

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Constantine 1



Faculté des Sciences de la Nature et de

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

la Vie

---

Mémoire pour l'obtention du diplôme de  
Master en Biochimie

Option : Biochimie Moléculaire et Santé

## Thème

**Inhibition *in silico* de la Shikimate 5-Déshydrogénase (aroE) de  
*Helicobacter pylori* pour combattre l'ulcère.**

Soutenu le 22 juin 2014

Réalisé par :

*M<sup>elle</sup>* MEGUENANI Karima

*M<sup>elle</sup>* ZEBILA ASMA

Devant le jury:

Président : BENSEGUENI A.

Professeur à Université Constantine 1.

Rapporteur : CHIKHI A.

Professeur à Université Constantine 1.

Examineur : MOKRANI E .H.

Maîtr assistant B à l'Université Constantine 1.

- Session Juin 2014 -

## Remerciements

*Au premier lieu, nous remercions Dieu le tout puissant pour son aide, de nous avoir donné volonté, courage et patience. Nos remerciements les plus chaleureux et les plus vifs s'adressent d'abord à notre promoteur, Monsieur CHIKHI A. Professeur à Université Constantine 1 a d'avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour son entière disponibilité ainsi que ses grandes aides, orientations et conseils et que sans lui, le présent travail ne serait jamais abouti.*

*Nous tenons à remercier aussi Monsieur BENSEGUENIA. Professeur à Université Constantine 1 de nous avoir consacré de son temps et nous faisons l'honneur de présider les jury. Mes remerciements vont aussi à Monsieur MOKRANI E .H. Maître assistant à l'Université Constantine 1. Pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Nous remercions également, très sincèrement : Nos enseignants pour leur soutien et leur dévouement durant toutes nos années d'études.*

*Sans oublier de remercier nos très chers parents.*

*Nous témoignons notre reconnaissance à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de notre mémoire.*

# Dédicaces

*A ma très chère maman, pour m'avoir toujours écoutée, pour son soutien moral et ces précieux conseils ;*

*A mes sœurs : Hala, Faten ;*

*A Mon adorable frère : Abderrahmane ;*

*A mon cher ami Oussama qui ma encouragé, qui ma donné la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés ;*

*A mon amie et ma binôme : Karima et toute sa famille ;*

*A mes Cousins et mes Cousines ; Lilia ; Mina ; Radia ; Sara ; Sofiane ;*

*A mes amis les plus fidèles ; Khaoula 1 ; Khaoula2 ; Rima ;*

*A tous mes amis de la promotion de master en biochimie ;*

*A la mémoire de mon regretté père ;*

*Et pour finir, je présente d'avance mes excuses à ceux dont j'aurais oublié de citer le nom : ma mémoire peut me jouer de tours, mais ceci ne change rien à la considération que j'ai*

*Et que j'aurais toujours pour chacun de vous.*

*Asma*

# Dédicaces

*C'est avec une grande joie que je dédie ce modeste travail, fruit de mes études en exprimant ma profonde gratitude à tous mes proches particulièrement :*

*A ma mère : « Fella », la tendresse, la sympathie et le sacrifice, qui ma toujours orienté pour le meilleur ;*

*A mon père : « Mahmoud » qui m'a inculqué le courage, l'espoir et m'a permis d'atteindre mes objectifs, il a été d'un grand secours par son soutien et sa présence pendant les moments difficiles ;*

*A mes chères sœurs : Oumeima et Abir ;*

*A mon chère frère: Mohamed Seif Elddinne ;*

*Mon affection pour vous est sans limite, votre soutien a sans doute été important pour le bon déroulement de mes études ;*

*A tout ma famille grand et petit chacun avec son nom ;*

*A tout mes amies surtout : Hadjer, Rokia, Meriem et Amira.....*

*A mon binôme Asma qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et à sa famille ;*

*A toutes les personnes ayant participé à ce travail, se serait-ce que par un petit mot d'encouragement ou même un petit sourire.*

*Karima*

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## CHAPITRE 1 : Revue bibliographique

