

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم

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*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**MODELISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA
DIHYDROFOLATE REDUCTASE FONGIQUE**

Présenté par : ZERMANE WISSAM

Le 26/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : BENSEGUENI ABDERRAHMANE (PROF-Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : CHIKHI ABDELOUAHAB (PROF - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : MOKRANI EL HACENE (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction.....1

Chapitre 1 : Les maladies fongiques

1. Généralités sur l'agent pathogène.....3

2. Historique.....4

3. Candida albicans.....4

3.1 Les facteurs de virulence.....5

 3.2 Rôle et localisation.....6

 3.3 Les facteurs de risque.....6

4. Manifestations cliniques.....7

 4.1 Fungemia candidiasis.....7

 4.2 Endocardite.....7

 4.3 Méningite.....8

 4.4 Péritonite.....9

 4.5 Arthrite.....10

 4.6 Infections oculaires.....11

 4.7 Otomycose.....12

 4.8 Onychomycose.....14

 4.9 Vulvovaginite.....14

5. Traitement.....	15
6. Prévention.....	16

Chapitre 2 : L'enzyme dihydrofolate réductase et ses inhibiteurs

1. La dihydrofolate reductase (DHFR).....	17
2. Structure enzymatique.....	18
3. Les inhibiteurs de la DHFR.....	19
3.1 Méthotrexate.....	19
3.2 Antifolates liés au propargyle.....	21
3.3 Triméthoprim.....	21

Chapitre 3 : Docking Moléculaire

1. Introduction.....	24
2. Les 3 étapes du criblage virtuel.....	24
2.1 La mise au point de la chimiothèque de départ.....	24
2.1.1 Choix de la chimiothèque de départ.....	25
2.1.2 Filtrage et préparation finale de la chimiothèque.....	26
2.2 Criblage par docking à haut débit.....	27
2.3 Post-traitement des données.....	29
3. Les outils du docking moléculaire.....	31
3.1 Récepteur.....	32
3.2 Ligands.....	32
3.3 Les programmes de docking moléculaire.....	33
4. Les interactions protéine-ligand.....	33
4.1 La liaison hydrogène.....	34
4.2 La liaison ionique.....	34

4.3 L'interaction hydrophobe.....	35
4.4 L'interaction pi-pi stacking.....	36
4.5 Les forces de Van Der Waals.....	36

PARTIE PRATIQUE

Chapitre 1 : Matériels et Méthodes

1. Matériels.....	38
1.1. Micro-ordinateur.....	38
1.2 Logiciels.....	38
1.2.1 Surfex version 1.3.....	38
1.2.2 Open Babel version 2.0.2	38
1.2.3 Biovia Discovery Studio version 21.1.0.0.....	38
1.2.4 Swiss ADME Logiciels.....	38
1.3 Banques de données.....	38
1.3.1. PDB (Protein Data Bank).....	38
1.3.2. Pubchem	39
2. Méthodes.....	39
2.1 Préparation de L'enzyme.....	39
2.2 Préparation du ligand.....	40
2.3 Génération du protomol.....	41
2.4 Le docking moléculaire.....	41
3. Analyse visuelle des résultats.....	41
4. Criblage virtuel d'une collection de composés similaires	41

5. Filtrage ADME.....	42
5.1 Propriétés physicochimiques.....	42
5.1.1 Règle de 5 de Lipinski	42
5.1.2 Règle de Veber.....	42
5.1.3 Solubilité dans l'eau... ..	43
5.1.4 Accessibilité à la synthèse.....	43
5.2 Propriétés pharmacocinétiques	43
5.2.1 Absorption gastro-intestinal (GI).....	43
5.2.2 Perméabilité hémato-encéphalique(BBB).....	43
5.2.3 Inhibition des cytochromes P450.....	44

CHAPITRE 2 : Résultats et Discussion

1. La fiabilité du programme Surfex.....	45
1.1 Test RMSD	45
1.2 Analyse visuelle.....	47
2. Etude de l'inhibition de la DHFR.....	49
3. Proposition de nouveaux inhibiteurs	50
4. Prédiction des paramètres ADME	56
Conclusion.....	59

Résumés

Références Bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure N°1 : Les différents constituants de la paroi fongique.....	3
Figure N°2 :Candida albicans.....	5
FigureN°3 :Image ETO d'une végétation endocardique... ..	8
Figure N°4 :La méningite et ses différents symptômes	9
Figure N°5 : Infection fongique de péritonite.....	10
Figure N°6 : arthrite prothétique au niveau de genou.....	11
Figure N°7 :Endophtalmie endogène.....	12
Figure N°8 : L'otite moyenne.....	13
Figure N°9 : L'otite externe.....	13
FigureN°10 :L'onycomycose.....	14
Figure N°11 : Réaction catalysée par la dihydrofolate réductase.(a) Le substrat 7,8-dihydrofolate (DHF), (b) cofacteur NADPH et (c) la réaction catalysée par le DHFR.....	17
FigureN°12 :Les étapes de synthèse de thymidilate et les acides nucléiques et aminés dont le dihydrofolate réductase est l'enzyme clé.....	18
Figure N°13: Structure de dihydrofolate réductase de Candida albicans.....	19
Figure N°14: Structure du méthotrexate.....	20
Figure N°15 : L'excès d'acide folinique restaure partiellement la croissance de Candida albicans en présence méthotrexate.....	20
Figure N°16 : Structure du triméthoprim.....	22
Figure N°17 : Mécanisme d'action des antifolates.....	22
Figure N°18 : Analyse de collections de criblage.....	26
Figure N°19 : Différentes phases de la préparation de la chimiothèque.....	27

Figure N°20 : Méthodes de prédiction d'énergie libre (affinité) de liaison d'un ligand.....	29
Figure N°21 : Influence de procédure d'évaluation consensus sur l'enrichissement en vrais actifs, par rapport à un criblage au hasard.....	30
FigureN°22 : Influence de la stratégie d'analyse de données sur l'enrichissement en actifs, par rapport à un criblage au hasard, à partir d'un même jeu de données de docking	31
Figure N°23 : Les programmes de docking les plus cités.....	33
Figure N°24 : Liaison hydrogène entre la molécule d'eau et l'ammoniac.....	34
FigureN°25 : La liaison ionique entre les composants essentiels du sel de table (Na+Cl-)......	35
FigureN°26 : L'incarnation d'une réaction hydrophobique dans ses deux étapes.....	35
Figure N°27 : La réaction π - π stacking et ses trois types : A : Coté-Face Forme en T, B : Parallèle déplacé, C : Face Face Parallèle.....	36
Figure N°28 : Les forces de van der Waals.....	38
Figure N°29 : Structures 3D du complexe 4HOE issu de la PDB.....	40
Figure N°30 : Résultats en pourcentage obtenus par Surfex.....	46
Figure N°31 : Protéine du complexe 4HOE avec son ligand 18G obtenu par rayon-X (pris de la PDB).....	47
Figure N°32 : Protéine du complexe 4HOE avec son ligand 18G calculé par docking moléculaire avec Surfex.....	48
Figure N°33 : Superposition de la géométrie du ligand 18G du complexes 4HOE obtenu par rayon-X (coloré en rose) et celle calculée par docking moléculaire avec Surfex (colorés en bleu).....	48
FigureN°34 : Interacion du ligand 18G avec le site actif de la dihydrofolate réductase.....	50
Figure N°35 : Positionnement du similaire S48 dans le site actif de la DHFR.....	53
Figure N°36 : Positionnement du similaire S6 dans le site actif de la DHFR... ..	54

Liste des tableaux

Tableau N°1 : méthodes de traitements des différents types de candido.....	15
Tableau N°2 :Principaux programmes de docking moléculaire.....	28
Tableau N°3 : Principales causes d'erreurs lors d'un docking moléculaire.....	28
Tableau N°4: Caractéristiques des six complexes de la DHFR.....	39
Tableau N°5 : Valeurs RMSD des 5 complexes dihydrofolate réductase - inhibiteur.....	46
TableauN°6 : Scores des 5 complexes dihydrofolate réductase-inhibiteur de la PDB.....	49
TableauN°7 : Scores des interactions des 100 similaires avec la dihydrofolate réductaseclassés par ordre décroissant.....	51
TableauN°8: Propriétés physico-chimiques des similaires S48 et S6.....	57
TableauN°9: Propriétés pharmacocinétiques des similaires S48 et S6.....	58

Liste des abréviations

VIH	Virus d'immunodéficience humaine
RMSD	Root mean square deviation
PDB	Protein Data Bank
DHFR	Dihydrofolate réductase
ETO	Échocardiographie transœsophagienne
THF	Tétrahydrofolate
DHF	Dihydrofolate
MTX	Méthotrexate
CaDHFR	Dihydrofolate réductase de <i>Candida albicans</i>
CgDHFR	Dihydrofolate réductase de <i>Candida glabrata</i>
nM	Nano molaire
μM	Micro molaire
IC50	Concentration Inhibitrice 50%
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
1-D	Une dimension
3-D	Trois dimensions
RMN	Résonance magnétique nucléaire
GB	Trois gigabyte
GHZ	Gigahertz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIH	National institute of health

Å	Angström
ADME	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion
GI	Gastro-intestinal
LogP	Le coefficient de partage octanol-eau
PSA	L'aire de surface polaire
PM	Poids moléculaire
nLF	Nombre de liaisons flexibles
nON	Nombre d'accepteur d'hydrogène
nOHNH	Nombre de donneurs H
TPSA	Surface totale polaire.
BBB	Blood Brain Barrier
CYP1A2	Cytochrome P1A2
CYP2C19	Cytochrome P2C19
CYP2C9	Cytochrome P2C9
CYP2D6	Cytochrome P2D9
CYP3A4	Cytochrome P3A4

Introduction :

Le développement d'un nouveau médicament peut être défini par un ensemble de processus inventifs capables de trouver de nouveaux médicaments basés sur les connaissances de cibles biologiques.

Le remède ou la molécule thérapeutique est généralement une petite molécule activant ou inhibant la fonction d'une biomolécule. Citons à titre d'exemple :

- Le ritonavir est un médicament antirétroviral qui est utilisé généralement pour le traitement de l'infection par le VIH : C'est un inhibiteur de la protéase[1].
- L'amidaron est un inhibiteur de l'isoenzyme CYP3A4 du cytochrome P450 utilisé dans le traitement de certains troubles du rythme cardiaque [2].

La conception et la mise sur le marché d'un médicament est un processus long et onéreux qui peut demander plusieurs années de recherche et un financement substantiel. Pour pallier ces inconvénients, la simulation informatique faisant appel au criblage virtuel par docking moléculaire est aujourd'hui une approche de découverte des médicaments de plus en plus utilisée

C'est dans ce même contexte que nous tenterons dans le présent travail d'utiliser la modélisation par docking moléculaire pour rechercher de nouveaux inhibiteurs de la dihydrofolate reductase, une enzymes clé du métabolisme des champignons pathogènes pour l'homme

Ce travail a pour objectif en premier lieu de vérifier la performance de surflex connu comme un programme de docking moléculaire, par de test RMSD (root mean square deviation) en utilisant 100 complexes de type enzyme-inhibiteur extraits de la Protein Data Bank (PDB)

En second lieu, nous nous attacherons à rechercher les meilleurs composés similaires issus de la PubChem en utilisant comme structure de base le meilleur inhibiteur de la DHFR existant dans la PDB.

Ce travail est scindé en deux grandes parties :

La première partie dédiée à l'étude bibliographique est constituée de trois chapitres se rapportant respectivement aux maladies fongiques, à la dihydrofolate réductase

(DHFR) et ses inhibiteurs et enfin à l'outil docking moléculaire utilisé ici comme méthode de prédiction de nouveaux et meilleurs inhibiteurs de l'enzyme considérée.

La deuxième partie est composée de deux chapitres dont le premier est intitulé matériel et méthodes qui a pour but d'évaluer l'affinité des molécules pour la DHFR obtenue suite au docking moléculaire mais aussi de mettre en exergue les mécanismes d'interaction entre l'inhibiteur et l'enzyme. Quant au deuxième chapitre, il sera exclusivement consacré aux résultats et discussion.

Une conclusion générale avec des perspectives d'avenir achèvera ce travail.

Chapitre 1

Les Maladies Fongiques

1. Généralités sur l'agent pathogène

Les champignons microscopiques sont souvent appelés Mycètes ou Fungi, sont une sorte de Mycète. Leur particularité est que leur paroi cellulaire est principalement constituée d'une substance appelée chitine. Le trône des mycètes est composé d'un large éventail d'organismes. Certains sont unicellulaires, tandis que d'autres sont multicellulaires. Les mycètes sont des organismes hétérotrophes qui n'utilisent pas les voies photosynthétiques pour survivre. Ils sont divisés en deux grands groupes : les moisissures et les levures .

Les levures sont des mycètes unicellulaire, non filamenteux qui possèdent une paroi scabreuse, responsable de leurs formes constituée principalement de polysaccharides (mannanes, glucanes et chitine) et de protéines. Leur membrane cytoplasmique est constituée principalement des stérols et de trois feuilletts classiques des membranes biologiques : deux feuilletts composés de lipides et de phospholipides situés de part et d'autre d'un feuillet de nature protéique (**Figure N°1**).

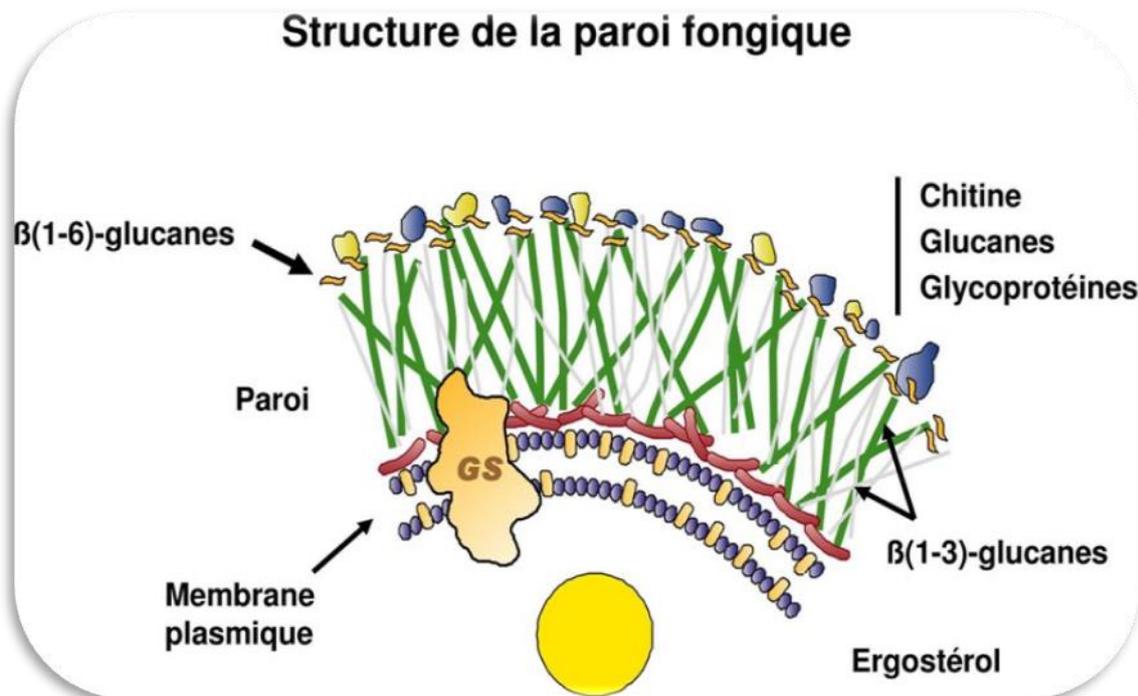


Figure N°1 : Les différents constituants de la paroi fongique[3]

2. Historique

Depuis les années 1980, les champignons ont été identifiés comme les principaux vecteurs de maladies humaines, en particulier chez les personnes immunodéprimées et les patients hospitalisés atteints de maladies potentiellement mortelles. En fait, depuis 1979, l'incidence annuelle de la septicémie fongique aux États-Unis a augmenté de plus de 200% [4]. Les espèces de *Candida* sont actuellement la quatrième cause d'infection de la circulation sanguine à nosocomiales aux États-Unis, étant responsable de 8 à 15% de toutes ces infections nosocomiales [5]. Le fardeau annuel total des candidémies (maladie invasive) aux États-Unis atteint 42 000 infections (29 infections pour 100 000 habitants par an ou 24 pour 10 000 sorties) [6]. Les infections fongiques invasives sont associées à une morbidité et une mortalité importantes. De ce fait, ces maladies ont une influence considérable sur la santé publique.

3. *Candida albicans*

Candida albicans (**Figure N°2**) est un champignon levuriforme du genre *Candida* et de la famille des saccharomycetaceae. *Candida albicans* appartient au groupe des champignons asexués dont la reproduction est essentiellement clonale. *Candida albicans* est un organisme diploïde qui possède 8 paires de chromosomes. Son hétérozygotie lui confère une grande capacité d'adaptation à divers milieux[7].

Le *Candida albicans* est naturellement constitutif de la flore de la muqueuse de l'être humain. Sa présence n'est pas pathologique[7]. Nous retrouvons ce champignon dans le tube digestif des adultes en bonne santé. Cependant, un déséquilibre hormonal ou du système immunitaire peut être la cause d'un champignon en multipliant de manière erratique, entraînant une variété de symptômes. On parle de candidose ou de mycose.



Figure N°2 : :Candida albicans[8]

3.1 Les facteurs de virulence

- Le dimorphisme (transformation de levure à champignon en fonction du milieu environnant).
- Les adhésines (grand nombre de récepteurs de surface permettant à C.albicans d'adhérer facilement aux cellules de son hôte).
- Les sécrétions enzymatiques.

Les infections à C.albicans peuvent être localisées sur la muqueuse génitale, buccale ou digestive. En outre, la prolifération de Candida albicans sur la peau est anormale et provoque des signes cutanés. Plus rarement, chez les patients immunodéprimés, C.albicans peut coloniser un ou plusieurs organes voire l'intégralité de l'organisme : nous parlons de candidose systémique. Dans ce cas de figure, le risque de décès avoisine les 40%[9].

3.2 rôle et localisation

Candida albicans est un champignon qui vit dans le corps humain et les animaux homéothermes. Il est présent au niveau des muqueuses buccales, digestives et génitales, se présentant sous forme de blastospores, considérées comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme de l'hôte. Chez le sujet sain, la levure se répartit différemment selon les sites de prélèvement, le réservoir principal reste le tube digestif [9] :

- peau (3%) ;
- vagin (13%) ;
- tractus ano-rectal (15%) ;
- cavité buccale (18%) ;
- estomac et duodénum (36%) ;
- le jéjunum et iléon (41%).

Ces chiffres sont à prendre avec précaution compte tenu du fait que les méthodologies de mesure ne sont pas toujours cohérentes et que les sites de mesure n'ont pas toujours une condition propice .

C.albicans avait donc un rôle invincible dans l'équilibre du microbiote. Toutefois, lorsque cet équilibre en sa forme commensale et les défenses immunitaires sont rompus, cette symbiose devient parasitaire. Il en résulte une maladie infectieuse appelée candidose[10].

3.3 Les facteurs de risques

Certains facteurs de risques exposent au développement de la candidose :

- les cures répétées d'antibiotiques.
- la prise de traitements qui altèrent l'immunité (corticoïdes, immunosuppresseurs, chimiothérapies, etc.).
- une immunodépression (d'origine congénitale, liée au VIH ou à une transplantation)[10].

Les mycoses vaginales, sont les candidoses les plus fréquentes, concernant 10 à 20% des femmes en période d'activité sexuelle[10]. Elles sont favorisées par :

- les modifications hormonales
- la prise de contraceptifs œstroprogestatif
- la transpiration
- les pantalons trop serrés
- les sous-vêtements qui ne sont pas en coton (et tout particulièrement les strings).
- le port de protège-slips
- une mauvaise hygiène
- les rapports sexuels prolongés

4. Manifestations cliniques

4.1 Fungemia candidiasis

La candidémie est définie comme la présence d'espèces de Candida dans le sang. C'est l'infection fongique de la circulation sanguine la plus courante chez les patients hospitalisés [11]. La mortalité est très élevée. Il atteint près de 50% dans certaines études[12]. Ces dernières années, il y a eu une augmentation du nombre d'espèces de Candida non albicans , ce qui pourrait poser un défi thérapeutique compte tenu des différents profils de sensibilité aux antibiotiques des différents Candida malgré le fait que Candida albicans reste l'espèce de Candida la plus courante à l'origine de la candidémie. Cette nouvelle tendance est probablement causée par le processus de sélection naturelle des espèces résistantes aux antifongiques les plus couramment utilisés.

