CID_136500657	-9.37
S294	CID_136500680	-9.40
S295	CID_136500690	-7.36
S296	CID_136887029	-9.84
S297	CID_136887077	-7.63
S298	CID_137179739	-7.68
S299	CID_137374825	-10.53
S300	CID_137374848	-10.68
S301	CID_138602511	-9.04
S302	CID_138602513	-4.68
S303	CID_138642903	-10.96
S304	CID_138642905	-11.35
S305	CID_138642970	-8.88
S306	CID_139221440	-10.00
S307	CID_139221443	-8.73
S308	CID_140346224	-6.96
S309	CID_140472755	-7.26
S310	CID_140821199	-7.74
S311	CID_140821200	-7.45
S312	CID_140821201	-7.47

S313	CID_140821202	-8.97
S314	CID_140821203	-8.78
S315	CID_140821204	-8.71
S316	CID_140821205	-7.53
S317	CID_140821206	-8.53
S318	CID_140821207	-8.22
S319	CID_140821208	-8.50
S320	CID_140821209	-9.71
S321	CID_140821210	-7.51
S322	CID_140821211	-8.37
S323	CID_140821212	-8.89
S324	CID_140821213	-9.36
S325	CID_141566495	-10.10
S326	CID_141701213	-8.46
S327	CID_141701214	-8.97
S328	CID_141701215	-8.77
S329	CID_141701216	-6.96
S330	CID_141701217	-7.53
S331	CID_142512508	-9.74
S332	CID_142735005	-4.90
S333	CID_142768727	-9.30
S334	CID_142799028	-8.74
S335	CID_142799029	-8.94
S336	CID_142799033	-8.74
S337	CID_142799034	-8.03
S338	CID_142799035	-8.57
S339	CID_142799036	-9.54
S340	CID_142799037	-10.19
S341	CID_142799039	-8.06
S342	CID_142799042	-8.31
S343	CID_142799044	-9.04
S344	CID_142799046	-10.46
S345	CID_143570542	-9.49
S346	CID_143570558	-9.97
S347	CID_143570629	-11.26

S348	CID_145102679	-10.03
S349	CID_145192968	-9.66
S350	CID_145362637	-1.44
S351	CID_145805447	-8.05
S352	CID_145805448	-8.09



RÉSUMÉ

Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Kynurénine 3-monooxygénase par docking moléculaire

Résumé

Le docking moléculaire est une des approches de modélisation moléculaire permettant la simulation des interactions protéine-ligand. Cette approche a été employée dans le présent travail en vue de proposer de nouveaux inhibiteurs de la KMO ; enzyme cible thérapeutique prouvée utile dans le traitement de la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ainsi que d'autres maladies comme : la pancréatite aiguë. Le criblage virtuel d'une collection de similaires chimiques du composé **C45**, suivie par une série de substitutions structurales fait ressortir le composé **P3** comme meilleur inhibiteur de la KMO avec une énergie d'interaction égale à -14.20 kcal/mol, nettement inférieure à celle du composé de départ soit -10.87 kcal/mol. Enfin, l'étude prédictive des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité potentielle nous renseigne de manière positive sur le profil ADMET du composé **P3** particulièrement sa bonne capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique pour atteindre son lieu d'action.

Mot clés : AutoDock, barrière hémato-encéphalique, docking moléculaire, inhibiteur, Kynurénine 3-monooxygénase.

In silico design of new inhibitors of Kynurenine 3-monooxygenase by molecular docking

Abstract

Molecular docking is one of the molecular modeling approaches allowing the simulation of protein-ligand interactions. This approach was employed in the present work with a view to proposing new inhibitors of KMO ; a therapeutic target enzyme proven useful in the treatment of Huntington's disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, as well as other diseases such as: acute pancreatitis. Virtual screening of a collection of chemical analogues of compound **C45**, followed by a series of structural substitutions reveals compound **P3** as the best KMO inhibitor with an interaction energy of -14.20 kcal/mol, significantly lower than that of the starting compound that is -10.87 kcal/mol. Finally, the predictive study of the physicochemical, pharmacokinetic properties and potential toxicity provides us with positive information on the ADMET profile of compound **P3**, particularly its good ability to cross the blood-brain barrier to reach its site of action.

Keywords : AutoDock, blood-brain barrier, molecular docking, inhibitor, Kynurenine 3-monooxygenase.

تصميم مثبطات نظرية جديدة لإنزيم الـ Kynurenine 3-monooxygenase عن طريق الالتحام الجزيئي

الملخص

الالتحام الجزيئي هو أحد أساليب النمذجة الجزيئية التي تسمح بمحاكاة التفاعلات بين البروتين و الربيطه. في عملنا هذا، طبق هذا النهج بهدف اقتراح مثبطات جديدة لـ KMO ؛ باعتبارها إنزيم مستهدف ثبت فائدته في علاج داء هنتنغتون، مرض الزهايمر، ومرض باركنسون، بالإضافة إلى أمراض أخرى مثل: التهاب البنكرياس الحاد. كشف فحص مجموعة من النظائر الكيميائية للمركب C45، متبوعًا بسلسلة من البدائل الهيكلية، أن المركب P3 هو أفضل مثبط للـ KMO مع طاقة تفاعل تبلغ -14.20 kcal/mol ، أقل بكثير من طاقة تفاعل مركب البداية التي تساوي -10.87 kcal/mol . أخيرًا، أظهرت لنا الدراسة التنبؤية للخصائص الفيزيوكيميائية، الحركية الدوائية والسمية المحتملة معلومات إيجابية عن ملف الـ ADMET للمركب P3، لا سيما قدرته الجيدة على عبور الحاجز الدموي الدماغي للوصول إلى موقع عمله.

الكلمات المفتاحية : AutoDock، الالتحام الجزيئي، حاجز دموي دماغي، Kynurenine 3-monooxygenase، مثبط.

Année universitaire : 2019/ 2020

Présenté par : **KHODJA Linda**

Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la Kynurénine 3-monooxygénase par docking moléculaire

Mémoire de fin de cycle présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie appliquée.

Résumé

Le docking moléculaire est une des approches de modélisation moléculaire permettant la simulation des interactions protéine-ligand. Cette approche a été employée dans le présent travail en vue de proposer de nouveaux inhibiteurs de la KMO ; enzyme cible thérapeutique prouvée utile dans le traitement de la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, ainsi que d'autres maladies comme : la pancréatite aiguë. Le criblage virtuel d'une collection de similaires chimiques du composé **C45**, suivie par une série de substitutions structurales fait ressortir le composé **P3** comme meilleur inhibiteur de la KMO avec une énergie d'interaction égale à -14.20 kcal/mol, nettement inférieure à celle du composé de départ soit -10.87 kcal/mol. Enfin, l'étude prédictive des propriétés physicochimiques, pharmacocinétiques et de toxicité potentielle nous renseigne de manière positive sur le profil ADMET du composé **P3** particulièrement sa bonne capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique pour atteindre son lieu d'action.

Mot clés : AutoDock, barrière hémato-encéphalique, docking moléculaire, inhibiteur, Kynurénine 3-monooxygénase.

Laboratoire de recherche : **Laboratoire de Biochimie Appliquée**

Jury d'évaluation :

Président du jury : **BENSEGUENI A.** (Professeur - UFM Constantine 1).

Rapporteur : **MOKRANI E.H.** (Maître assistant « A » - UFM Constantine 1).

Examinatrice : **TENIOU S.** (Maître assistant « A » - UFM Constantine 1).

Date de soutenance : **15 / 09 / 2019**