I. L'ULCERE GASTRIQUE PAR HELICOBACTER PYLORI.....	3
1. L'ULCERE.....	3
1.1. Généralités .....	3
1.2. Définition.....	3
1.3. Epidémiologie .....	4
1.4. Facteurs aggravant l'ulcère gastrique .....	5
1.5. Causes de l'ulcère gastrique .....	5
2. <i>HELICOBACTER PYLORI</i> .....	6
2.1. Généralités.....	6
2.2. Définition de <i>H.pylori</i> .....	6
2.3. Taxonomie d' <i>H.pylori</i> .....	8
2.4. Facteurs majeurs de virulence .....	8
2.5. Adaptation d' <i>H.pylori</i> au milieu .....	8
2.6. Le cycle de vie (pathogénie) de l' <i>H.pylori</i> .....	8
2.7. Transmission d' <i>H.pylori</i> .....	9
2.7.1. Transmission oro-orale .....	9
2.7.2. Transmission féco-orale .....	9
2.7.3. Transmission par le matériel d'endoscopie.....	10
2.8. Maladies provoquées par <i>H.pylori</i> .....	10
2.9. Traitements de <i>H.pylori</i> .....	10
II. LA SHIKIMATE 5-DEHYDROGENASE .....	11
1. GENERALITES .....	11
2. DEFINITION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE .....	11
3. FONCTION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE .....	12
4. LA REACTION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE .....	12
5. LA MODE D'ACTION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE .....	13
5.1. Le domaine N terminal.....	13
5.2. Le domaine C terminal .....	13

6. LES INHIBITEURS DE SHIKIMATE DEHYDROGENASE .....	14
---	----

## **CHAPITRE 2:LE DOCKING MOLECULAIRE**

1. INTRODUCTION.....	16
2. DIFINITION DE DOCKING MOLECULAIRE.....	16
3. PRINCIPE DE DOKING .....	16
4. PRINCIPE THEORIQUE.....	17
5. LES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND .....	17
6. LES PROGRAMMES DE DOCKING MOLECULAIRE .....	19
7. EVALUATION DES PROGRAMMES DE DOKING .....	21

## **CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES**

1.MATERIEL.....	22
2.METHODES .....	22
2.1. Banque de données protéiques « Protein Data Bank ».....	22
2.2. Le protocole d'utilisation des logiciels .....	22
2.2.1. ArgusLab .....	22
2.2.2. Surflex .....	23
2.3. Le test de fiabilité des logiciels .....	25
2.3.1. RMSD (root mean square deviation) .....	25
2.3.2. Coefficient de corrélation.....	25
3. INHIBITION DE L'ENZYME DU COMPLEXE 3PHH .....	26
3.1. Choix du complexe 3PHH .....	26
3.2. Calcul des interactions « enzyme- composés substitués » .....	27
3.2.1. Les mono-substitutions .....	28
3.2.2. Les bi-substitutions .....	29

## **CHAPITRE 4 : RESULTAT ET DISCUSSION**

1.TESTS DE FIABILITE DES PROGRAMMES DE DOCKING .....	31
1.1. Le test RMSD.....	31
1.2. L'analyse visuelle .....	33
1.3. Le coefficient de corrélation (r) .....	35

2. INHIBITION DE L'ENZYME DU COMPLEXE 3PHH.....	36
2.1. Mono-substitution.....	38
2.2. Bi-substitution.....	40
3. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LE CURCUMIN ET SHIKIMATE DEHYDROGENASE .....	40
4. ETUDE DES INTERACTIONS DES COMPLEXES SDH-DERIVES SUBSTITUES ..	42
CONCLUSION .....	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	
RESUMES	

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau01 : Les principaux programmes de docking moléculaire.....	20
Tableau02 : Les mono-substitutions du curcumin .....	28
Tableau 03: Les bi-substitutions du curcumin .....	29
Tableau04 : Résultats de l'analyse par régression linéaire.....	35
Tableau 05 : Les propriétés pharmaceutiques de curcumin. ....	37
Tableau 06 : Les affinités des meilleurs composés substitués ,le curcumin et le substrat . ....	38
Tableau 07 :Table d'application de la règle de Lipinski sur les 4 composés. ....	46



## LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Représentation d'ulcère gastrique.....	3
Figure 02 : Représentation schématisée des pertes de substances gastrique non tumorales. ....	4
Figure 03: <i>helicobacter pylori</i> .....	6
Figure 04 : photo d'une <i>H.pylori</i> en microscopie électronique.....	7
Figure 05 : <i>H.pylori</i> au niveau des cellules épithéliales gastrique .....	7
Figure 06 :Réaction de la shikimate déshydrogénase.....	13
Figure 07 :Le domaine C de shikimate déshydrogénase .....	14
Figure 08 :Les inhibiteurs de shikimate déshydrogénase .....	14
Figure 9: Les forces de Van Der Waals. ....	18
Figure 10:La liaison hydrogène.....	19
Figure 11:Les différentes liaisons hydrogènes .....	19
Figure 12: Structure du curcumin.....	27
Figure 13: Superposition de l'inhibiteur et final-0 calculé par Surflex du complexe 3ITI.. ....	34
Figure 14: Superposition de l'inhibiteur et final-0 calculé par Surflex du complexe 4BUL.....	34
Figure 15: Corrélation entre l'activité biologique (PIC50) des différents complexes et leurs Affinités données par Surflex. ....	36
Figure 16: Les positions ciblées lors de la Substitution. ....	38
Figure 17: Le meilleur mono substitué (composé37).....	39
Figure 18: Affinité de composé 37 par le Surflex.....	39
Figure 19: Les meilleurs dérivés bi-substitués (composé 44, composé101, composé103).. ....	40
Figure 20: Illustration du positionnement de l'inhibiteur curcumin dans le site actif de shikimate déshydrogénase .....	41
Figure 21: Le curcumin dans la shikimate déshydrogénase.....	41
Figure 22: Représentation des liaisons hydrogène formées par la SDH et le composé 37.....	42
Figure 23: Représentation des liaisons hydrogène formées par la SDH et le composé 44.....	43
Figure 24: Représentation des liaisons hydrogène formées par la SDH et le composé 101.....	44
Figure 25: Représentation des liaisons hydrogène formées par la SDH et le composé 103.....	45

## LISTE DES GRAPHES

Graphe 01 : Résultats en % obtenus par ArgusLab à deux intervalles de RMSD ( $\text{\AA}$ ).....	32
Graphe 02 : Résultats en % obtenus par Surfex à deux intervalles de RMSD ( $\text{\AA}$ ).....	32
Graphe 03: Comparaison des deux programmes.....	33

## LISTE DES ABREVIATIONS

**3D:** Trois dimensions.

**Å :** Angström.

**ADME/Tox :** Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et de Toxicité.

**AINS :** Anti-inflammatoires Non Stéroïdiens.

**CMI :** concentration minimale inhibitrice.

***H .PYLORI:*** *Helicobacter pylori*.

**IC50:** Inhibitory Concentration 50.

**IPP :** Inhibiteur de la Pompe à Proton.

**logP :** Le coefficient de partition Eau/Octanol.

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information.

**PDB:** Protein Data Bank.

**PH :** potentiel hydrogène.

**r :** Coefficient de corrélation linéaire.

**RMN :** Résonance Magnétique Nucléaire.

**RMSD:** Root Mean Square Deviation.

**SDH :** Shikimate déshydrogénase.

# INTRODUCTION

Les interactions protéine-ligand jouent un rôle important dans les systèmes vivants où elles participent à la régulation de certains mécanismes biologiques [1, 2], à la transmission des signaux [3] ou à la catalyse de différentes réactions biochimiques [4, 5, 6].

La conception de nouveaux composés chimiques ayant des propriétés bioactives requière des études expérimentales quantitatives de leur efficacité. L'élaboration d'un protocole reproductible pour estimer cette efficacité *in vitro* et *in vivo* est parfois très difficile à réaliser sur le plan biologique. A titre d'exemple, la mise sur le marché d'un médicament nécessite entre 12 et 15 ans de travail et coûte près d'un milliard de dollars [7, 8]. Tenter les expérimentations au laboratoire demanderait trop d'investissements au niveau économique, temps et travail. La simulation *in silico* (docking moléculaire) entre l'enzyme et le ligand, de part son coût peu onéreux et sa rapidité à se mettre en œuvre, reste une bonne alternative qui permet à la recherche dans le domaine du médicament d'avancer plus vite.