4.2 Endocardite

L'endocardite infectieuse est une infection de l'endocarde, habituellement due à des bactéries (habituellement streptocoques ou staphylocoques) ou à des champignons. Elle peut entraîner de la fièvre, des souffles cardiaques, des pétéchies, une anémie, des accidents emboliques et des végétations endocardiques(**Figure N°3**). Les végétations peuvent conduire à une insuffisance ou une obstruction valvulaire, un abcès myocardique ou un anévrisme mycotique[13]. Le diagnostic nécessite la démonstration de la présence de microorganismes dans le sang et habituellement l'échocardiographie[13]. Cependant, il existe des divergences

d'opinions en ce qui concerne les options de traitement, en particulier lorsque les rapports de cas individuels détaillent le traitement réussi de l'endocardite avec des agents antifongiques seuls et soutiennent que la surveillance n'est pas nécessairement requise dans toutes les infections d'endocardite impliquant des dispositifs cardiaques protétique. Par exemple, un cas récurrent d'endocardite impliquant une valve mitrale prothétique a été traité sans succès avec de l'amphotéricine B, mais éliminé par dispersion colloïdale de l'amphotéricine B suivie de fluconazole pendant 8 mois [14].

La thérapie antifongique seule s'est également avérée efficace dans d'autres cas où la chirurgie n'a pas été choisie pour le traitement ou le patient n'était pas candidat à l'intervention chirurgicale [15]

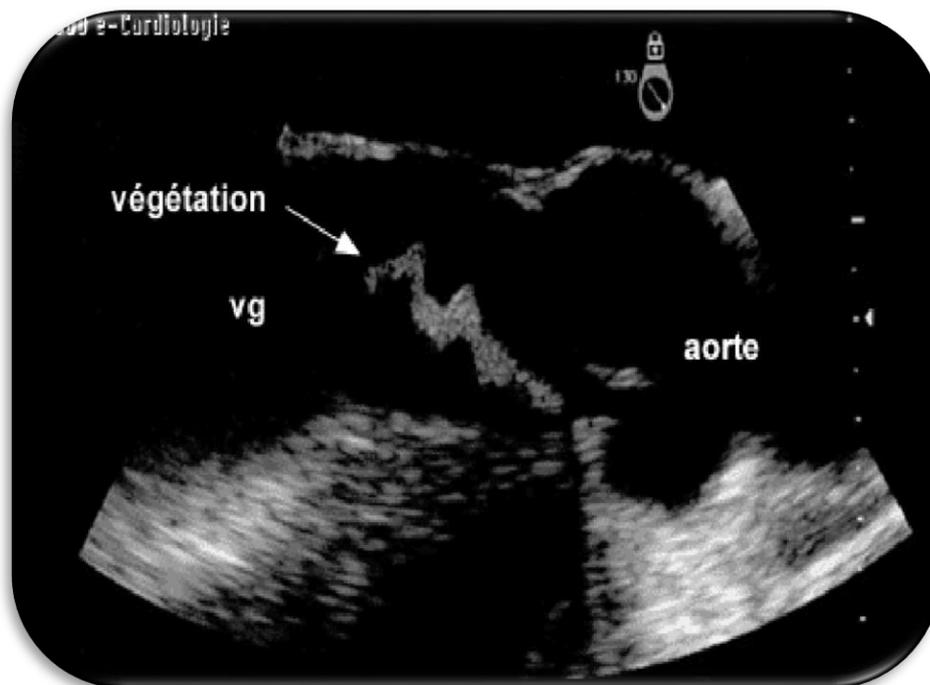


Figure N°3 :Image ETO d'une végétation endocardique[16].

4.3 Méningite

Une méningite(**Figure N°4**) est une inflammation des méninges, qui sont les membranes qui protègent le cerveau et l'épiderme. La cause la plus fréquente de cette inflammation est une infection virale (la rougeole, des oreillons, l'herpès ou de la grippe) ou bactérienne (la listériose ou de la tuberculose). Plus rarement (dans moins de 5 % des cas),

les méningites peuvent également être provoquées par un champignon ou un parasite microscopique[17].

Parmi les divers rapports portant sur les cas de méningite à *Candida* de 1966 à 1994, 116 infections (90,1 %) étaient dues à *C. albicans*, tandis que la méningite à *C. parapsilosis* n'est survenue que deux fois (1,6 %) [18]. De plus, un examen de la méningite à *Candida* chez les nouveau-nés au Texas entre 1989 et 1999 montre que sur 106 nouveau-nés atteints de candidose systémique, seulement 23 (21,7 %) ont développé une méningite à *Candida*, dont aucun n'était infecté par la *C. parapsilosis*[19].

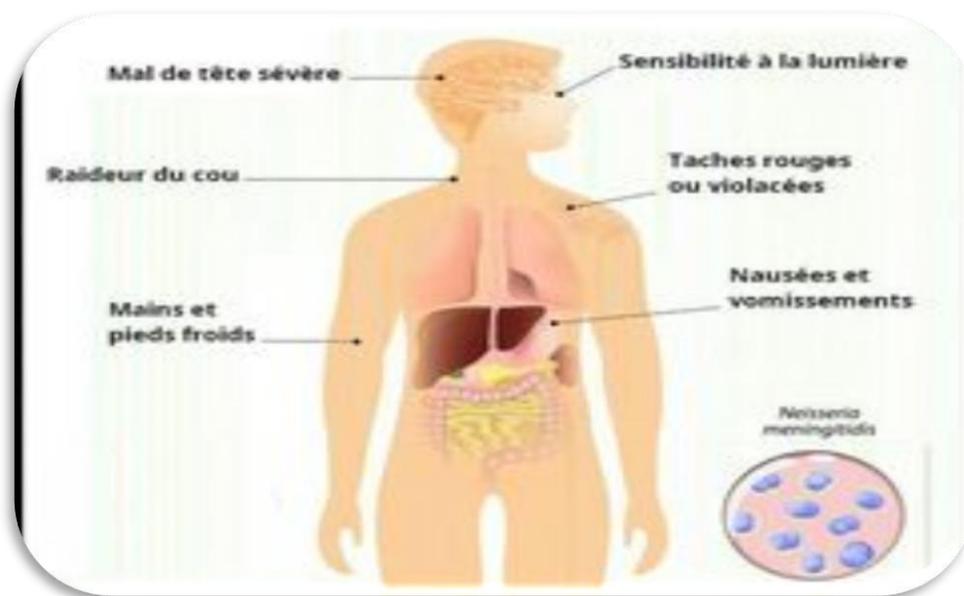


Figure N° 4 :La méningite et ses différents symptômes[20].

4.4 Péritonite

La péritonite(**Figure N°5**) est une maladie inflammatoire qui intervient au niveau de l'intestin et plus précisément au niveau de la péritoine avec laquelle les viscères de la cavité abdominale sont entourées.

Dans une étude de 1989 à 1998 portant sur 896 patients , 70% des 70 épisodes de péritonite fongique ont été causés par des espèces de *Candida* [21]. Sur 10 cas de péritonite fongique causée par des levures à Mexico entre 1997 et 2001, la *C. albicans* a été détectée trois fois, soit l'équivalent du nombre d'infections causées par *C. parapsilosis* [22].

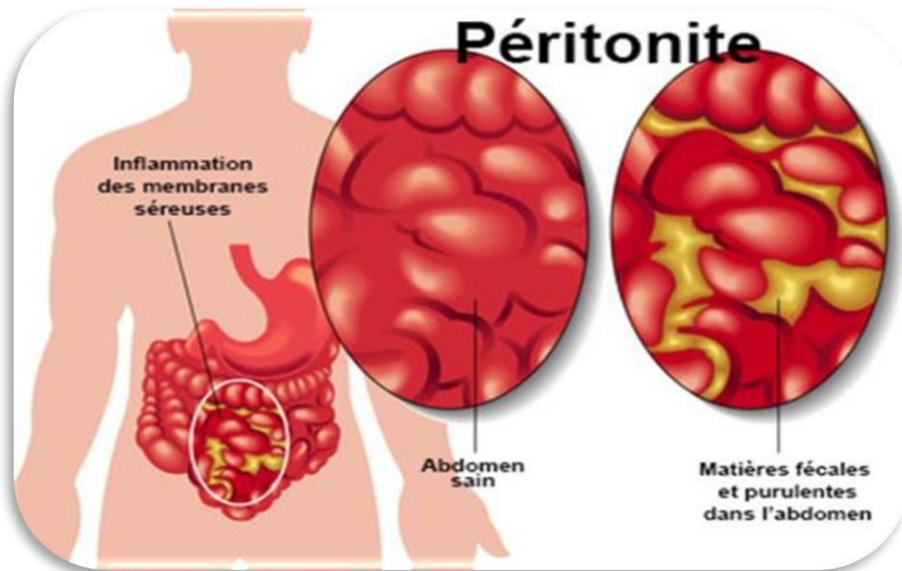


Figure N° 5 : Infection fongique de péritonite[23].

4.5 Arthrite

Le terme « arthrite » fait référence à un groupe d'affections inflammatoires qui affectent l'articulation et l'os, et s'accompagnent de douleurs modérées à sévères. Les pathologies aiguës ou chroniques et évolutives liées à l'arthrite concernent avant tout les adultes à partir de 40 ans, sachant que certaines formes peuvent toucher les enfants et les jeunes adolescents[24].

En 1992, seulement huit cas d'arthrite infectieuse due à la *Candida* avaient été identifiés, dont sept faisaient suite à l'instrumentation des articulations pour la mise en place d'une prothèse articulaire(**Figure N°6**), d'une injection articulaire ou d'une arthrocentèse [25].

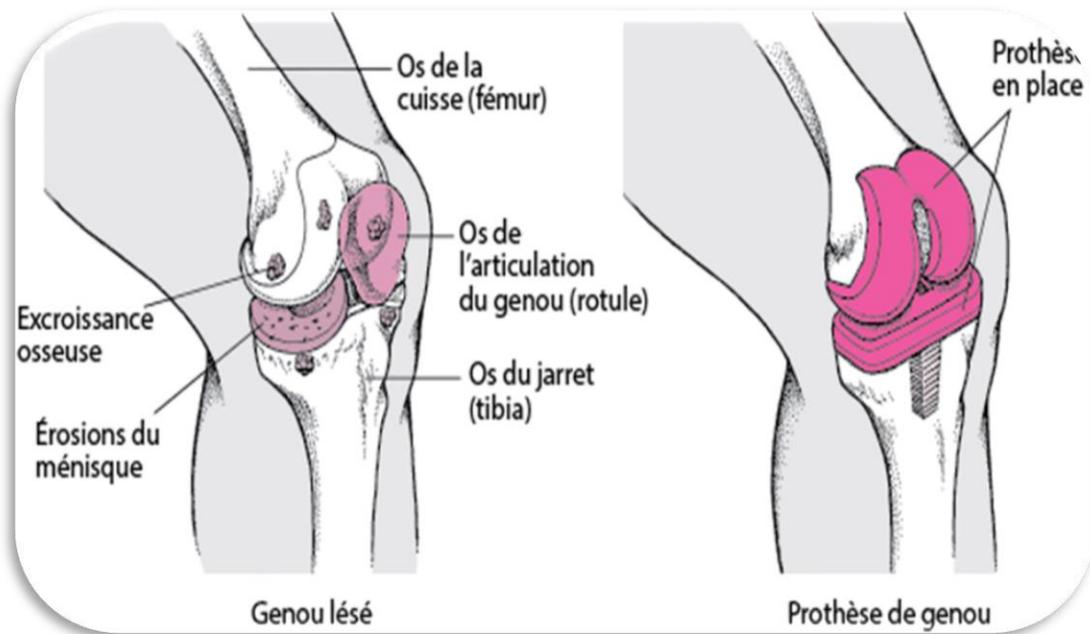


Figure N° 6 : arthrite prothétique au niveau de genou[26].

4.6 infections oculaires

L'endophtalmie(**Figure N°7**) est une infection oculaire contagieuse. Quand elle survient suite à une opération, l'endophtalmie est dite aiguë quand elle s'installe pendant la première semaine postopératoire, la forme subaiguë s'étend de la deuxième à la fin de la quatrième semaine postopératoire alors que la forme chronique débute après le premier mois[27]. Ainsi, l'endophtalmie postopératoire est quasiment toujours considérée comme une infection nosocomiale[27]. Les bactéries à GRAM positive et à GRAM négative sont les organismes les plus considérées comme des facteurs qui interviennent extrêmement dans l'endophtalmie. Cependant les champignons et les protozoaires peuvent aussi la provoquer mais avec un pourcentage inférieur aux autres facteurs.

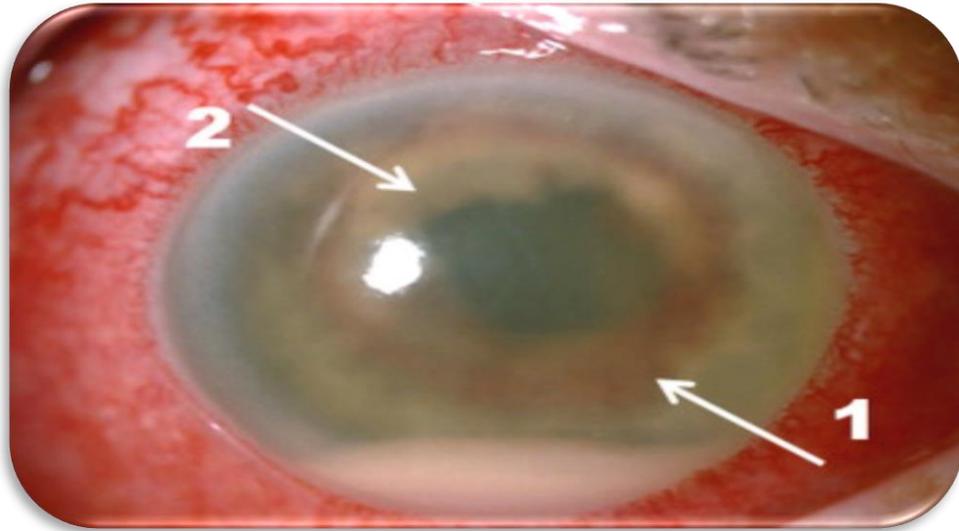


Figure N° 7 :Endophtalmie endogène[28].

4.7 Otomycose

L'otomycose est une infection relativement rare provoquant une otite moyenne (**Figure N°8**) ou externe (**Figure N°9**) (inflammation de l'oreille moyenne ou de l'oreille externe, respectivement); otorrhée blanche persistante ou incolore avec perforation du tympanum; œdème et érythème du résidu de la même brane tympanique; douleur à l'oreille; augmentation de la perte auditive; et des débris blanchâtres, cotonniers ou gras dans le conduit auditif externe, la membrane tympanique ou (après excision du cholestéatome) l'espace résiduel[29]. Des preuves récentes montrent que l'oreille moyenne des patients Immunocompétents souffrant d'inflammation hyperplasique chronique (polyploïde) est particulièrement sensible à l'infection par des champignons pathogènes, car l'augmentation de la production et de l'accumulation de mucus favorise la colonisation[29].

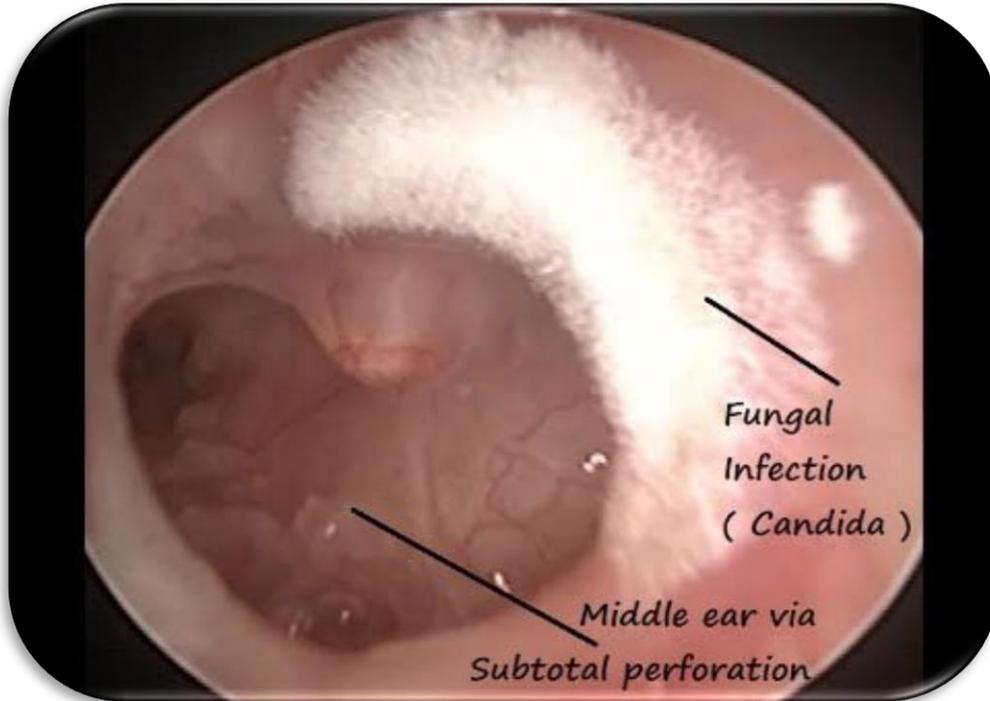


Figure N°8 : L'otite moyenne[30]



Figure N° 9 : L'otite externe[31]

4.8 Onychomycose

L'onychomycose(**Figure N°10**) est une infection des ongles causée par des dermatophytes, des levures et des moisissures. Selon certains chercheurs, l'onychomycoses peuvent représenter 30% de toutes les infections fongiques superficielles et jusqu'à la moitié de tous les troubles des ongles [32]. Les adultes, en particulier ceux de plus de 50 ans, sont plus sensibles aux infections en raison d'une augmentation de l'épaisseur de la plaque de l'ongle et d'une diminution du taux de croissance des ongles, mais des infections peuvent également survenir chez les nouveau-nés.



FigureN°10 :L'onychomycose[33].

4.9 Vulvovaginite

La candidose vaginale est la deuxième infection vaginale la plus courante aux États-Unis, après la vaginose bactérienne, et *C. albicans* est associée à 85% à 95% des cas[34].

Dans une étude portant sur 163 travailleuses du sexe ayant des antécédents de vaginose à candida sur une période de 4 ans en Espagne, les espèces

de Candida ont été isolées dans 1967 échantillons (18,5% du total), dont C. albicans représentait 89,3% des isolats tandis que la C. Parapsilose a été rarement identifiée (1,2%) [35].

5. Traitement

Le tableau N°1 suivant regroupe les différents types de la candidose les plus répandus ainsi que leurs traitements :

Tableau N°1 : méthodes de traitements des différents types de candidose[8].

Candidose	Traitement
Candidose cutanée	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antifongique local (imidazoles, polyènes, cyclopiroxolamine) pendant 2 à 4 semaines. ✓ Antifongique par voie générale (fluconazole) en cas d'immunodépression, de résistance au traitement ou de rechute
Candidose des ongles	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Crème antifongique ou solution filmogène (imidazoles, cyclopiroxolamine, amorolfine) jusqu'à la repousse de l'ongle ; ✓ Exérèse de l'ongle ; ✓ Antifongique par voie générale (fluconazole) en cas d'immunodépression, de résistance au traitement ou de rechute

<p>Mycose vaginale</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Antifongiques azolés : ovules, capsules, gel (butaconazole, éconazole, miconazole, fenticonazole, etc.) pendant 3 jours. ✓ Antifongique par voie générale (fluconazole) en cas d'immunodépression, de résistance au traitement ou de rechute.
<p>Candidose digestive</p>	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Traitement antifongique par voie générale (fluconazole), jusqu'à 15 jours en cas de candidose systémique.

6.Prévention

Puisque l'humidité est un facteur de bon augure pour la prolifération de la mycose, Il est incontestablement nécessaire de se sécher après la douche . De plus, il faut prendre l'hygiène alimentaire et corporelle en considération pour éviter la prolifération et la propagation du *Candida albicans* dans l'organisme.

Chapitre 2

L'enzyme dihydrofolate réductase et ses inhibiteurs

1. La dihydrofolate réductase (DHFR)

Le DHFR est une enzyme omniprésente dans tous les organismes. L'enzyme catalyse la réduction du 7,8-dihydrofolate (DHF) en 5,6,7,8-tétrahydrofolate (THF) par transfert d'hydrure stéréospécifique du cofacteur NADPH à l'atome C6 du cycle pterine avec protonation concomitante à N5[40] (**Figure N°11**). La réduction du folate en DHF est également catalysée dans plusieurs organismes, bien qu'elle soit moins efficace.

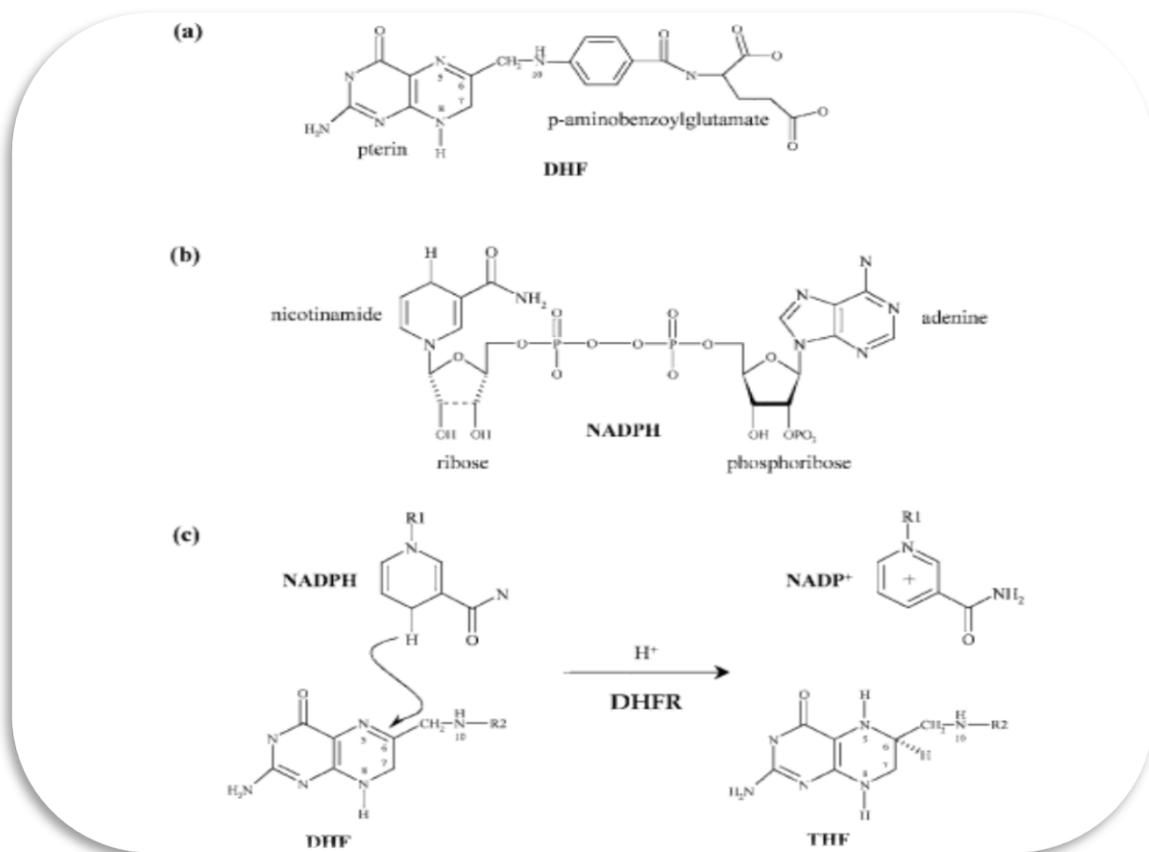


Figure N°11 : Réaction catalysée par la dihydrofolate réductase. (a) Le substrat 7,8-dihydrofolate (DHF), (b) cofacteur NADPH et (c) la réaction catalysée par le DHFR [36].

Le DHFR joue un rôle central dans le maintien des pools cellulaires de THF et de ses dérivés, qui sont essentiels à la synthèse de purine et de thymidylate (**Figure N°12**) et aussi même à la production de l'ADN et les protéines et donc à la croissance et à la prolifération cellulaires.

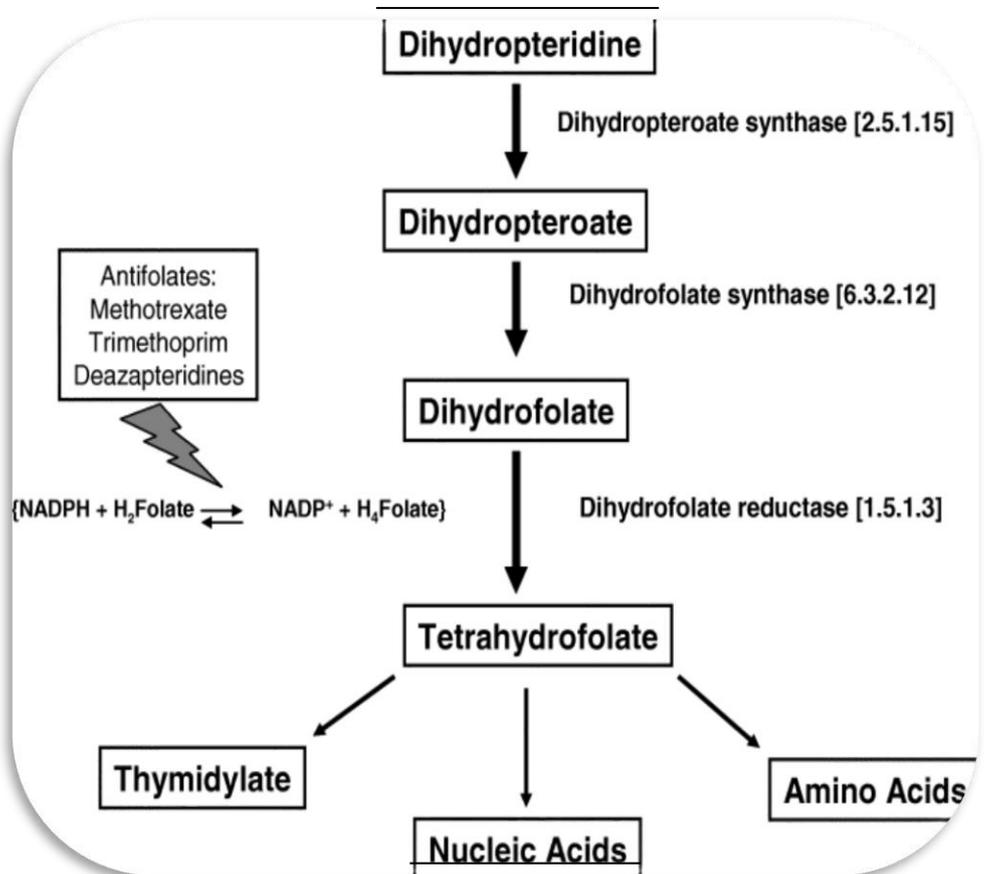


Figure N°12 : Les étapes de synthèse de thymidylate et les acides nucléiques et aminés dont le dihydrofolate réductase est l'enzyme clé [37].

2. Structure enzymatique

Une feuille centrale à huit brins bêta-plissée constitue la principale caractéristique du repliement de l'épine dorsale polypeptidique du DHFR [38]. Sept de ces brins sont parallèles et le huitième est antiparallèle. Quatre hélices alpha relient des brins bêta successifs [39]. Les résidus 9 à 24 sont appelés « Met20 » ou « boucle 1 » et, avec d'autres boucles, font partie du sous-domaine principal qui entoure le site actif [40]. Le site actif est situé dans la moitié N-terminale de la séquence, qui comprend un dipeptide Pro-Trp conservé; il a été démontré que le tryptophane est impliqué dans la liaison du substrat par l'enzyme [41] (**Figure N°13**).

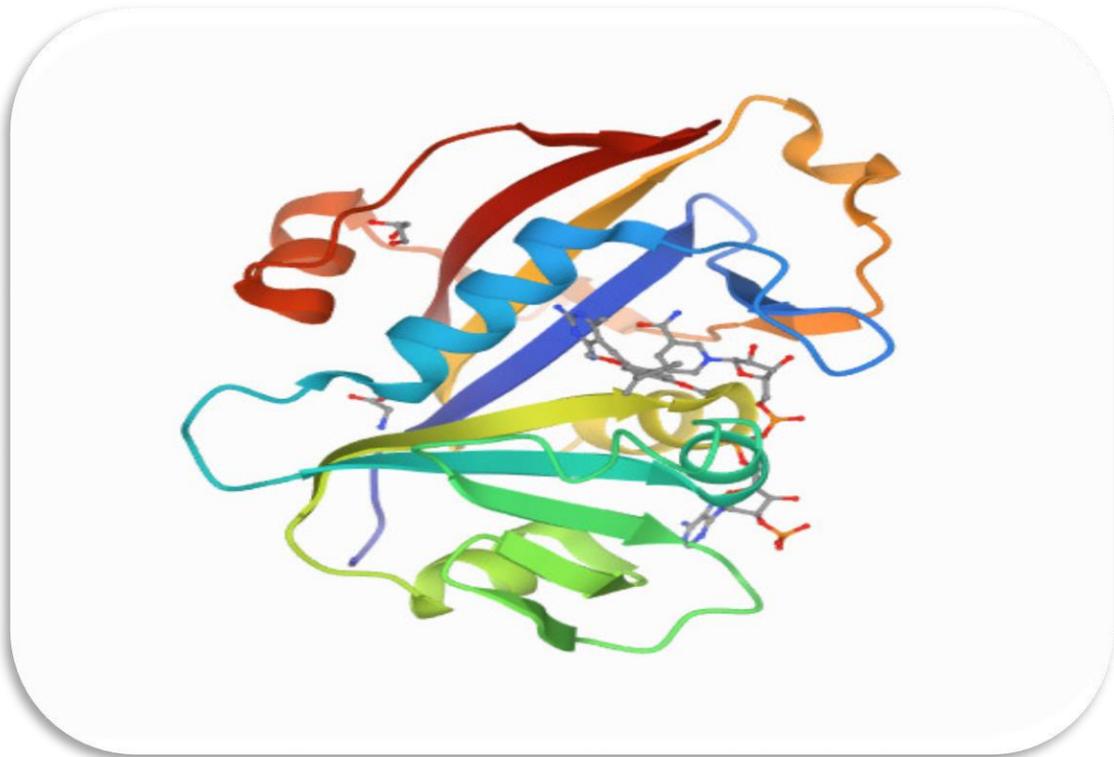


Figure N°13: Structure de dihydrofolate réductase de *Candida albicans*.

3. Les inhibiteurs de la DHFR

Le DHFR est la seule source de THF et, en tant que tel, est un talon d'Achille de cellules proliférant rapidement. L'enzyme est la cible de plusieurs médicaments anticancéreux et antibiotiques importants. En effet, une partie de l'impulsion d'il y a plus de 40 ans pour les études menant à la découverte du DHFR était la recherche de la cible thérapeutique du médicament anticancéreux méthotrexate (MTX) [42]. Le gène DHFR est également une cible potentielle pour le traitement MTX de la polyarthrite rhumatoïde.

3.1 Méthotrexate

Le méthotrexate (MTX)(Figure N°14), analogue de l'acide folique, a été le premier médicament qui ait permis d'obtenir des rémissions de leucémies et qui ait été efficace dans le traitement du choriocarcinome[43]. Il forme un complexe ternaire inactif avec la DHFR et le NADPH.

Le MTX est un inhibiteur de la dihydrofolate réductase (DHFR) présent dans les bactéries, les cellules tumorales et les tissus normaux. L'inhibition de la DHFR, en empêchant la réduction de l'acide folique, précurseur inactif, en acide tétrahydrofolique puis en acide folinique biologiquement actif, perturbe la synthèse des bases puriques, adénine et guanine, et d'une base pyrimidique, la thymidine. Les traitements par des doses très élevées de méthotrexate, comme celles que l'on utilise dans certains lymphomes et les ostéosarcomes, nécessitent le maintien d'une diurèse élevée et alcaline et l'administration, 24 ou 36 heures après l'arrêt de la perfusion de méthotrexate, de fortes doses d'acide folinique pour contrecarrer la toxicité du méthotrexate[43].(Figure N°15)

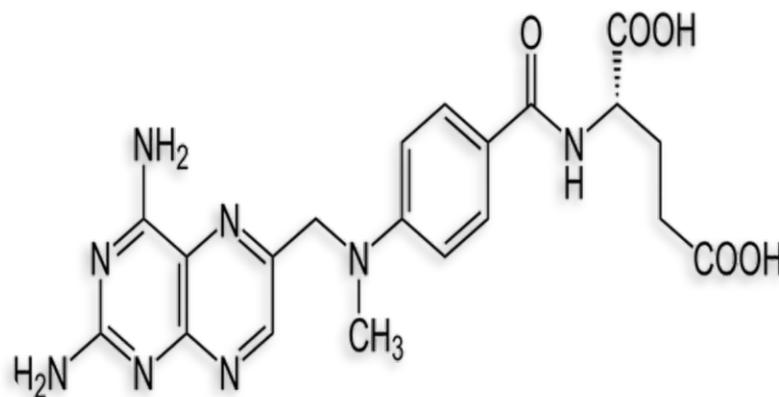


Figure N°14: Structure du méthotrexate

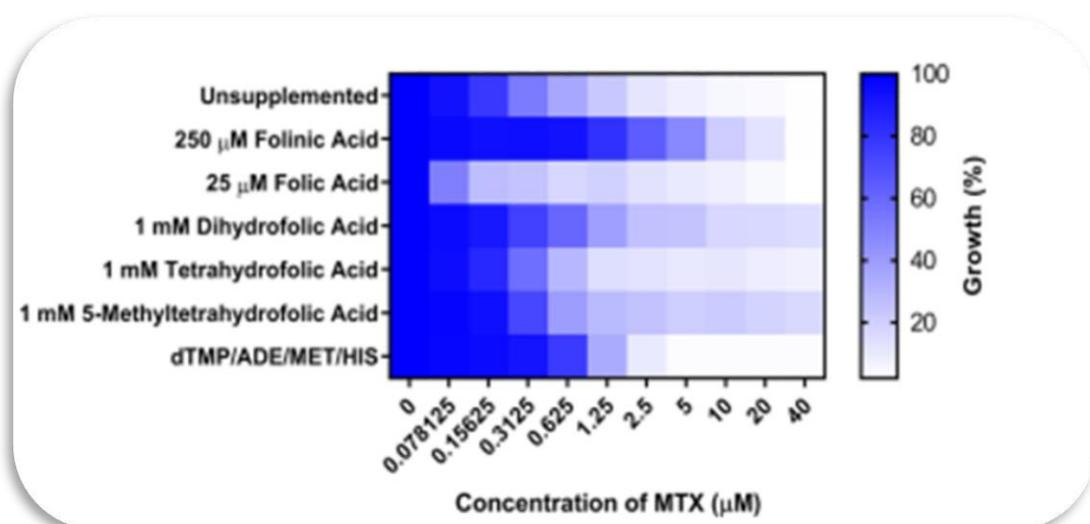


Figure N°15 : L'excès d'acide folinique restaure partiellement la croissance de Candida albicans en présence méthotrexate[44].

3.2 Antifolates liés au propargyle

Des antifolates liés au propargyle ont été développés dans le cadre d'une initiative de découverte de médicaments. Les antifolates liés au propargyl inhibent le DHFR de *Candida albicans* (CaDHFR) et *Candida glabrata* (CgDHFR) avec des valeurs de concentration d'inhibition de 50 % (IC50) comprises entre 17 nM et 11,9 µM et 0,55 nM et 2,7 µM, respectivement [45].

En outre, ils présentent des niveaux de sélectivité sur l'enzyme DHFR humaine compris entre 0,1 et 2300 fois [46].

3.3 Triméthoprim

Le triméthoprim (**Figure N°16**) inhibe la dihydrofolate réductase (DHFR) des micro-organismes. Mais, lorsque il demeure seul lors de son usage, la résistance à son activité se développe rapidement. Son utilisation est tellement isolée (sans autre antibiotique) qu'elle est limitée.

Pour renforcer son action et s'opposer au développement de la résistance, le triméthoprim est associé à un sulfamide qui inhibe la synthèse d'acide folique [43]. L'association utilisée, le plus souvent triméthoprim-sulfaméthoxazole, a un double effet d'inhibition de l'acide folique synthase et la dihydrofolate réductase, ce qui en fait un antibiotique efficace contre une variété de germes responsables d'infections urinaires, pulmonaires et intestinales.

L'association triméthoprim-sulfaméthoxazole est généralement bien tolérée, mais on observe chez certains malades traités par elle des leucopénies, thrombopénies, anémies, agranulocytoses, évocatrices d'un trouble de la maturation cellulaire, probablement secondaire à une inhibition de la DHFR humaine [43].

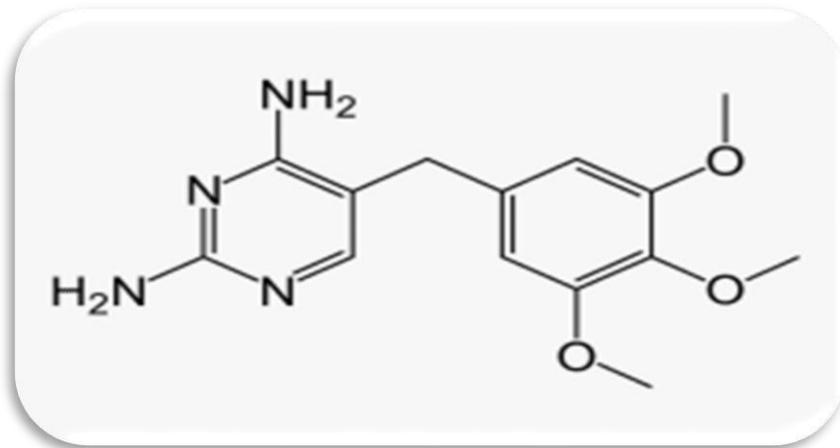


Figure N°16 : Structure du triméthoprime

Ces inhibiteurs ont un effet remarquable en tant que répréresseurs de la synthèse d'ADN ça ce qui tend vers la répression de la production de la chaîne peptidique en affectant par conséquence la croissance cellulaire(**Figure N°17**).

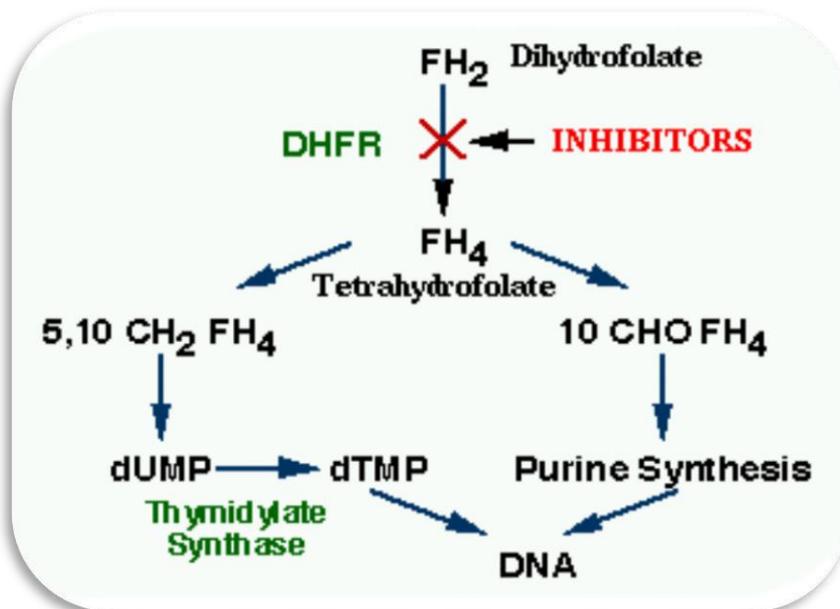


Figure N°17 : Mécanisme d'action des antifolates[47].

Les méthodes *in silico* sont aujourd'hui très utilisées dans le domaine pharmaceutique pour la recherche et la découverte de nouveaux inhibiteurs sélectifs d'une cible thérapeutique donnée.

C'est sur ce même principe que repose notre travail de recherche de nouveaux inhibiteurs de la DHFR basé sur le criblage virtuel de la chimiothèque PubChem faisant appel au programme de docking moléculaire surflex.

Chapitre 3

Docking moléculaire

1.Introduction

La prolifération des cibles potentielles nécessite le développement de nouvelles méthodes capables de concevoir plus efficacement de nouvelles molécules actives, y compris des recherches pharmaco- et toxicogénomiques plus approfondies, la médecine expérimentale et, bien sûr, la chimie computationnelle. On trouve le criblage virtuel, la conception de novo de molécules actives, évaluation de la ressemblance à un principe actif, et la détermination des interactions moléculaires (docking) entre le principe actif et sa cible biologique, le plus souvent une protéine[48].

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir de molécules isolées, ce qui est nettement plus abordable à mettre en œuvre, moins coûteux et plus rapide. Les logiciels de docking sont utiles en biologie sous prétexte que la majorité des principes actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible thérapeutique, généralement une protéine (récepteur), pour modifier le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée. Ce travail se termine d'ailleurs par des applications du docking dans l'hétérodoxie de nouvelles molécules actives.

L'introduction du criblage virtuel a offert une nouvelle voie d'identification de ligands. Le criblage virtuel basé sur la structure 3D de la protéine consiste à arrimer et à prédire l'affinité d'un grand nombre de molécules, collectées en chimiothèques, pour le site actif de la cible thérapeutique étudiée. Les molécules les plus prometteuses sont sélectionnées, achetées ou synthétisées puis testées expérimentalement.

2. Les 3 étapes d'un criblage virtuel

Tout criblage virtuel se décompose en trois étapes d'égale importance:

- ✓ la mise au point de la chimiothèque de départ
- ✓ Criblage par docking à haut débit
- ✓ Post-traitement des données

2.1 La mise au point de la chimiothèque de départ.

2.1.1 Choix de la chimiothèque

Deux types de chimiothèques peuvent être utilisés à des fins de criblage virtuel : des collections de criblages (molécules disponibles) et des collections virtuelles (molécules à synthétiser). Toute compagnie pharmaceutique dispose maintenant sous forme physique (microplaques) et électronique de collections de criblage propriétaires pouvant aller jusqu'à 2 millions de molécules[49]. Plusieurs collections de criblages commerciales ou gratuites sont disponibles et constituent une source majeure de molécules bioactives, notamment dans le monde académique.