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

Il a longtemps été considéré que le stress était la cause principale de l'ulcère. Les guérisons étaient donc rares et la maladie le plus souvent chronique, touchant environ 10% de la population. Mais cette situation a été radicalement modifiée au début des années 1980 par Barry J. Marshall et J. Robin Warren, deux chercheurs Australiens. En effet, leurs travaux ont démontré que la majorité des ulcères gastroduodénaux sont dus à la présence d'une bactérie qu'ils ont découverte et isolée : *Helicobacter pylori*. Cette idée a fini par s'imposer, non sans résistance, et les traitements proposés de nos jours sont basés sur une antibiothérapie. En soignant la cause, ils permettent non seulement de diminuer les symptômes mais surtout d'obtenir fréquemment une guérison.

La prise en charge de l'infection par *Helicobacter pylori* a évolué ces dernières années. Les indications de la recherche et du traitement de l'infection ont été précisées. La place des différentes méthodes directes ou indirectes de la recherche de l'infection par *H. pylori* est maintenant bien définie [9, 10].

L'enzyme, la shikimate déshydrogénase est utilisée comme une cible intéressante pour développer de nouveaux antibiotiques car elle est essentielle à la survie de la bactérie *Helicobacter pylori*.

L'objectif du présent travail est, dans un premier temps, de tester la fiabilité du programme Surfex utilisé dans cette étude : le premier test consiste à calculer la déviation en angströms ou RMSD entre la géométrie du ligand conçue par le logiciel et celle déterminée

expérimentalement, le deuxième test consiste à calculer le coefficient de corrélation entre l'affinité des interactions obtenues par docking des molécules retenues dans cette étude et les valeurs expérimentales de leurs IC50.

Dans la deuxième partie, nous étudierons l'inhibition de la shikimate déshydrogénase par les méthodes de docking moléculaire. Nous nous intéresserons à déterminer le mode d'interaction, lors de la fixation de certains dérivés substitués à l'enzyme durant la formation du complexe shikimate déshydrogénase-inhibiteur, avec une meilleure complémentarité par le calcul de l'affinité du complexe formé.

Enfin dans un troisième temps nous tenterons de proposer, à la lumière des résultats précédents, des structures nouvelles avec une meilleure affinité vis-à-vis de la shikimate déshydrogénase en vue de découvrir de nouveaux antibiotiques. Ces résultats aideront, probablement, au développement d'un outil thérapeutique efficace dans la lutte contre l'ulcère gastrique.

CHAPITRE 1:  
REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE

## **I. L'ULCERE GASTRIQUE PAR HELICOBACTER PYLORI**

### **1. L'ULCERE**

#### **1.1. Généralités**

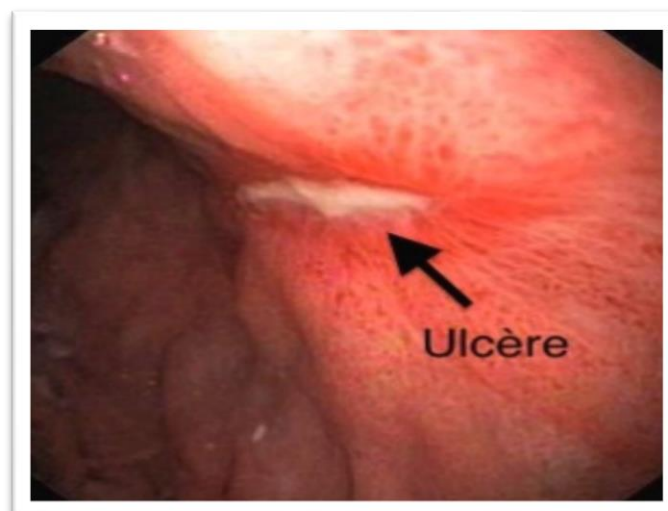
L'ulcère peptique désigne un ensemble d'affections ulcéreuses de la partie supérieure du tube digestif touchant essentiellement l'estomac et la partie initiale de duodénum (bulbe), et dans lequel la participation de l'acide et de la pepsine dans leur pathogénie est fondamentale [11].