De manière générale, l'analyse de ces collectes révèle que le pourcentage de candidats pour chacune de ces sources de criblage reste variable(**Figure N° 18.a**). Les collections issues de chimie combinatoire sont vastes mais peu diverses en châssis moléculaires (**Figure N° 18.b**)[50]. Des collections de moindre taille présentent également une faible diversité. Seul un petit nombre de collections (telles que la Chimiothèque Nationale) présente un plus grand rapport taille/diversité[50].

Par conséquent, le choix d'une chimiothèque est essentiel et sera déterminé par le projet. Plutôt que de sélectionner une collection unique, il est préférable de sélectionner les molécules les plus diversifiées en termes de châssis moléculaires à partir de sources variées en évitant au maximum les redondances.

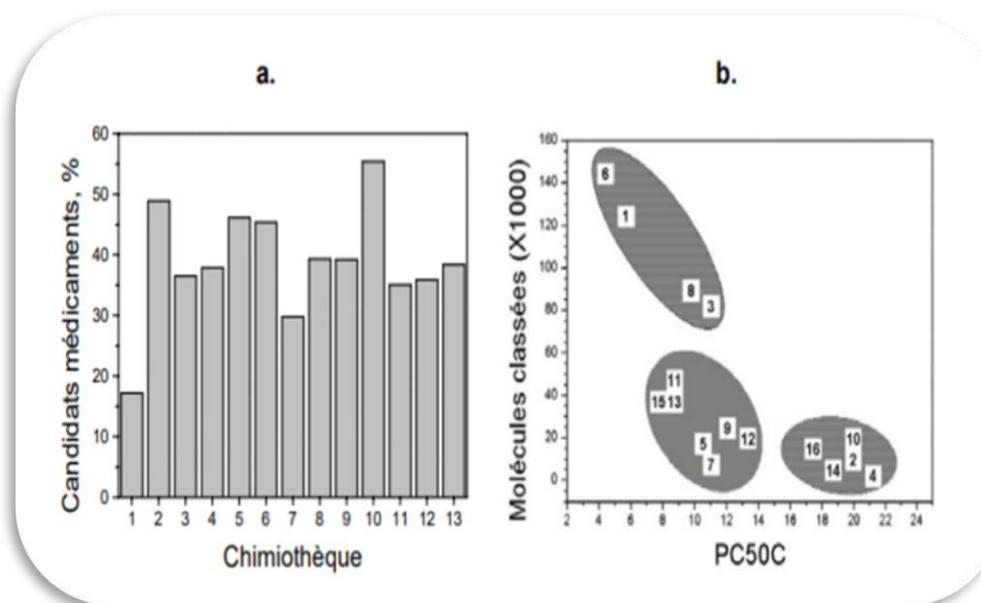


Figure N°18 : Analyse de collections de criblage. **a)** Potentiel en candidats médicaments de collections de criblage commerciales (1 à 7 et 9 à 13) et publique (8 : Chimiothèque Nationale) **b)** Diversité en châssis moléculaire: Pourcentage de châssis couvrant 50% des candidats médicaments (métrique PC50C) de la chimiothèque (1 à 3 et 5 à 16, chimiothèques commerciales ; 4, Chimiothèque Nationale)[51].

2.1.2 Filtrage et préparation finale de la chimiothèque

Les candidats médicaments potentiels doivent être retenus, c'est pourquoi il est inéluctable de faire filtrer la chimiothèque par un certain nombre de descripteurs comme le montre la **Figure N°19** suivante et de ne prendre en considération que les molécules d'intérêt.

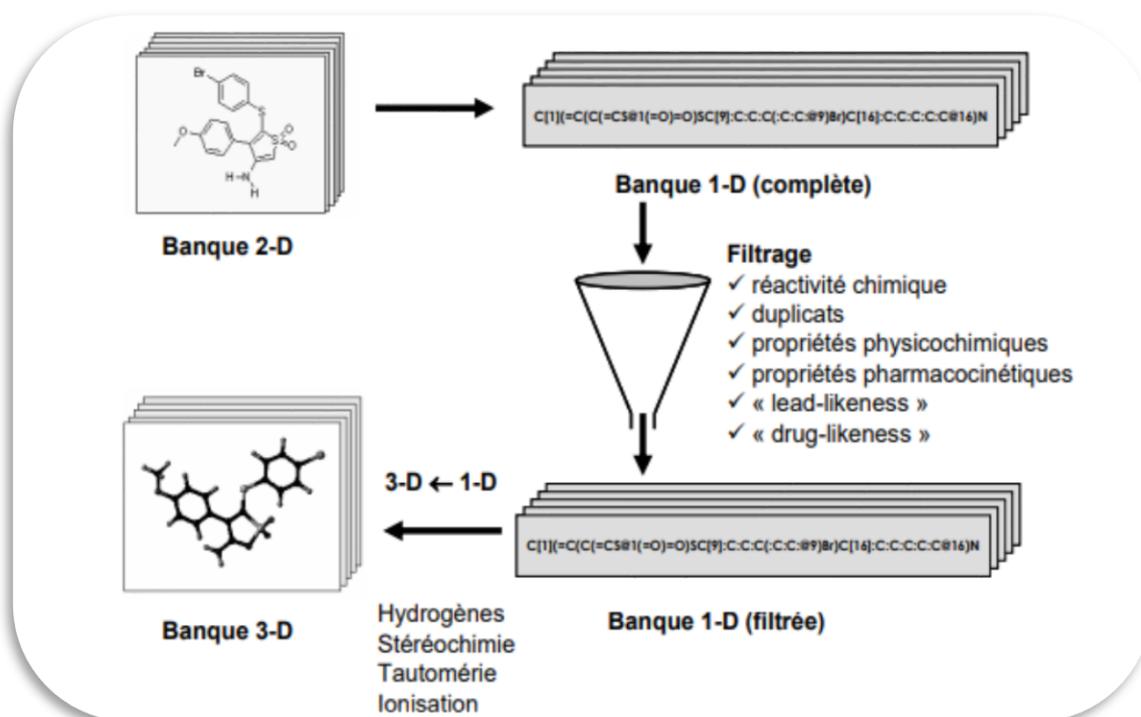


Figure N°19 : Différentes phases de la préparation de la chimiothèque. Les termes « lead-likeness » et « drug-likeness » désignent les propriétés admises généralement (selon des modèles statistiques) pour être des têtes de séries (lead) ou des médicaments (drug).

Ces filtres sont destinés à éliminer les molécules chimiquement réactives, toxiques, métabolisables, présentant des propriétés physicochimiques inadéquates susceptibles d'être des touches dites permissives, ou pouvant interférer avec le test de criblage expérimental . La dernière étape de préparation est donc de convertir ce format 1-D en format 3-D en y incluant une représentation atomistique complète[50].

2.2 Criblage par docking à haut débit

Le docking a pour but de prédire à la fois la conformation active et l'angle de chaque molécule de la chimiothèque choisie par rapport à la cible d'intérêt. Généralement, la recherche se concentre sur le site actif car il peut être déterminé expérimentalement (par exemple, par mutagenèse dirigée). Il est important de prendre en compte à ce stade la notion de débit que l'on veut atteindre. Il faudra en effet considérer le meilleur compromis entre rapidité et précision. En général, le docking à haut débit nécessite une rapidité voisine de 1-2 minute/ligand. De nombreux programmes de docking sont disponibles [59](Tableau N°2).

Tableau N°2 :Principaux programmes de docking moléculaire[52].

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

Ces méthodes utilisent le principe de complémentarité stérique (Dock, Fred) ou d'interactions moléculaires (AutoDock, FlexX, Glide, Gold, ICM, LigandFit, Surflex) afin de placer un ligand dans le site actif d'une cible. En général, la protéine est considérée comme rigide, alors que la flexibilité du ligand n'est prise en compte que jusqu'à une quinzaine de rotules.

En règle générale, de nombreuses poses de ligand sont générées et triées dans un ordre de probabilité décroissant basé sur une fonction d'évaluation qui tente d'approximer l'énergie libre de liaison du ligand à sa cible (affinité).

La « meilleure solution » n'est pas toujours celle prédite comme la plus probable par la fonction d'évaluation ce qui complique singulièrement l'analyse prédictive de solutions de docking [53]. Ces imperfections peuvent être expliquées par plusieurs raisons donc le traitement peut s'avérer plus ou moins compliqué(**Tableau N°3**).

Tableau N°3 : Principales causes d'erreurs lors d'un docking moléculaire[50].

Causes d'erreurs	Traitement
Site actif dénué de cavité	impossible
Flexibilité de la protéine	très difficile
Influence de l'eau	très difficile
Imprécision des fonctions d'évaluations	très difficile
Interactions non usuelles	difficile
Flexibilité du ligand	difficile
Pseudosymétrie du ligand	difficile

Mauvais jeux de coordonnées (protéine)	facile
Mauvais types atomiques (ligand, protéine)	facile

C'est pourquoi le docking moléculaire est une technologie délicate à mettre en œuvre car elle doit être utilisée et ajustée régulièrement en fonction de l'environnement dans lequel le projet est mené. Il est néanmoins possible de fournir des guides en fonction du type de protéine, site actif et ligand(s) à ancrer [53].

Les méthodes dépendantes de la température offrent une bonne précision, mais elles ne sont applicables qu'à une seule paire de ligands (prédiction de différence d'énergie libre). En revanche, des fonctions empiriques peuvent être utilisées à des débits plus élevés (> 100 000 molécules) mais avec une précision assez faible (de l'ordre de 7 kJ/mol, ce qui équivaut à un pK et demi en affinité) (Figure N°20).

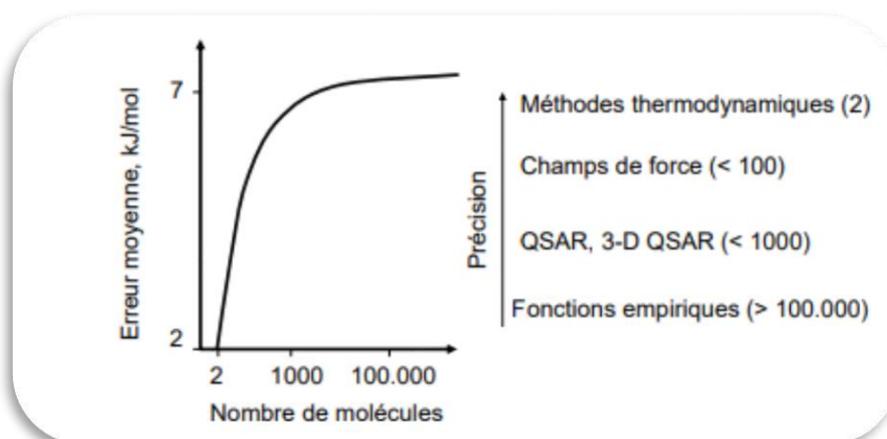


Figure N°20 : Méthodes de prédiction d'énergie libre (affinité) de liaison d'un ligand[51].

2.3 Post-traitement des données.

Reconnaissant que certaines fonctions d'évaluation sont notoirement peu fiables, la meilleure stratégie pour augmenter le pourcentage de vrais positifs lors d'un criblage virtuel est d'essayer de détecter les faux positifs. Ceci n'est possible qu'à condition d'analyser les sorties de criblage avec une méthode chémoinformatique additionnelle[51]. Plusieurs options sont disponibles. La méthode la plus simple consiste à renoter les postures obtenues à l'aide de fonctions d'évaluation différentes de celles utilisées lors du docking. Chaque fonction a des défauts, et une analyse de consensus peut détecter des faux positifs tels que des contacts non

communs entre deux ou trois fonctions basées sur des principes physico-chimiques différents (Figure N°21).

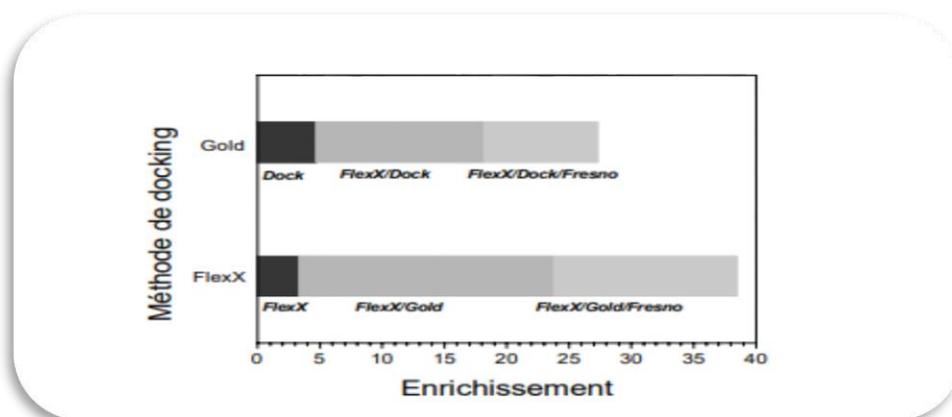
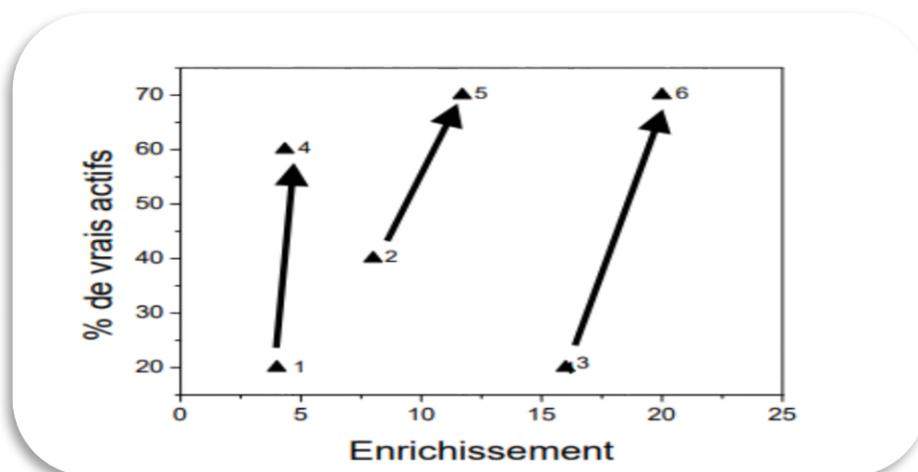


Figure N°21 : Influence de procédure d'évaluation consensus sur l'enrichissement en vrais actifs, par rapport à un criblage au hasard (une seule fonction: barre noire, deux fonctions: barre gris foncé, trois fonctions: barre gris clair). Les fonctions d'évaluations utilisées sont mentionnées en italiques[54].

La sélection finale est composée du top 5% des différentes fonctions, permettant un vrai résultat positif. Cette méthode présente l'avantage d'ajuster une stratégie de criblage en fonction de données expérimentales connues. Il suffit de préparer une chimiothèque test ou un petit nombre de vrais actifs (de l'ordre d'une dizaine par exemple) et de la mélanger à un grand nombre de molécules supposées inactives (un millier par exemple), d'ancrer la chimiothèque avec divers outils de docking, et de rescorer les poses obtenues avec différentes fonctions de scoring[51]. L'analyse systématique de l'enrichissement vrai positif se fait en calculant la quantité d'actifs vrais dans différentes listes d'évaluation déterminées par scoring simple ou multiple. Cette technique ne peut être appliquée en absence de données expérimentales (connaissance de plusieurs vrais actifs chimiquement divers) si bien qu'il faut dans ce cas mettre en œuvre des stratégies plus générales pour éliminer les faux positifs: détection de ligands insuffisamment enfouis; raffinement par minimisation énergétique des poses de docking; docking consensus par divers outils; docking sur des conformations multiples de la cible ; rescoring de poses multiples[55]. Ces approches ne garantissent pas une application large à divers projets de criblage sous prétexte qu'il sont très compliqués à appliquer.

Une stratégie de post-traitement plus simple mais efficace consiste à appliquer un traitement statistique aux molécules de la chimiothèque regroupées de façon «

quasi phylogénétique » par châssis moléculaire [56]. Plutôt que de se focaliser sur des scores individuels, il suffit d'examiner leur distribution parmi des classes chimiques homogènes. Cela permet d'identifier les faux négatifs (molécules actives qui ont été misancrées et/ou brûlées) plutôt que les molécules (**FigureN°22**).



FigureN°22 : Influence de la stratégie d'analyse de données sur l'enrichissement en actifs, par rapport à un criblage au hasard, à partir d'un même jeu de données de docking (10 antagonistes du récepteur V1a de la vasopressine « enfouis » dans une base de 1.000 molécules). **1** : Sélection des 5 premiers pourcents ancrés et scorés par Gold; **2** : Sélection de 5 premiers pourcents ancrés et scorés par Surfex; **3** : Sélection des touches communes aux listes 1 et 2; **4** : sélection de châssis dont 60% des représentants présentent un score Gold supérieur à 37,5; **5** : sélection de châssis dont 60% des représentants présentent un score Surfex inférieur à -22; **6** : sélection de châssis dont 60% des représentants présentent un score Gold supérieur à 37,5 et inférieur à -22. Les châssis moléculaires ont été calculés par le logiciel ClassPharmer (Bioresaon, Santa Fe, USA). Les flèches indiquent le gain enregistré dans la sélection de vrais actifs par analyse des châssis moléculaires (singletons exclus)[57].

3. Outils du docking moléculaire

Il existe déjà plus de 40 programmes de docking moléculaire (logiciels). Ces programmes sont généralement associés à des algorithmes spécifiques et leur protocole est composé de deux étapes:

La première étape dite **docking** : permet au ligand de manipuler au niveau de son récepteur spécifique en prenant plusieurs positions et plusieurs conformations jusqu'à ce qu'il trouve celle la plus propice .

La deuxième étape, dite **scoring** : permet d'évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées .

3.1 Récepteur

L'accèsibilité des structures 3D des protéines est possible en ligne via la banque de données PDB («Protein Data Bank», en anglais.). La PDB contient plusieurs structures dont la majorité a été résolue par cristallographie au rayon X et RMN alors qu'il n'y'ait qu'une partie infime qui est définie par microscopie électronique. Il est à noter que la plupart des structures disponibles dans la PDB sont des protéines.

Chaque fichier pdb contient diverses informations sur la protéine telles que le nom du récepteur, l'équipe qui a résolue la structure, la méthode expérimentale, ...etc. On y trouve également des données sur les hétéroatmes(ligand,métaux,résidus,résidus modifiés,...etc.), la structure primaire, la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée .

Certaines protéines ne sont pas disponibles dans la PDB mais il est possible de construire la structure 3D de la cible souhaitée, en faisant appel à la modéliation par homologie.

3.2 Ligands

Pour réaliser le docking moléculaire, Le ligand doit être sous la représentation 3D. Si le ligand provient de la littérature, sa structure peut être représentée en 3D en utilisant différents programmes de construction moléculaire et d'optimisation de la géométrie tels que ChemDraw, Arguslab, Titan et autres. Chacun de ces programmes possède une banque d'atomes qui vous permet d'ébaucher le ligand avec l'état d'hybridation de chaque atome ainsi que les liaisons simples, doubles ou triples. Le ligand obtenu dans la représentation 3D est enregistré dans un fichier sous l'un des formats pdb ou mol2 pouvant être utilisé et lu par un programme de docking moléculaire.

Un autre moyen d'obtenir la structure chimique tridimensionnelle d'un ligand est de faire appel à la PDB ou aux chimiothèques dont certaines sont gratuites et d'autres commerciales. La PubChem par exemple est une banque de données de molécules chimique gratuite gérée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI), branche de la bibliothèque nationale de médecine des Etats-Unis sous l'autorité de la National Institutes of Health (NCI). La PubChem répertorie plusieurs millions de composés en mettant en ligne, gratuitement, pour chaque substance une grande quantité de données de divers ordres : chimique, biochimique, pharmacologique, production, toxicologie, environnemental...etc.

3.3 Programmes de docking moléculaire

Plus de 30 logiciels de docking moléculaire sont actuellement disponibles qu'ils soient commerciaux ou libres. Ces programmes présentent des algorithmes de recherche et des fonctions de score variés[58](Figure N°23)

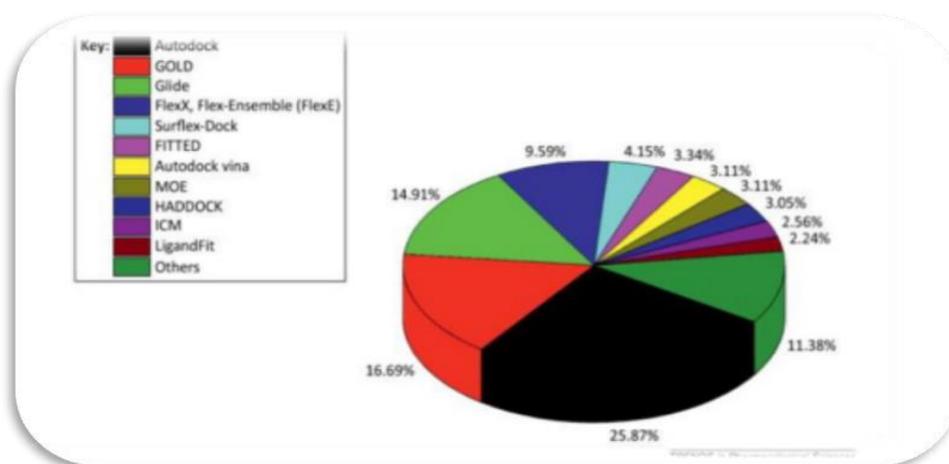


Figure N° 23 : Les programmes de docking les plus cités[59].

Le logiciel Surflex est celui qu'on a choisi dans notre travail .

Surflex est un programme d'amarrage moléculaire qui est apte de prédire le mode d'interaction et l'affinité entre un ligand et son cible d'intérêt .

4. Les interactions protéines-ligands

Le docking moléculaire met en jeu un certain nombre d'interactions dont les plus importantes vont être décrites plus bas.

4.1 La liaison hydrogène

La liaison hydrogène(Figure N°24) intervient lorsque dans une molécule l'atome d'hydrogène est uni à un atome A très électronégatif (comme l'oxygène ou le fluor). Il s'ensuit que l'unique électron de l'hydrogène se déplace vers l'atome A, ce qui fait de l'hydrogène un pôle positif capable d'attirer le doublet libre d'un autre atome électronégatif B d'une molécule voisine[60].

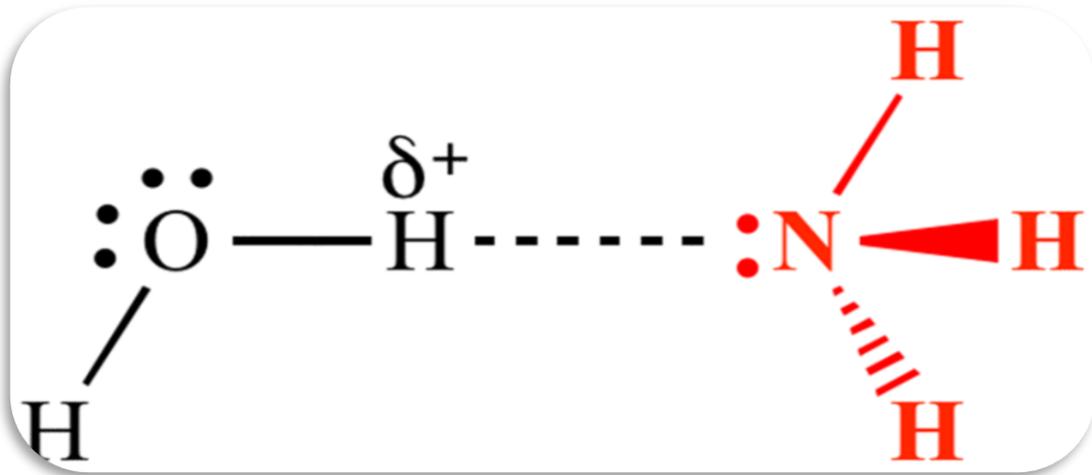
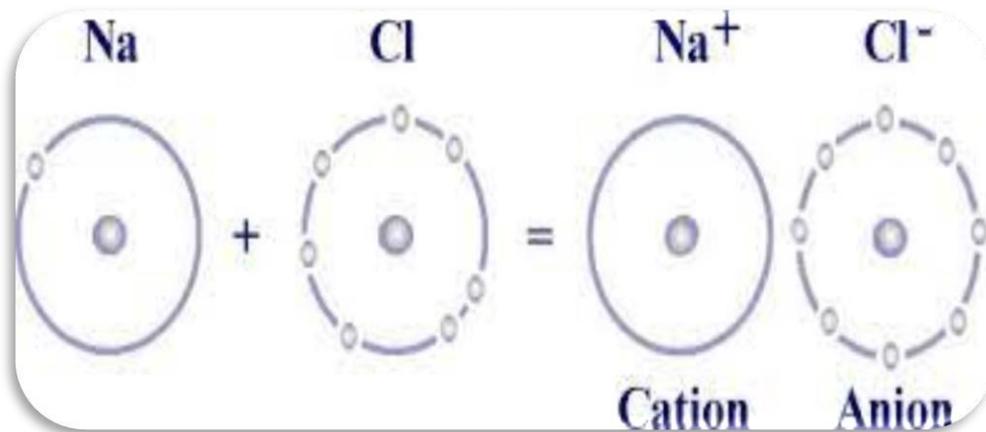


Figure N°24 : Liaison hydrogène entre la molécule d'eau et l'ammoniac[61].

4.2 La liaison ionique

Les liaisons ioniques(Figure N°25) se forment entre des atomes possédant une grande différence d'électronégativité. En outre, plus celle-ci est grande, plus une liaison a de probabilité d'être ionique, par exemple entre des atomes métalliques donneurs d'électrons -- qui deviennent alors des ions chargés positivement (cation) -- et de faible électronégativité, et des atomes non métalliques accepteurs d'électrons -- qui deviennent alors des ions chargés négativement (anion) -- et d'électronégativité élevée[62].



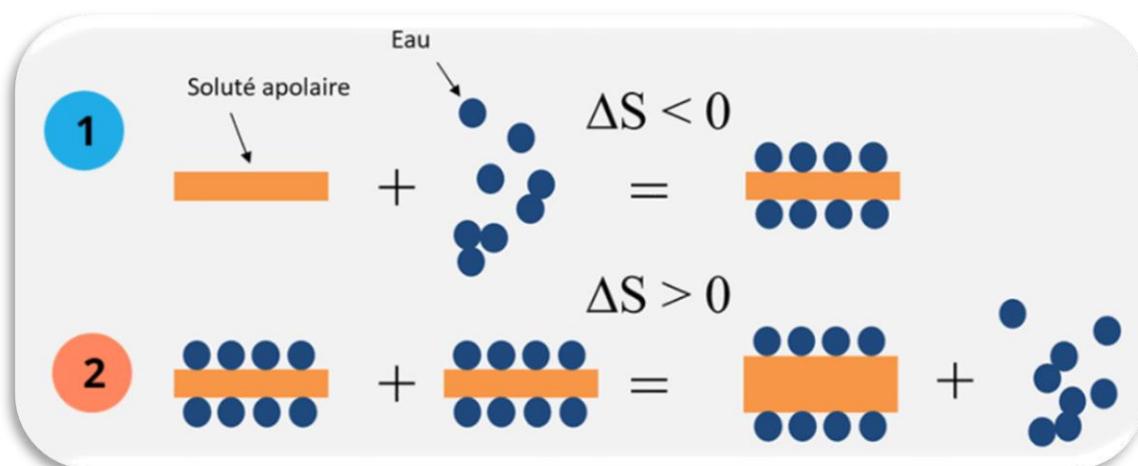
FigureN°25 : La liaison ionique entre les composants essentiels du sel de table (Na+Cl-)[63].

4.3 L'interaction hydrophobe

L'interaction hydrophobe(**FigureN°26**) concerne des molécules apolaires présentes en solution aqueuse. Il s'agit d'un processus entropique, qui se produit spontanément en 2 étapes[64] :

Étape1 : La solution apolaire est dissoute par les molécules d'eau, ce qui entraîne une augmentation de l'ordre des molécules d'eau dans l'environnement, abaissant l'entropie (entropie négative).

Étape2 : Deux molécules apolaires vont interagir (par interaction hydrophobe) pour provoquer une réorganisation des molécules d'eau qui les entourent pour les solvater - cela libère de l'espace dans l'environnement des molécules d'eau et augmente ainsi le désordre (gain d'entropie - processus favorable).



FigureN°26 : L'incarnation d'une réaction hydrophobique dans ses deux étapes[65].

4.4 L'interaction π - π stacking :

En chimie , l' empilement pi (également appelé empilement π - π)(Figure N°27) fait référence à des interactions attrayantes et non covalentes entre des cycles aromatiques , car ils contiennent des liaisons pi . Ces interactions sont importantes dans l'empilement de bases nucléiques dans les molécules d' ADN et d' ARN , le repliement des protéines , la synthèse dirigée par matrice, la science des matériaux et la reconnaissance moléculaire, bien que certaines recherches suggère que l'empilement pi peut ne pas être opérationnel dans certaines de ces applications. Malgré un intérêt expérimental et théorique intense, il n'existe pas de description unifiée des facteurs qui contribuent aux interactions d'empilement pi[66].

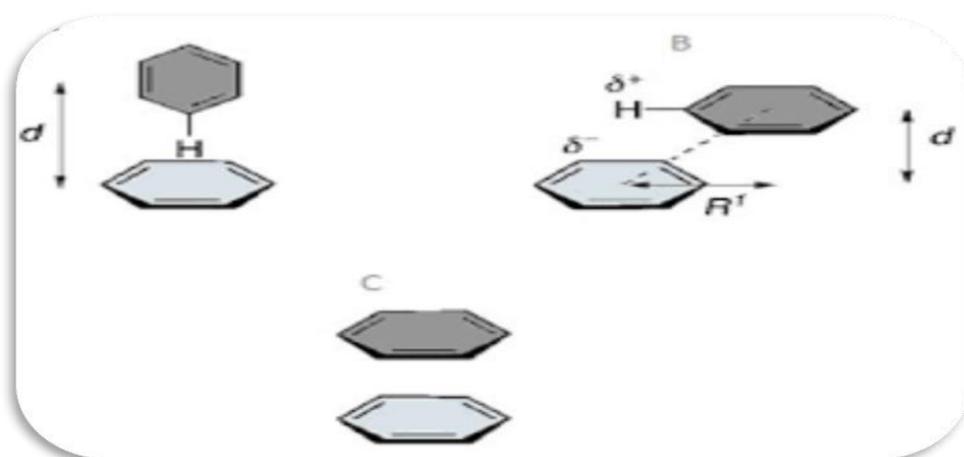


Figure N°27 : La réaction π - π stacking et ses trois types : A : Coté-Face Forme en T, B : Parallèle déplacé, C : Face Face Parallèle[66].

4.5 Les forces vaan der Waals

Les forces de van der Waals(Figure N°28) correspondent à une interaction électrique d'intensité faible ayant lieu à courtes distances entre atomes et/ou molécules [67].

Elle représente la moyenne statistique de toutes les configurations possibles pour l'interaction, pondérées par leur probabilité à l'équilibre thermodynamique[68].

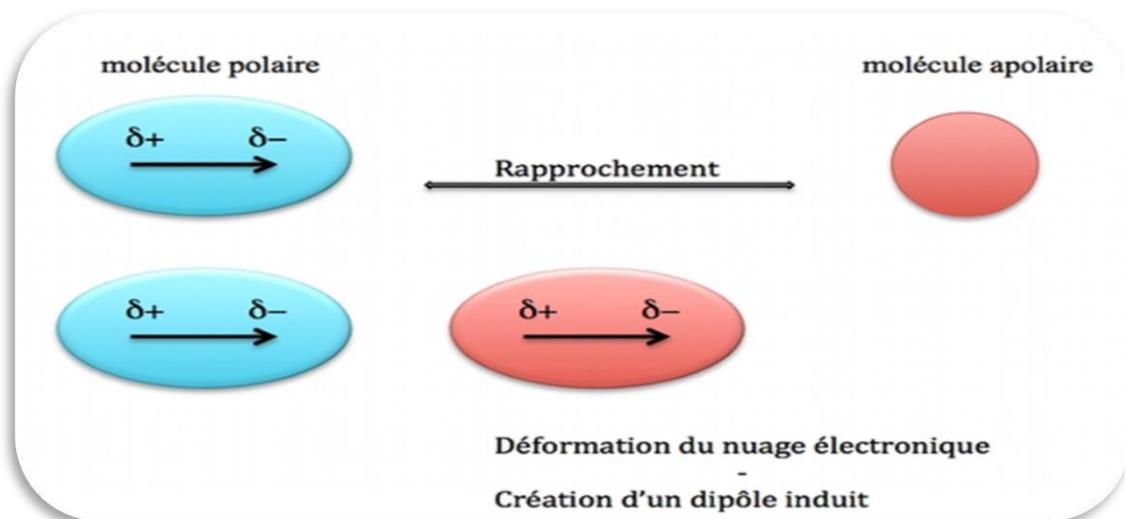


Figure N°28 : Les forces de van der Waals[69].

Chapitre 1

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Micro-ordinateur

Un micro-ordinateur est mis à notre disposition, avec un système d'exploitation windows7 version 2009, constitué d'une mémoire de 3GB et un processeur (intel(R) core (TM) 2Duo CPU 2.10GHZ).

1.2 Logiciels (programmes)

1.2.1. Le programme Surflex version 1.3 (2005)

Ce programme est utilisé pour réaliser le docking moléculaire, il permet de prédire le mode d'interaction entre le ligand et la protéine.

1.2.2. Le programme Open Babel (2.0.2)

Dont le rôle principal est de convertir les fichiers aux formats pdb, mol, mol2,sdf, etc...

1.2.3. Le programme Biovia Discovery Studio (21.1.0.0)

Permet la visualisation des différents structures moléculaires (protéines et ligands) et le mode d'interaction du ligand avec la protéine.

1.2.4. Serveur SwissADME

Sert à prédire les paramètres physico-chimiques et pharmacocinétiques du ligand étudié.

1.3 Banques de données

1.3.1. « PDB » (Protein Data Bank)

La PDB est la principale source de données de biologie structurale qui permet en particulier d'accéder à des structures 3D des protéines enzymatiques d'intérêt thérapeutique.

1.3.2. « PubChem »

C'est une banque de donnée américaine de molécules chimiques gérée par NCBI (National Center for Biotechnology Information). Elle répertorie plusieurs millions de composés, principalement des petites molécules, mais également des molécules plus grandes telles que les nucléotides, es glucides, des lipides, des peptides et des macromolécules en mettant en ligne gratuitement leurs structures et leurs propriétés physico-chimiques. Cette base nous a été utile afin d'obtenir des similaires structuraux de notre ligand de base.

2. Méthodes

2.1 Préparation de L'enzyme

La dihydrofolate réductase a été téléchargée à partir de la PDB où elle est disponible sous une forme tridimensionnelle (3D). La PDB nous offre six complexes cristallographiques parmi lesquels se trouve le complexe que nous avons choisi d'étudier. Ces complexes ainsi que leurs données principales sont représentés dans le **tableau N°4** suivant :

Tableau N°4: Caractéristiques des six complexes de la DHFR.

Code du complexe	Code d'inhibiteur	Nombre de chaines	Résolution
4HOE	18G	2	1.76Å
1AI2	TQ4	2	1.82Å
1DHJ	MTX	2	1.8 Å
4H98	14Q	2	2.9 Å
4M7V	RAR	1	2.3 Å
6DFR	NAP	1	2.4 Å

Parmi ces six complexes, nous avons choisi le complexe 4HOE car portant la plus faible résolution (1,87 Å). (**Figure N°29**)

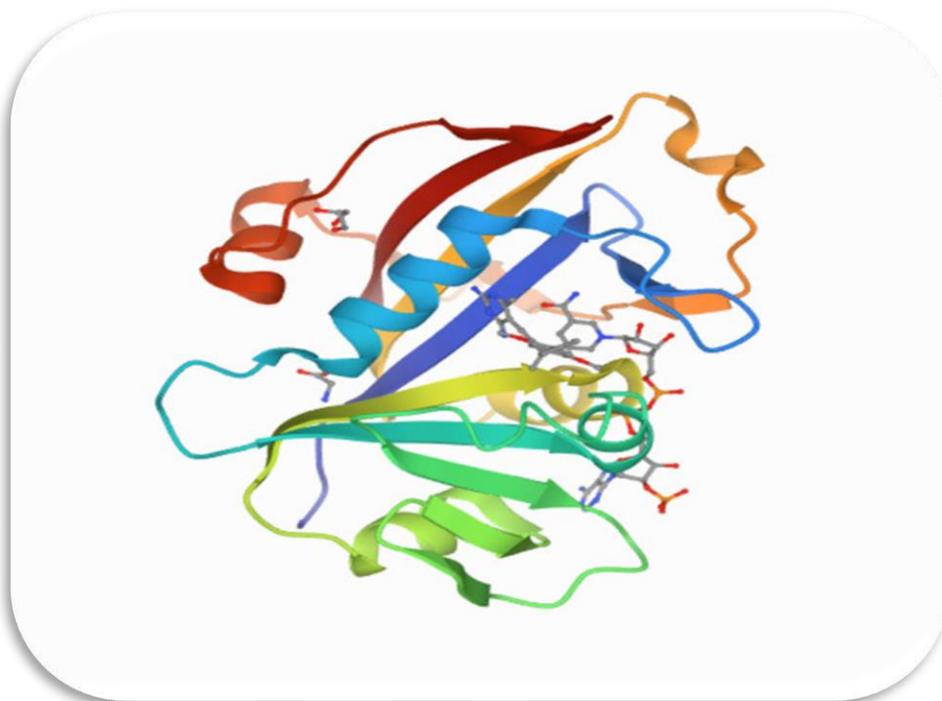


Figure N°29 : Structures 3D du complexe 4HOE issu de la PDB.

La dihydrofolate réductase (DHFR) que nous avons utilisée dans notre travail est constituée de 2 chaînes (A et B). Pour faciliter l'opération de docking moléculaire nous avons préparé l'enzyme en supprimant la deuxième chaîne B, les molécules d'eau et l'inhibiteur présent dans la chaîne A. La cible ainsi obtenue est enregistrée sous format pdb puis converti par le programme Open Babel 2.0.2. au format mol2 requis par Surflex.

2.2 Préparation du ligand

L'inhibiteur 18G a été extrait du complexe 4HOE en supprimant les deux chaînes A et B ainsi que les molécules d'eau et les autres composants. Ce dernier se trouvant au format pdb est converti par Open Babel au format mol2 requis par le programme Surflex.

Le ligand 18G nous aidera à générer le site actif de l'enzyme ainsi que les différents composés similaires à partir de la PubChem.

2.3 Génération du protomol

Le docking moléculaire a été réalisé par le programme Surflex en suivant plusieurs étapes. Nous avons d'abord déterminé le site actif en générant une pseudo-molécule appelée 'protomol' que fournit Surflex sous la forme 'pl-protomol.mol2' en utilisant la commande suivante

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

L'inhibiteur correspond au ligand 18G et la protéine correspond à l'enzyme DHFR (4HOE)

2.4 Le docking moléculaire

Dans cette étape, le ligand, le protomol et l'enzyme sont utilisés sous format mol2.. Cette étape sert à sélectionner précisément les dix meilleurs conformations du ligand au niveau du site actif de la DHFR classifiés par les scores d'affinité dans un ordre décroissant allant de final-0 à final-9 au format mol2.. Cette étape a été concrétisée en utilisant la commande suivante :

```
surflex-dock dock inhibiteur.mol2 pl-protomol.mol2 protein.mol2
```

Une troisième commande a été utilisée lors de la vérification de la performance du programme surflex par le test RMSD pour optimiser en cas de besoin la position du ligand simulé vis-à-vis de celui de référence.

```
surflex-dock oprms final-0.mol2 inhibiteur.mol2
```

3. Analyse visuelle des résultats

Le programme de docking moléculaire Surflex n'étant pas doté d'une interface graphique de visualisation des interactions protéine-ligand nous avons fait appel au programme Biovia Discovery Studio pour mettre en relief les différents types d'interactions simulées lors du docking moléculaire entre l'inhibiteur et le site actif de la DHFR.

4. Criblage virtuel d'une collection de composés similaires

Le composé 18G du complexe 4HOE a été utilisé comme structure de départ pour générer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de l'enzyme DHFR à partir de la banque de données PubChem. Avec un taux de similarité de 90%, la PubChem nous

a permis de télécharger 100 structures similaires au format sdf. En utilisant OpenBabel, ces similaires sont convertis au format mol2 en vue d'un éventuel criblage virtuel avec Surflex permettant d'évaluer leur affinité vis-à-vis du site actif de l'enzyme DHFR.

5.Filtrage ADME

Les problèmes de pharmacocinétique, sont le plus souvent à l'origine de l'échec du développement d'un médicament. De nos jours, avec le développement de l'outil informatique, il devient tout à fait possible de prédire les paramètres liés aux propriétés ADME d'une molécule à partir de sa structure chimique. Pour ce faire nous avons utilisé les serveurs SwissADME et PreADMET pour déterminer les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques de nos composés et par conséquent de savoir si ces propriétés sont compatibles avec une application biologique.

5.1 Propriétés physicochimiques

5.1.1 Règle de Lipinski

Selon Lipinski, un composé est capable d'être administré par voie orale s'il remplit au moins trois de ces cinq critères[70] :

- ▶ La masse moléculaire doit être inférieure à 500g/mol
- ▶ Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur ou égal à 5
- ▶ Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogènes doit être inférieur ou égal à 10
- ▶ Le nombre de liaisons flexibles doit être inférieur ou égal à 15
- ▶ Le logarithme décimal du coefficient de partage 1-octanol/eau, noté LogP, doit être compris entre -2 et 5.

5.1.2 Règle de Veber

Des recherches supplémentaires effectués par Veber et ses collaborateurs en 2002, suggèrent que les composés qui répondent aux deux critères suivants, favoriseraient une bonne biodisponibilité orale [71] :

- ▶ L'aire de surface polaire(PSA) doit être inférieure ou égal à 140 \AA^2
- ▶ Le nombre de liaisons flexibles doit être inférieur ou égal à 15
- ▶ Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogènes doit être inférieur ou égal à 10
- ▶ Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur ou égal à 5

5.1.3 Solubilité dans l'eau

Un candidat-médicament doit être hydrosoluble pour atteindre sa cible et ce avec la concentration souhaitée. L'hydrosolubilité est une notion de référence avec laquelle la prédiction de la biodisponibilité et l'absorption des médicaments administrés par voie orale ou à l'usage parentéral soient plausibles.

5.1.4 Accessibilité à la synthèse

Lors de l'optimisation, les composés actifs subissent des modifications structurales afin de les rendre plus actifs.

L'accessibilité synthétique constitue l'un des facteurs les plus influents dans le succès ou l'échec des travaux d'optimisation des structures. Dans notre cas, l'accessibilité à la synthèse des molécules est évaluée par un score allant de 1 (facile à synthétiser) à 10 (très difficile à synthétiser).

5.2 Propriétés pharmacocinétiques

5.2.1 Absorption gastro-intestinal (GI)

La voie d'administration orale impose au médicament un passage à travers la barrière digestive. Ce passage peut se faire par simple diffusion passive ou fait intervenir des phénomènes plus complexes avec la mise en jeu d'un système de transporteurs favorisant ou au contraire limitant l'absorption.

5.2.2 Perméabilité hémato-encéphalique (BBB)

La capacité de nos meilleurs inhibiteurs à traverser la barrière hémato-encéphalique a été simulé par le serveur SwissADME. Ce critère est plus important pour les

médicaments psychotropes qui doivent agir au niveau du système nerveux central que les médicaments qui agissent au niveau des tissus périphériques.

5.2.3 Inhibition des cytochromes P450

Les cytochromes P450 (CYP) sont des hémoprotéines qui participent au métabolisme oxydatif de nombreux médicaments. En fonction de la structure de la protéine fixée à l'hème, différentes familles et sous-familles ont été identifiées chez l'homme. Les principales formes sont CYP 1A2, 2D6, 2C9, 2C19, 2E1 et 3A4. L'inhibition d'un CYP peut entraîner une augmentation de la concentration des molécules mères qu'il métabolise.

Chapitre 2

Résultats et Discussion

1. La fiabilité du programme Surflex :

Avant d'entamer l'étude de l'inhibition de la dihydrofolate réductase par les diverses molécules similaires du ligand de référence 18G, nous avons jugé utile d'évaluer d'abord la performance du programme Surflex par le test RMSD.

1.1 Le test RMSD

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

Les résultats des 100 complexes sont mentionnés dans l'Annexe 1.

Ces données sont tous présentés par un diagramme circulaire(**FigureN°30**) ébauché ci-dessous :

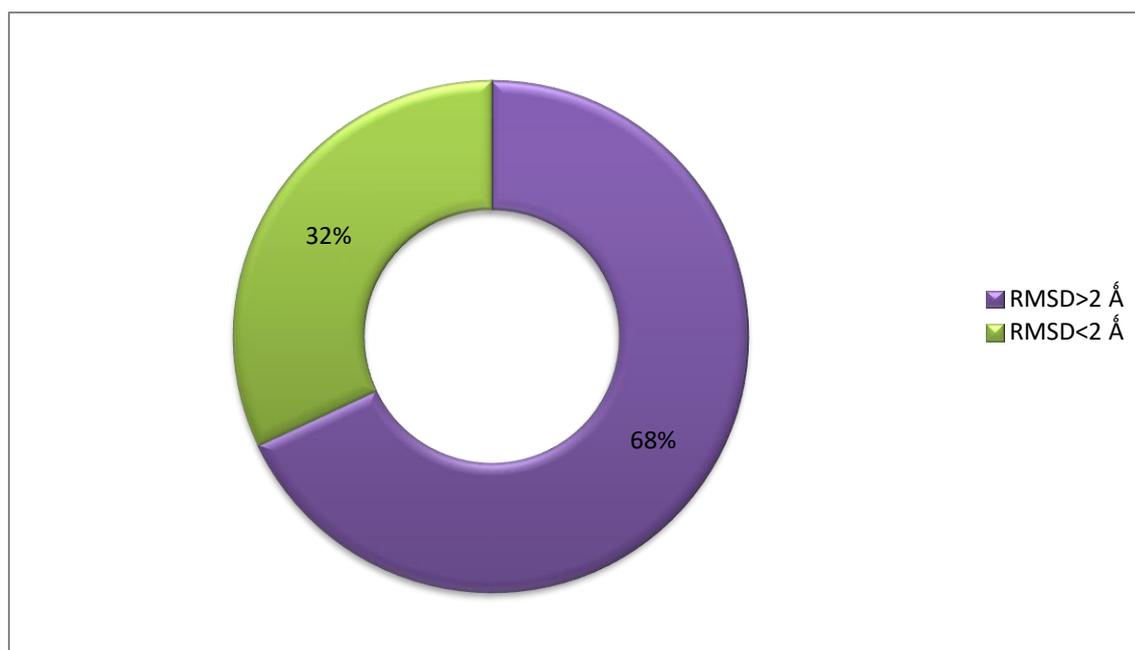


Figure N°30 : Résultats en pourcentage obtenus par Surfex.

Le diagramme ci-dessus dévoile que 68% des valeurs RMSD ont un RMSD sont \leq à 2Å alors que celles ayant un RMSD $>$ 2Å ne représentent que 32%. À partir de ces données nous pouvons conclure nous que Surfex est un programme de docking moléculaire absolument fiable .

Afin de nous assurer davantage de la fiabilité du programme Surfex, un test RMSD supplémentaire a été appliqué à cinq complexes de la DHFR pris de la pdb. Les codes PDB de ces complexes et leurs inhibiteurs ainsi que leurs valeurs RMSD obtenus par Surfex sont mentionnés dans le tableau N° 5 :

Tableau N° 5 : Valeurs RMSD des 5 complexes de la DHFR

Code PDB des complexes	Codes PDB des ligands	RMSD (Å)
4HOE	18G	1.070 Å
1AI2	TQ4	1.13 Å
6DFR	NAP	1.71 Å
1DHJ	MTX	1.11 Å
4M7V	RAR	1.61 Å

Le tableau révèle que les valeurs des RMSD des 5 complexes de la DHFR sont toutes inférieures à 2 Å. Ceci témoigne que le programme Surflex est capable de simuler correctement les interactions entre les similaires du ligand 18G et la DHFR.

1.2 Analyse visuelle

L'analyse visuelle est une étape essentielle permettant une meilleure appréciation des résultats de RMSD obtenus avec Surflex.. A ce titre nous avons d'une part téléchargé le complexe 4HOE à partir de la PDB (**Figure N°31**) et d'autre part nous avons simulé, par docking moléculaire avec Surflex, l'interaction du ligand 18G avec le site actif de la DHFR (**Figure N°32**). En utilisant le programme Biovia Discovery Studio nous avons procédé à une comparaison visuelle du positionnement des 2 ligands où l'on observe une assez bonne superposition du ligand 18G obtenu théoriquement par docking moléculaire avec Surflex (final0) avec celui de référence existant dans le PDB (**Figure N°33**).

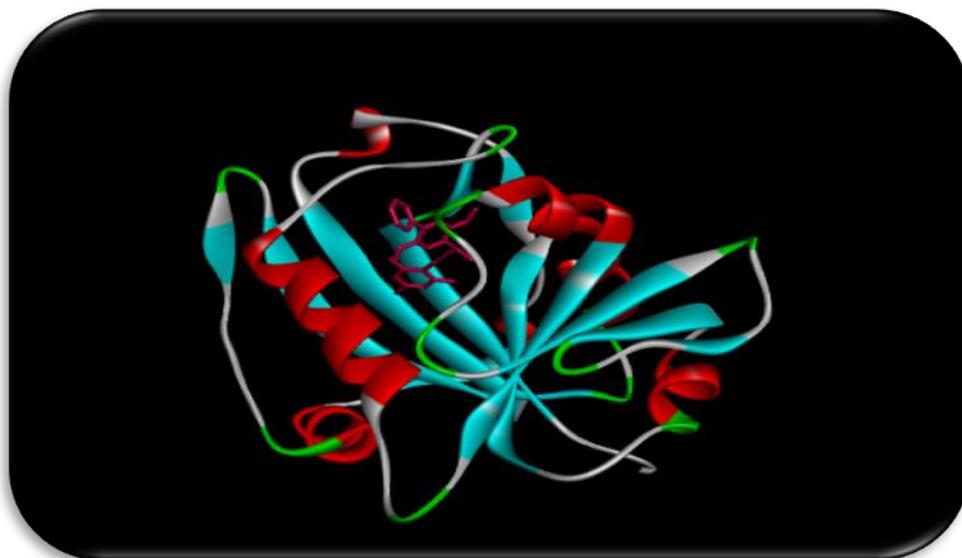


Figure N°31 : Protéine du complexe 4HOE avec son ligand 18G obtenu par rayon-X (pris de la PDB).

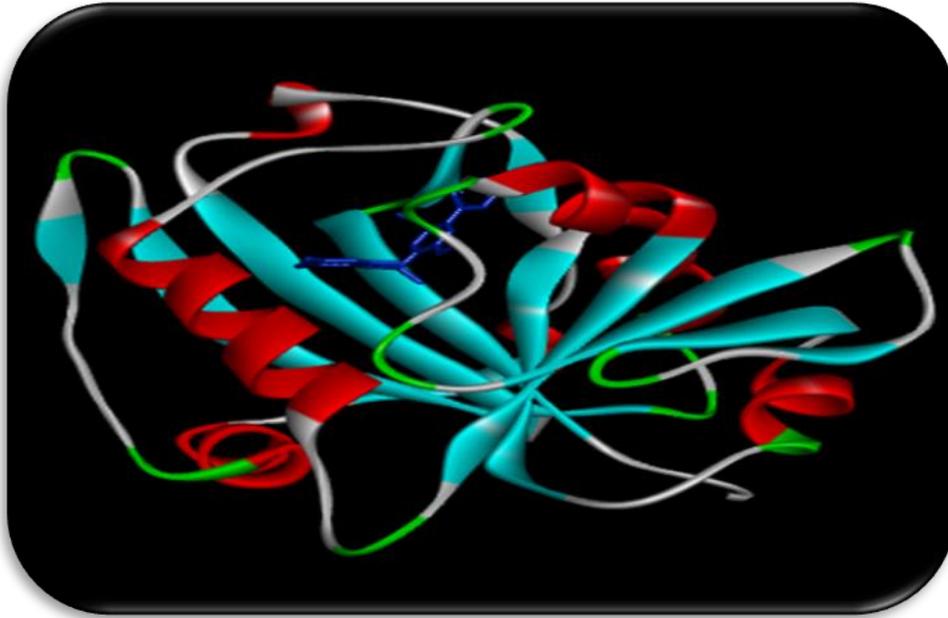


Figure N°32 : Protéine du complexe 4HOE avec son ligand 18G calculé par docking moléculaire avec Surflex.

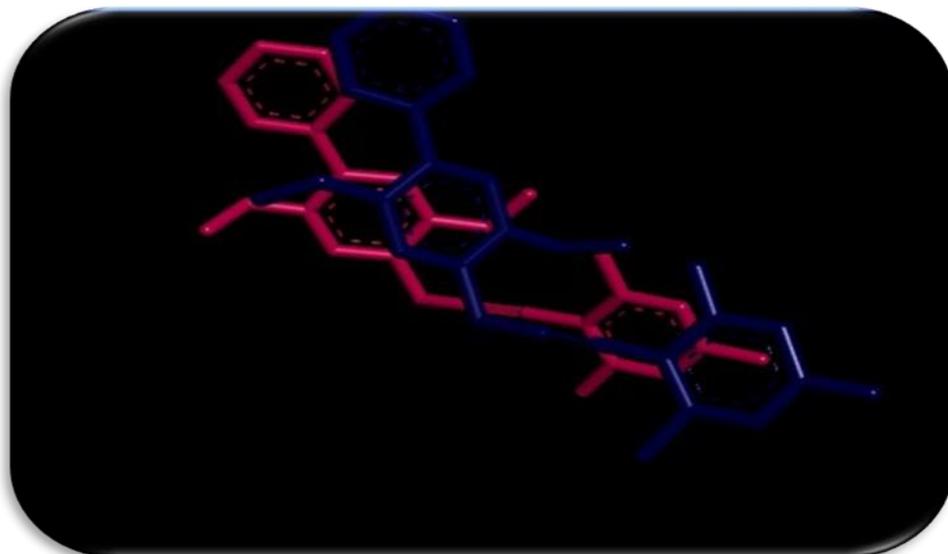


Figure N°33 : Superposition de la géométrie du ligand 18G du complexes 4HOE obtenu par rayon-X (coloré en rose) et celle calculée par docking moléculaire avec Surflex (colorés en bleu).

2. Étude de l'inhibition de la dihydrofolate réductase

Il est utile de rappeler que 5 complexes de la DHFR sont disponibles au niveau de la PDB. Afin de déterminer l'inhibiteur le plus actif parmi les 5, nous avons réalisé une étude in silico par docking moléculaire avec Surflex afin d'évaluer leur score d'affinité (**Tableau N° 6**).

Tableau N°6 : Scores des 5 complexes dihydrofolate réductase-inhibiteur de la PDB.

Code complexe PDB	Code d'inhibiteur	Score(affinité M ⁻¹)
4HOE	18G	1.21
1AI2	TQ4	1.16
6DFR	NAP	1.05
DHJ	MTX	-1.096
4M7V	RAR	-2.6

Comme le montre le tableau N°5, le composé 18G du complexe 4HOE présente le meilleur effet inhibiteur avec un score d'affinité égal à 1.21M⁻¹. Cette affinité se manifeste au niveau du site actif de la DHFR par la mise en place de 4 types de liaisons que nous avons pu observer grâce au programme Biovia Discovery Studio (**Figure N°34**)

- ▶ 4 liaisons hydrogènes avec les résidus d'acides aminés
- ▶ 1 liaison Pi-Pi stacked avec PHE36
- ▶ diverses forces de van der Waals : ILE33, MET25, LEU69, THR133, VAL10, SER61, THR58, PHE66

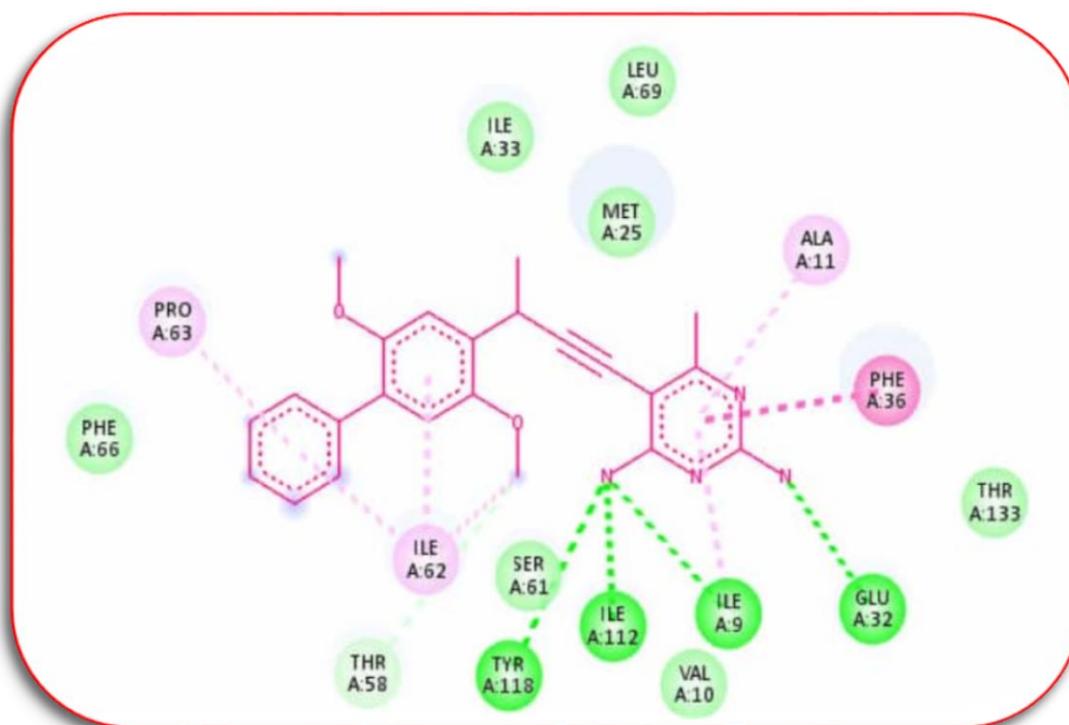


Figure N°34 : Interaction du ligand 18G avec le site actif de la dihydrofolate réductase.

Cette analyse visuelle nous servira de référence lors de l'étude des interactions des similaires du ligand 18G avec le site actif de la DHFR.

3. Proposition de nouveaux inhibiteurs

Le composé 18G ayant présenté le meilleur score d'affinité vis-a-vis du site actif de la DHFR, a été choisi comme structure de départ pour rechercher de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme biologiquement plus actifs. Plus de 1000 composés similaires de l'inhibiteur 18G sont proposés par la banque de données PubChem avec un taux de similarité de 98%. Dans notre travail, nous avons choisi arbitrairement 100 composés similaires avec un taux de similarité de 90%. En utilisant le programme de docking moléculaire Surflex, l'affinité envers l'enzyme DHFR de ces 100 composés a été évaluée. Les numéros d'accèsion, noms et scores d'affinités de ces composés sont représentés dans **l'annexe N°2**. En procédant à une classification des scores d'affinité par ordre décroissant, nous constatons que 90% des composés similaires présentent un score supérieur à celui de la molécule de départ 18G dont l'affinité est, rappelons-le, égale à $1.21M^{-1}$ (**Tableau N°7**)

TableauN°7 : Scores des interactions des 100 similaires avec la dihydrofolate réductase classés par ordre décroissant

N° de composé	N° d'accension	Score
S48	10544281	5.39
S6	25093369	4.82
S73	45482247	4.71
S34	45481871	4.64
S52	45481944	4.64
S33	10466996	4.61
S1	25058133	4.54
S46	90655207	4.49
S77	49788717	4.42
S99	142789377	4.42
S95	122667798	4.37
S29	25093370	4.34
S14	25093361	4.34
S32	484956	4.33
S98	140262570	4.27
S19	44223989	4.24
S15	25093362	4.23
S82	57666213	4.22
S50	25138226	4.22
S86	68905514	4.21
S4	25195125	4.18
S51	25187898	4.15
S11	52949513	4.13
S60	45482143	4.06
S57	45481954	4.05
S67	45482198	4.05
S9	44144380	4.04
S84	67333408	4.02
S56	45481953	4.01
S10	49788718	4
S8	44144379	3.98
S70	45482223	3.95
S3	25195124	3.92
S37	45481893	3.91
S96	138467288	3.89
S74	45482248	3.82
S47	90683572	3.81
S2	25138224	3.73
S16	25093363	3.69
S92	89568134	3.69
S49	10807265	3.64
S41	68891025	3.63
S7	44144378	3.63

S40	68890768	3.62
S72	45482243	3.56
S88	70687181	3.56
S31	13926986	3.53
S85	67334723	3.51
S79	19955534	3.49
S35	45481878	3.48
S75	45482249	3.48
S64	45482184	3.42
S81	57666180	3.22
S94	118905651	3.19
S89	71020717	3.17
S12	484959	3.16
S13	25138223	3.15
S78	73254836	3.15
S20	52943277	3.14
S62	45482171	3.14
S100	143767382	3.14
S38	45481939	3.13
S45	86578029	3.03
S22	86578120	2.95
S21	86577948	2.93
S27	25093367	2.90
S36	45481879	2.80
S61	45482147	2.80
S93	89840760	2.76
S44	86577836	2.74
S42	68892080	2.66
S54	45481948	2.65
S80	25215466	2.62
S58	45481957	2.58
S83	58290816	2.52
S17	25093364	2.37
S26	25093366	2.32
S53	45481945	2.28
S68	45482206	2.20
S30	25187897	2.13
S90	71020718	2.10
S23	86578123	2.07
S69	45482214	2.03
S5	25195365	1.96
S43	86578230	1.68
S97	2247	1.68
S65	45481880	1.60
S76	45482259	1.59
S71	45482238	1.49
S91	75359931	1.35
S55	45481949	1.12

S87	69025156	0.95
S24	86578162	0.77
S18	25093365	0.58
S39	52944456	0.49
S63	45482182	0.15
S59	45482142	-0.14
S28	25093368	-1.09
S66	45482197	-4.95
S25	86578197	-6.06

Il ressort de ce tableau que parmi les 90 similaires présentant un score d'affinité supérieur à celui du ligand de départ 18G, les deux similaires S48 et S6 se distinguent nettement du lot en se situant en haut du tableau avec des scores d'affinité respectifs de 5.39 M^{-1} et 4.82 M^{-1} . D'où l'intérêt de réaliser une analyse visuelle à l'aide du programme Biovia Discovery Studio permettant de mieux comprendre les mécanismes d'interactions mis en jeu par ces 2 composés avec le site actif de l'enzyme DHFR.

Une première analyse visuelle très rapide des 2 composés S48 et S6 montre qu'ils sont comme le ligand de référence 18G, très bien positionné dans le site actif de la DHFR (**Figures N°35 et 36**).

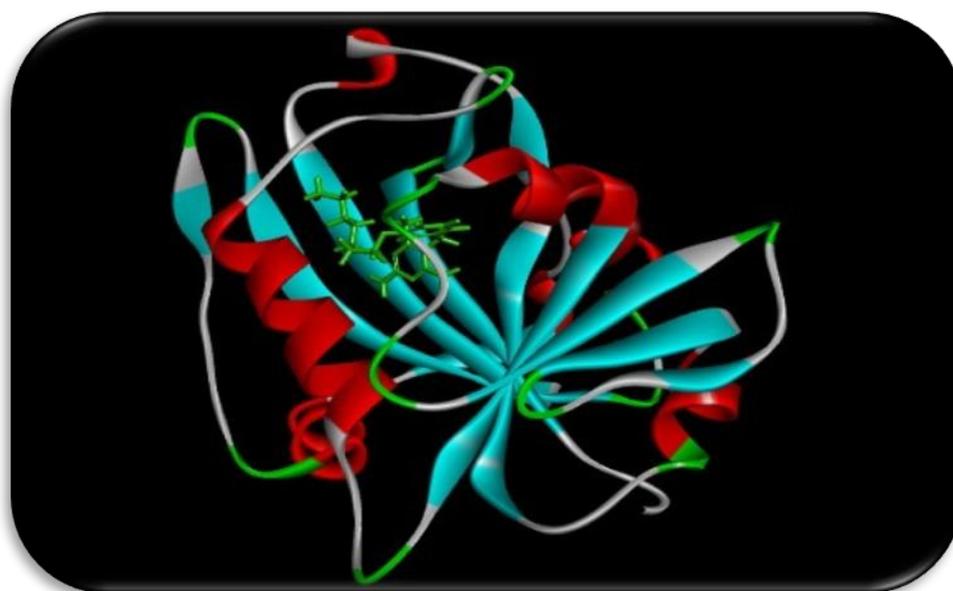


Figure N°35 : Positionnement du similaire S48 dans le site actif de la DHFR.

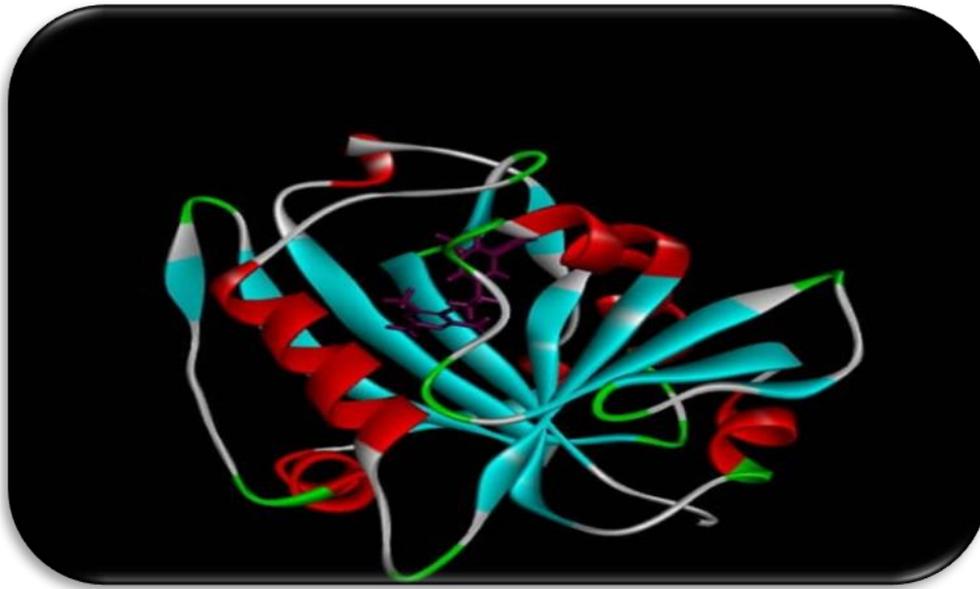


Figure N°36 : Positionnement du similaire S6 dans le site actif de la DHFR.

Une analyse visuelle plus approfondie des 2 similaires S48 et S6 permet de mieux comprendre l'élévation de leur affinité par rapport au ligand 18G. Dans le cas du similaire S48, on observe la mise en place d'un nombre plus important d'interactions avec le site actif de la DHFR (Figure N°37). En effet, on compte :

- ▶ 4 liaisons hydrogènes avec les résidus TYR118, ILE112, ALA11, GLU32
- ▶ 1 liaison Pi-Sigma avec MET25
- ▶ 2 liaisons Pi-alkyl : ALA11, ILE9
- ▶ 7 interactions hydrophobes avec ILE33, PHE36, TRP27, MET25
- ▶ Les forces de van der Waals : LYS37, ARG28, LEU29, ILE62, THR58, GLY113, THR133, TYR35

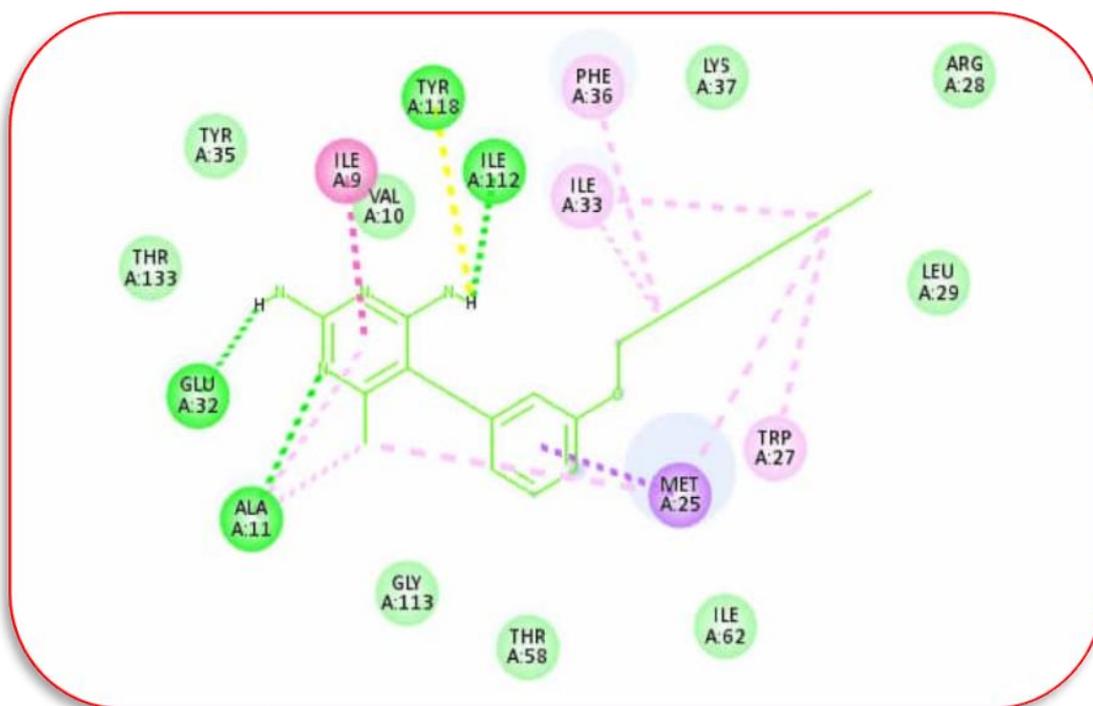


Figure N° 37 : Mode d'interaction du composé S48 dans le site actif de la DHFR.

Il est à souligner que l'apparition de la liaison covalente pi-sigma avec le résidu MET25 semble jouer un rôle essentiel dans la stabilité du similaire S48 dans le site actif de la DHFR. Dans le cas du similaire S6, l'analyse révèle que ce dernier fait pratiquement intervenir le même nombre et les mêmes types d'interactions que le similaire S48 (**Figure N° 38**).

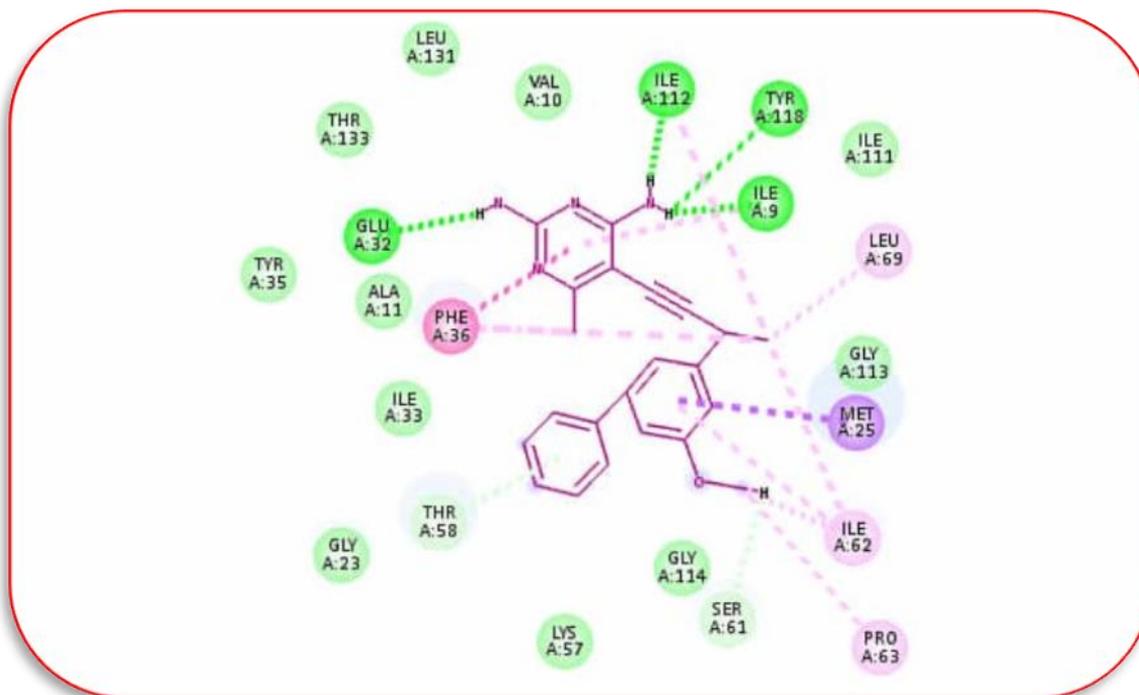


Figure N° 38: Mode d'interaction du composé S6 dans le site actif de la DHFR.

La figure montre que le composé S6 fait intervenir :

- ▶ 4 liaisons hydrogènes avec les résidus ILE112, TYR116, ILE9, GLU32
- ▶ 1 liaison Pi-Pi stacked avec PHE36
- ▶ 1 liaison Pi-Sigma avec MET25
- ▶ 2 liaisons Pi-alkyl : ILE9, ILE62
- ▶ 4 interactions hydrophobes avec LEU69, ILE62, PRO63, PHE36
- ▶ diverses forces de van der Waals avec : ILE111, GLY113, GLY114, , LYS57, GLY23, ILE33. ALA11, TYR35, THR133, LEU131, VAL10,

Il rest à souligner que le similaire S6 se caractérise par un nombre des forces de Van der Waals légèrement plus important que le similaire S48 et qui sont du point de vue énergétique considérées comme étant les plus faibles ; ce qui pobablement expliquerait la différence d'affinité entre les 2 composés.

4. Prédiction des paramètres ADME

En faisant appel au serveur SwisADME nous avons pu prédire les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des 2 similaires S48 et S6 (**Tableaux 8 et 9**)

Tableau N° 8: Propriétés physico-chimiques des similaires S48 et S6

Propriétés	S48	S6
Formule	C ₁₉ H ₂₈ N ₄₀	C ₂₂ H ₂₂ N ₄₀
PM (g/mol)	328,45 g/mol	358,44 g/mol
nLF nombre de liaisons flexibles	9	3
nON nombre d'accepteur d'hydrogène	3	3
nOHNH nombre de donneurs H	2	2
Log P	3,71	3,64
TPSA Å ²	87,05 Å ²	87,05 Å ²
Règle de Lipinski	Oui	Oui
Règle de Veber	Oui	Oui
Solubilité dans l'eau	Moyenne	Moyenne
Accessibilité à la synthèse	3,14	3,74

Selon le **tableau N° 8**, les deux similaires S48 et S6 répondent favorablement à la règle de Lipinski ainsi que la règle de Veber et semblent donc ne poser aucun problème de biodisponibilité en cas d'administration par voie orale.

Le fait d'apparaître moyennement solubles dans l'eau indique que les 2 composés S48 et S6 peuvent malgré tout se dissoudre dans les milieux aqueux tels que le sang afin de parvenir à leur cible avec les concentrations requises.

Enfin, avec des valeurs d'accessibilité à la synthèse respectives de 3.14 et 3.74 les composés S48 et S6 semblent être très facilement synthétisables chimiquement. Ce critère est très important à prendre en compte notamment lors de l'étape d'optimisation qui nécessite des modifications structurales pour améliorer l'activité du composé.

Les données du **tableau N°9** ci-dessous montrent que les composés S48 et S6 ont une perméabilité gastro-intestinale élevée. Il s'agit d'une propriété très importante qui leur permet de traverser facilement le tractus gastro-intestinal pour arriver à la circulation sanguine. En revanche les 2 similaires S48 et S6 ont une très faible capacité à travers la barrière hémato-encéphalique ce qui représente un autre atout majeur pour ces 2 composés qui sont destinés à agir sur des cellules autres que les cellules cérébrales. Malheureusement les 2 composés inhibent presque tous les CYP du cytochrome P450. En effet le composé S48 inhibe toutes les types de cytochrome P450 hormis le CYP2D6 alors que le composé S6 inhibe également tous les CYPs excepté le CYP2C9. Il est à noter que le cytochrome P450 est une enzyme hépatique ayant pour rôle de métaboliser les médicaments ainsi que les substances endogènes (stéroïdes, vitamines) . Seul l'étape d'optimisation structurale peut pallier cet inconvénient.

TableauN° 9 : Propriétés pharmacocinétiques des similaires S48 et S6

Propriétés	S48	S6
GI absorption	élevée	élevée
BBB perméabilité	basse	basse
CYP1A2 inhibition	positive	positive
CYP2C19 inhibition	positive	positive
CYP2C9 inhibition	positive	négative
CYP2D6 inhibition	négative	positive
CYP3A4 inhibition	positive	positive

Conclusion :

L'objectif de ce travail est basé sur le découvert de nouveaux inhibiteurs de la dihydrofolate réductase, cible thérapeutique des maladies fongiques, en faisant appel à l'approche in silico par docking moléculaire.

Dans un premier temps nous avons jugé utile d'évaluer la performance du programme Surflex par deux tests :

-le premier test consiste à calculer le RMSD (Root Mean Square Déviation) entre la meilleure conformation du ligand simulé par Surflex et celle obtenue expérimentalement par cristallographie au niveau de la PDB. A ce titre 100 complexes ont été téléchargés arbitrairement à partir de la PDB puis testés.

-le deuxième test consiste à analyser visuellement la superposition de la pose du ligand simulée et celle du ligand de référence issu de la PDB.

Les résultats de ces tests ont montré que 68% des valeurs de RMSD sont inférieurs à 2Å ainsi qu'une bonne superposition entre la géométrie du ligands simulée par Surflex et celle provenat de la PDB.

De tels résultats apportent la preuve que le programme de docking moléculaire Surflex est hautement performant. Il s'agit d'un outil de simulation fiable pouvant être utilisé sans trop risque d'erreurs dans l'étude des mécanismes d'inhibition de la DHFR.

Dans un deuxième temps, nous avons reconstruit par docking moléculaire les 5 complexes de la DHFR existants dans la PDB. Avec un score d'affinité de 1.21 M⁻¹, le ligand 18G du complexe HOE apparait comme le meilleur inhibiteur de cette enzyme. Le ligand 18G nous a servi de structure de départ pour rechercher d'autres inhibiteurs à partir de la banque de données PubChem. En appliquant un taux de similarité de 90%.cette dernière nous a proposé 100 similaires différents. Parmi les 100 similaires analysés par docking moléculaire avec Surflex, les deux composés S48 et S6 ont donné les meilleurs scores d'affinités soit 5.39 M⁻¹ et 4.82 M⁻¹ et par conséquent peuvent être considérés comme de nouveaux inhibiteurs plus actifs que le ligand de référence 18G.

L'ultime étape de ce travail était d'évaluer les propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des 2 composés S48 et S6 assujetties à leurs propriétés ADME en se servant du serveur SwissADME. Les résultats montrent clairement que les 2 composés possèdent des propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques compatibles avec une application biologique. Cependant, il faut souligner que les problèmes liés à l'inhibition du cytochrome P450 peuvent être résolus lors de l'étape d'optimisation pour devenir des candidats-médicament.

Enfin comme perspectives d'avenir, il convient de vérifier ces résultats théoriques par des études expérimentales *in vitro* et *in vivo*.

Références bibliographiques

- [1] : Masse molaire calculée d'après « Atomic weights of the elements 2007 » [archive], sur www.chem.qmul.ac.uk.
- [2] : Rev Prescrire 2011 ; 31 (338 suppl. interactions médicamenteuses) : 432
- [3] : Mycologie Généralités Physiopathologiques, DCEM1, Pr Stephane Bretagne, 19/01/2008
- [4] : Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348:1546–1554.
- [5] : Wisplinghoff, H., T. Bischoff, S. M. Tallent, H. Seifert, R. P. Wenzel, and M. B. Edmond. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* 39:309–317.
- [6] : Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:133–163.
- [7] : T. Jones, N. A. Federspiel, H. Chibana et J. Dungan, « The diploid genome sequence of *Candida albicans* », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no 19, 11 mai 2004, p. 7329–7334
- [8] : www.doctissimo.fr
- [9] : David Kadosh, « Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans* », *Current Opinion in Microbiology*, vol. 52, décembre 2019, p. 27–34
- [10] : Borg-von Zepelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard and M. Monod. 1998. « The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages » *Mol Microbiol.* 28: 543-554
- [11] : Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 2015 Oct 08;373(15):1445-56. [PubMed]
- [12] : Li Y, Du M, Chen LA, Liu Y, Liang Z. Nosocomial Bloodstream Infection Due to *Candida* spp. in China: Species Distribution, Clinical Features, and Outcomes. *Mycopathologia.* 2016 Aug;181(7-8):485-95. [PubMed]
- [13] <https://www.msmanuals.com/fr/professional/troublescardiovasculaires/endocardite/endocarditeinfectieuse?fbclid=IwAR0p3dIJBZdkPeN7jjQ0VcUWsufoaJ1AiriGPkf4IxjEEmdrEIUkDVvYQs>
- [14] : Lejko-Zupanc, T., and M. Kozelj. 1997. A case of recurrent *Candida* parapsilosis prosthetic valve endocarditis: cure by medical treatment alone. *J. Infect.* 35:81–82.

[15]: Baddour, L. M. 1995. Long-term suppressive therapy for Candida parapsilosis-induced prosthetic valve endocarditis. Mayo Clin. Proc. 70:773–775.

[16]: réalites- cardiologiques.com par DELAHAYE F. Le 31/07/2017

[17] :<https://www.vidal.fr/maladies/douleursfievr/meningites.html?fbclid=IwAR1tH3s9QwOzGwVwmAVmrt1YI9M2ytdjl4nthyVW4NlmGZygOXLPGckLKiQ>

[18] : . Bayer, A. S., M. J. Blumenkrantz, J. Z. Montgomerie, J. E. Galpin, J. W. Coburn, and L. B. Guze. 1976. Candida peritonitis. Report of 22 cases and review of the English literature. Am. J. Med. 61:832–840.

[19]: . Fernandez, M., E. H. Moylett, D. E. Noyola, and C. J. Baker. 2000. Candidal meningitis in neonates: a 10-year review. Clin. Infect. Dis. 31:458–463.

[20] :<https://sante.journaldesfemmes.fr>, article mis à jour le 17/04/19.

[21] : Wang, A. Y., A. W. Yu, P. K. Li, P. K. Lam, C. B. Leung, K. N. Lai, and S. F. Lui. 2000. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. Am. J. Kidney Dis. 36:1183–1192

[22]: Manzano-Gayosso, P., F. Hernandez-Hernandez, L. J. Mendez-Tovar, J. Gonzalez-Monroy, and R. Lopez-Martinez. 2003. Fungal peritonitis in 15 patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). Mycoses 46:425–429.

[23]: www.docteurcliv.com, créé, modifié et vérifié par docteur Yohan SERVAIS

[24] : https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2474854-arthrite-definition-symptomes-causes-traitements/?fbclid=IwAR2U5tTbBbia77OjO2EAieroTprBx5-uy_mPOAHTwZ93ODpWHkr3p9M0WYI

[25] : Weems, J. J., Jr. 1992. Candida parapsilosis: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. Clin. Infect. Dis. 14:756–766.

[26] : <https://www.msmanuals.com/fr/accueil/troubles-osseux,-articulaires-et-musculaires/maladies-articulaires/polyarthrite-rhumato%C3%AFde-pr>

[27]<https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=endophtalmie&fbclid=IwAR3LRP7FoZDV9CfALAhEAPU3fknBH-sRniFdUwBRf8-KirMy9bHhRqQ6tiM>

[28] : Journal français d'ophtalmologie, V35, P35-39, Janvier 2012

[29] : Vennwald, I., J. Schonlebe, and E. Klemm. 2003. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. Mycoses 46:12–18.

[30] : <https://www.pinterest.com/pin/434386326541220882/>

[31] : <https://pcvmontreal.com/orl/pathologies-orl/oreille/otite-externe>

- [32] : Segal, R., A. Kimchi, A. Kritzman, R. Inbar, and Z. Segal. 2000. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. *Mycoses* 43:349–353.
- [33] : <https://www.dermatologue-bordeaux.fr/dermatologie-medicale/mycoses-ongles/>
- [34] : . Sobel, J. D. 2007. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 369:1961–1971.
- [35] : Otero, L., V. Palacio, F. Carreno, F. J. Mendez, and F. Vazquez. 1998. Vulvovaginal candidiasis in female sex workers. *Int. J. STD AIDS* 9:526–530
- [36]:https://www.researchgate.net/publication/8565813_Structure_Dynamics_and_Catalytic_Function_of_Dihydrofolate_Reductase
- [37]: doi/10.1111/j.1742-4658.2007.05855.x
- [38]: Matthews DA, Alden RA, Bolin JT, Freer ST, Hamlin R, Xuong N, Kraut J, Poe M, Williams M, Hoogsteen K (July 1977). "Dihydrofolate reductase: x-ray structure of the binary complex with methotrexate". *Science*. 197 (4302): 452–5. Bibcode:1977Sci...197..452M. doi:10.1126/science.17920. PMID 17920.
- [39]: Filman DJ, Bolin JT, Matthews DA, Kraut J (November 1982). "Crystal structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. II. Environment of bound NADPH and implications for catalysis". *The Journal of Biological Chemistry*. 257 (22): 13663–72. doi:10.1016/S0021-9258(18)33498-7. PMID 6815179
- [40]: Osborne MJ, Schnell J, Benkovic SJ, Dyson HJ, Wright PE (August 2001). "Backbone dynamics in dihydrofolate reductase complexes: role of loop flexibility in the catalytic mechanism". *Biochemistry*. 40 (33): 9846–59. doi:10.1021/bi010621k. PMID 11502178
- [41]: Bolin JT, Filman DJ, Matthews DA, Hamlin RC, Kraut J (November 1982). "Crystal structures of *Escherichia coli* and *Lactobacillus casei* dihydrofolate reductase refined at 1.7 Å resolution. I. General features and binding of methotrexate". *The Journal of Biological Chemistry*. 257 (22): 13650–62. doi:10.1016/S0021-9258(18)33497-5. PMID 6815178
- [42]: Huennekens FM. 1996. In search of dihydrofolate reductase. *Protein Sci*. 5:1201–8
- [43]: https://www.pharmacorama.com/pharmacologie/mdicaments-acides-nucliques-protines/inhibiteurs-dihydrofolate-reductasedhfr/?fbclid=IwAR3nD0ptcUEynG32pIsoqYern6xJZXbFD51xPZTvIX_2ixgdEcFTLysWAdA#:~:text=La%20dihydrofolate%20r%C3%A9ductase%2C%20DHFR%2C%20dont%20cellules%20humaines%20normales%20et%20canc%C3%A9reuses
- [44]: Christian D,a Arturo L-T,b Leanna R. Estredge,c Glen E. P, Dihydrofolate Reductase Is a Valid Target for Antifungal Development in the Human Pathogen *Candida albicans*, *mSphere*,2020, 5: 1-15

- [45]: Paulsen JL, Liu J, Bolstad DB, Smith AE, Priestley ND, Wright DL, Anderson AC. In vitro biological activity and structural analysis of 2,4-diamino-5-(2'-arylpropargyl)pyrimidine inhibitors of *Candida albicans*. *Bioorg Med Chem.* 2009; 17:4866–4872. [PubMed: 19560363]
- [46]: Liu J, Bolstad DB, Smith AE, Priestley ND, Wright DL, Anderson AC. Structure-guided development of efficacious antifungal agents targeting *Candida glabrata* dihydrofolate reductase. *Chem Biol.* 2008; 15:990–996. [PubMed: 18804036]
- [47]: https://www.ebi.ac.uk/pdbe/docs/roadshow_tutorial/msdsite/2/MSDsite_Scenario.html
- [48]: Aurélien Grosdidier, Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives, 2007
- [49]: Baurin N., Baker R., Richardson C., Chen I., Foloppe N., Potter A., Jordan A., Roughley S., Parratt M., Greaney P., Morley D., Hubbard R.E. (2004) Drug-like annotation and duplicate analysis of a 23-supplier chemical database totalling 2.7 million compounds. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 44:643-651
- [50] : Charifson P.S., Walters W.P. (2002) Filtering databases and chemical libraries. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 16:311-323
- [51] : Didier Rognan, Criblage virtuel par docking moléculaire, P : 1-11
- [52] : Taylor R.D., Jewsbury P.J., Essex J.W. (2002) A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput Aided Mol. Des.* 16:151-166
- [53] : Kellenberger E., Rodrigo J., Muller P., Rognan D. (2004) Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins* 57:225-242
- [54]: Bissantz C., Folkers G., Rognan D. (2000) Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J. Med. Chem.* 43:4759-4767
- [55] : Stahl M., Böhm H.J. (1998) Development of filter functions for protein-ligand docking. *J. Mol. Graph. Model.* 16:121-132
- [56]: Nicolaou C.A., Tamura S.Y., Kelley B.P., Bassett S.I., Nutt R.F. (2002) Analysis of large screening data sets via adaptively grown phylogenetic-like trees. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 42:1069-1079
- [57]: Bissantz C, Bernard P, Hibert M, Rognan D (2003) Protein-based virtual screening of chemical databases. II. Are homology models of G-Protein Coupled Receptors suitable targets ? *Proteins* 50:5-25.
- [58]: Mokrani E.H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de ladipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation

informatique. Mémoire de Magister en Biochimie : Université Mentouri. Constantine. Algérie. 75p.(2012)

[59]: [76] Chianchen Y. beware of docking ! .celpress..18p. (2015).

[60]: ©Frédéric Élie, juin août 2004 - <http://fred.elie.free.fr> - page 6/14

[61]: https://www.researchgate.net/figure/Une-liaison-hydrogene-entre-une-molecule-deau-et-une-molecule-dammoniac-La-molecule_fig40_325956424

[62]: <https://www.futura-sciences.com/sciences/definitions/chimie-liaison-ionique-16058/>

[63]: <http://campus.cerimes.fr/odontologie/enseignement/chap1/site/html/2.html>

[64]: <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/methodologie/extraction/savoir-plus/7>

[65] : ^ Martinez, Chelsea R.; Iverson, Brent L. (2012). "Repenser le terme "pi-stack " " . Sciences chimiques . 3 (7) : 2191. doi : 10.1039/c2sc20045g . hdl : 2152/41033 . ISSN 2041-6520 .

[66]: <https://www.cientperiodique.com/journal/fulltext/CPQME/3/1/77>

[67]: <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-du-vivant/les-forces-de-van-der-waals-et-le-gecko>

[68]: https://fr.wikipedia.org/wiki/Force_de_van_der_Waals

[69]: <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-du-vivant/les-forces-de-van-der-waals-et-le-gecko>

[70] : Veber DF, le RS de Johnson, le HY de Cheng, le BR de Smith, le Ward KW, le Kopple KD (juin 2002). "Propriétés moléculaires qui influencent la biodisponibilité orale descandidats-médicaments". J. Med. Chem . 45 (12): 2615-23. CiteSeerX 10.1.1.606.5270 . doi : 10.1021 / jm020017n . PMID 1203637.

[71]: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jm020017n>

Annexe 1 : Résultats obtenue de RMSD des complexes protéines-ligands

N°	Code PDB	Code des ligands	RMSD (Å)
1	1AI2	TQ4	1.13
2	1DHJ	MTX	1.11
3	1NDY	FR3	0.59
4	1DX6	GNT	0.69
5	1AIM	ZYA	1.16
6	1CI9	DFP	2.99
7	1CQQ	AG7	1.270
8	1DIC	DIC	4.141
9	1DJP	DO2	14.93
10	1DUI	DFP	3.1
11	1DY9	2ZF	4.343
12	1E36	TPY	2.776
13	1H70	CIR	3.596
14	1K1M	FD4	3.099
15	1K1N	CCR	1.945
16	1K1P	MEL	1.757
17	1N7I	LY1	2.638
18	1NXY	SM2	2.432
19	1NY0	NBF	2.337
20	1NYY	105	2.504
21	1O07	MXG	5.916
22	1O41	300	2.127
23	1OI9	N20	3.051
24	1RTH	CSD	1.473
25	1TSN	CXM	4.886
26	1TU6	FSP	4.907
27	1TYN	CTA	3.226
28	1YKR	628	1.687
29	1YZ3	SKA	0.029
30	1AUJ	PPB	2.096
31	1AYV	IN6	3.627
32	1BJG	TMF	4.184
33	1BP4	ALD	2.006
34	1BTX	0ZX	3.331
35	1BTZ	0ZY	3.961
36	2CXV	CBP	1.589
37	2DB4	DCW	0.980
38	2DC6	73V	1.735

39	2G5P	ADF	1.686
40	2I78	KIQ	0.938
41	2JCH	PL7	1.454
42	2P7U	D1R	2.189
43	2P86	VS1	1.398
44	2PB1	NFG	1.018
45	2PFE	AES	0.569
46	2PX6	DH9	1.388
47	2Q2T	AMP	1.516
48	2QCN	U5P	0.125
49	2QXH	K7J	1.363
50	2RJP	886	3.208
51	2XFN	XCG	0.079
52	3BGJ	U5P	2.854
53	3BH3	PNH	0.109
54	3D4F	LN1	0.056
55	3HY7	097	5.588
56	3LD6	KKK	1.113
57	3TNE	RIT	1.736
58	3V35	NTI	1.995
59	3VLL	SHA	1.093
60	3L4W	MIG	0.88
61	3L4Y	NR4	1.84
62	3LAZ	MSE	1.42
63	3M3D	PG4	3.13
64	3ZLU	GFT	2.63
65	3WS8	X4C	0.4
66	4CMT	GWH	1.537
67	4CMU	IV7	0.091
68	4UHL	VFV	1.040
69	4M7V	RAR	1.61
70	4HOE	18G	1.070
71	4MOE	FDA	0.6
72	4GCA	2X9	0.74
73	4GQR	MYC	2.58
74	4MRW	MRW	2.02
75	4MSO	EDO	0.54
76	4MSA	2ZM	0.84
77	5EAC	TBQ	1.072
78	5FOG	VRT	0.65
79	5EAG	5LU	1.656
80	5FI2	5XX	1.586
81	5RLI	JFM	0.058
82	6CHW	F3D	1.781
83	6CWY	FHJ	1.777
84	6CZU	FP7	2.039
85	6DZG	NXL	1.169
86	6DFR	NAP	1.71
87	6PG8	KE1	0.385

88	6PG0	0J1	2.94
89	6PGP	OHY	2.053
90	6PGC	4J6	2.146
91	6PNM	AXXO	1.779
92	6PT5	1S7	1.678
93	6PX5	0G6	1.997
94	6PXX	5R7	0.501
95	6PZP	P7S	2.106
96	6YNQ	PN6	0.061
97	6ZRU	U5G	1.944
98	6ZU8	0WN	1.966
99	7C7P	SV6	1.331
100	7JRN	TTT	1.595

Annexe 2 : Liste des similaires

N° de composé	N° d'accension	Score
S1	25058133	4.54
S2	25138224	3.73
S3	25195124	3.92
S4	25195125	4.18
S5	25195365	1.96
S6	25093369	4.82
S7	44144378	3.63
S8	44144379	3.98
S9	44144380	4.04
S10	49788718	4
S11	52949513	4.13
S12	484959	3.16
S13	25138223	3.15
S14	25093361	4.34
S15	25093362	4.23
S16	25093363	3.69
S17	25093364	2.37
S18	25093365	0.58
S19	44223989	4.24
S20	52943277	3.14
S21	86577948	2.93
S22	86578120	2.95
S23	86578123	2.07
S24	86578162	0.77
S25	86578197	-6.06
S26	25093366	2.32
S27	25093367	2.9
S28	25093368	-1.09
S29	25093370	4.34
S30	25187897	2.13
S31	13926986	3.53
S32	484956	4.33
S33	10466996	4.61
S34	45481871	4.64
S35	45481878	3.48
S36	45481879	2.8
S37	45481893	3.91
S38	45481939	3.13
S39	52944456	0.49
S40	68890768	3.62

S41	68891025	3.63
S42	68892080	2.66
S43	86578230	1.68
S44	86577836	2.74
S45	86578029	3.03
S46	90655207	4.49
S47	90683572	3.81
S48	10544281	5.39
S49	10807265	3.64
S50	25138226	4.22
S51	25187898	4.15
S52	45481944	4.64
S53	45481945	2.28
S54	45481948	2.65
S55	45481949	1.12
S56	45481953	4.01
S57	45481954	4.05
S58	45481957	2.58
S59	45482142	-0.14
S60	45482143	4.06
S61	45482147	2.8
S62	45482171	3.14
S63	45482182	0.15
S64	45482184	3.42
S65	45481880	1.6
S66	45482197	-4.95
S67	45482198	4.05
S68	45482206	2.20
S69	45482214	2.03
S70	45482223	3.95
S71	45482238	1.49
S72	45482243	3.56
S73	45482247	4.71
S74	45482248	3.82
S75	45482249	3.48
S76	45482259	1.59
S77	49788717	4.42
S78	73254836	3.15
S79	19955534	3.49
S80	25215466	2.62
S81	57666180	3.22
S82	57666213	4.22
S83	58290816	2.52
S84	67333408	4.02

S85	67334723	3.51
S86	68905514	4.21
S87	69025156	0.95
S88	70687181	3.56
S89	71020717	3.17
S90	71020718	2.10
S91	75359931	1.35
S92	89568134	3.69
S93	89840760	2.76
S94	118905651	3.19
S95	122667798	4.37
S96	138467288	3.89
S97	2247	1.68
S98	140262570	4.27
S99	142789377	4.42
S100	143767382	3.14

Résumé :

Le DHFR est une enzyme omniprésente qui se localise dans tous les organismes considérée comme la seule source de THF et ses dérivés qui sont essentiels à la synthèse de purine et de thymidylate et donc à la production d'ADN et la prolifération cellulaire. L'enzyme est la cible de plusieurs médicaments anticancéreux et antibiotiques importants.

L'objectif de notre travail est de rechercher de nouveaux inhibiteurs de la dihydrofolate réductase biologiquement plus actifs que l'inhibiteur de référence 18G existant dans la PDB. Pour ce faire nous avons utilisé la technique du docking moléculaire avec le programme Surflex.

Dans un premier temps nous avons vérifié la fiabilité de Surflex par le test RMSD sur 100 complexes pris arbitrairement de la PDB. Les résultats ont montré que 68% des valeurs de RMSD sont $< 2\text{Å}$ ce qui atteste que le programme Surflex est fiable.

Une fois la performance de Surflex vérifiée, nous avons utilisé le ligand 18G comme structure de départ pour rechercher d'autres inhibiteurs au niveau de la PubChem. Avec un taux de similarité de 90% la banque nous a proposé 100 composés similaires dont la modélisation par docking moléculaire a montré que 90 d'entre eux sont nettement plus actifs que le ligand 18G. Pour la suite du travail nous nous sommes limités aux 2 meilleurs similaires S48 et S6 ayant présentés des affinités respectives de 5.39 M^{-1} et 4.82 M^{-1}

L'évaluation positive des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques des 2 composés S48 et S6 est en faveur de leur application biologique en tant que nouveaux inhibiteurs plus puissants de la DHFR .

Mots clés : Surflex, docking moléculaire, dihydrofolate réductase, inhibiteurs, similaires, affinité

Abstract

DHFR is an ubiquitous enzyme that is localized in all organisms considered the only source of THF and its derivatives which are essential for the synthesis of purine and thymidylate and therefore for DNA production and cell proliferation. The enzyme is the target of several important anticancer drugs and antibiotics.

The aim of our work is to search for new dihydrofolate reductase inhibitors that are biologically more active than the reference inhibitor 18G existing in PDB. To do this, we used the molecular docking technique with the Surflex program.

At first we checked the reliability of Surflex by the RMSD test on 100 complexes taken arbitrarily from the PDB. The results showed that 68% of the RMSD values are $< 2\text{\AA}$, which proves that the Surflex program is reliable.

Once the performance of Surflex was verified, we used the 18G ligand as a starting structure to search for other inhibitors at PubChem. With a similarity rate of 90%, the bank offered us 100 similar compounds, modeling by molecular docking of which showed that 90 of them are significantly more active than the 18G ligand. For the rest of the work we limited ourselves to the 2 best similar S48 and S6 having presented respective affinities of 5.39 M^{-1} and 4.82 M^{-1}

The positive evaluation of the physicochemical and pharmacokinetic parameters of the 2 compounds S48 and S6 is in favor of their biological application as new, more potent inhibitors of DHFR.

Keywords: Surflex, molecular docking, dihydrofolate reductase, inhibitors, similars, affinity

الملخص

DHFR هو إنزيم متواجد في جميع الكائنات الحية التي تعتبر المصدر الوحيد ل THF ومشتقاته الضرورية لتخليق البيورين والثيميديلات وبالتالي لإنتاج الحمض النووي وتكاثر الخلايا. هذا الإنزيم مستهدف من قِبَل العديد من الأدوية والمضادات الحيوية المضادة للسرطان.

الهدف من عملنا هو البحث عن مثبطات اختزال ثنائي هيدروفولات جديدة أكثر نشاطاً من الناحية البيولوجية من المثبط المرجعي G18 الموجود في PDB. للقيام بذلك ، استخدمنا تقنية الالتحام الجزيئي مع برنامج Surflex.

في البداية ، قمنا بفحص موثوقية Surflex عن طريق اختبار RMSD على 100 مجمع مأخوذ بشكل تعسفي من PDB. أظهرت النتائج أن 68% من قيم RMSD هي $>2\text{Å}$ ، مما يثبت أن برنامج Surflex موثوق به.

مجرد التحقق من أداء Surflex ، استخدمنا مثبط 18G كهيكل بدء للبحث عن مثبطات أخرى في PubChem. مع معدل تشابه بنسبة 90% ، قدم لنا البنك 100 مركب مماثل ، وأظهرت النمذجة عن طريق الالتحام الجزيئي أن 90 منها أكثر نشاطاً بشكل ملحوظ من مركب 18G. بالنسبة لبقية العمل ، اقتصرنا أنفسنا على أفضل متشابهين S48 و S6 بعد أن قدمنا تقاربات كل منهما من $5.39M^{-1}$ و $4.82M^{-1}$.

التقييم الإيجابي للمعلمات الفيزيائية والكيميائية والحركية الدوائية للمركبين S48 و S6 لصالح تطبيقها البيولوجي كمثبطات جديدة وأكثر فاعلية ل DHFR.

الكلمات المفتاحية : Surflex، الالتحام الجزيئي، dihydrofolate reductase ، مثبطات، متشابهين ، درجات

التقارب

MODELISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA DIHYDROFOLATE REDUCTASE FONGIQUE**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée****Résumé :**

La DHFR est une enzyme omniprésente chez tous les organismes. Elle est considérée comme la seule source de THF et ses dérivés qui sont essentiels à la synthèse des purines et du thymidylate et donc à la production d'ADN et à la prolifération cellulaire. Cette enzyme est aujourd'hui la cible de plusieurs médicaments anticancéreux et antibiotiques importants.

L'objectif de notre travail est de rechercher de nouveaux inhibiteurs de la dihydrofolate réductase biologiquement plus actifs que l'inhibiteur de référence 18G existant dans la PDB. Pour ce faire nous avons utilisé la technique du docking moléculaire avec le programme Surflex.

Dans un premier temps nous avons vérifié la fiabilité de Surflex par le test RMSD sur 100 complexes pris arbitrairement de la PDB. Les résultats ont montré que 68% des valeurs de RMSD sont $< 2 \text{ \AA}$ ce qui atteste que le programme Surflex est fiable.

Une fois la performance de Surflex vérifiée, nous avons utilisé le ligand 18G comme structure de départ pour rechercher d'autres inhibiteurs au niveau de la PubChem. Avec un taux de similarité de 90% la banque nous a proposé 100 composés similaires dont la modélisation par docking moléculaire a montré que 90 d'entre eux sont nettement plus actifs que le ligand 18G. Pour la suite du travail nous nous sommes limités aux 2 meilleurs similaires S48 et S6 ayant présentés des affinités respectives de 5.39 M^{-1} et 4.82 M^{-1}

L'évaluation positive des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques des 2 composés S48 et S6 est en faveur de leur application biologique en tant que nouveaux inhibiteurs plus puissants de la DHFR .

Mots-clefs : Surflex, docking moléculaire, dihydrofolate réductase, inhibiteurs, similaires, affinité

Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biochimie Appliquée

(Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : BENSEGUENI Abderrahmane (Pr - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : CHIKHI Abdelouahab (Pr - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : MOKRANI El Hacem (MAB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).