La muqueuse gastroduodénale saine est capable de résister à des agressions tant endogènes qu'exogènes. Cette tolérance est le fait de protections naturelles par défenses de barrière muqueuse, la barrière muqueuse est constituée de l'association du film de mucus et de la sécrétion de bicarbonates [12].

Un ulcère survient lorsque cette couche protectrice est endommagée. En général les maladies de l'estomac sont soit des maladies de la paroi de l'estomac: inflammation, ulcère, tumeur; soit des problèmes liés au contenu de l'estomac [13].

#### **1.2. Définition**

L'ulcère gastroduodéal est une maladie chronique récidivante. C'est en fait un cadre nosologique dans lequel on intègre des affections se traduisant par une perte de substance d'un revêtement épithélial cutané ou muqueux sans tendance à la cicatrisation spontanée et entamant la paroi gastrique ou duodénale. En réalité, l'ulcère duodéal ou gastrique résulte d'un déséquilibre entre des facteurs d'agression (sécrétion acide et peptique) et des facteurs de défense (mucus, épithélium de surface...) [14].

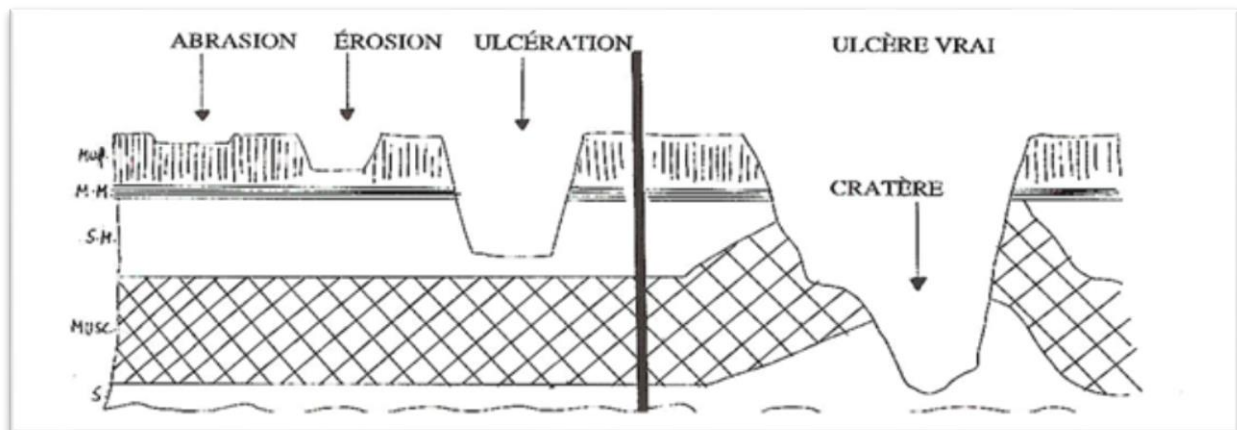


**Figure01 : Représentation d'ulcère gastrique.**



L'ulcère de l'estomac, aussi appelé ulcère gastrique, et l'ulcère duodénal, qui se forme dans le duodénum (première partie de l'intestin grêle), sont des plaies ouvertes dans la muqueuse, superficielle ou profonde.

Ils s'accompagnent de douleurs à l'abdomen dues au contact entre l'acide de l'estomac et les plaies[14].



**Figure 02 : Représentation schématique des pertes de substances gastrique non tumorales.**

Les ulcères débutent lorsque les sucs digestifs acides altèrent le mucus protecteur qui tapisse la muqueuse exposant ainsi le tissu sous-jacent à une bactérie appelée *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) qui possède la capacité exceptionnelle de survivre dans l'environnement acide de l'estomac.

La présence de cette bactérie et son rôle ont été identifiés pour la première fois en 1982. Un second type d'ulcère peut survenir chez les patients recevant des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Malheureusement, ces médicaments diminuent la synthèse du mucus qui, normalement, protège la paroi interne de l'estomac et du duodénum.

L'infection à *H. pylori* serait la cause de 95% des ulcères duodénaux et de 80% des ulcères gastriques; les AINS sont responsables de la plupart des autres cas [15].

### 1.3. Épidémiologie

La maladie ulcéreuse gastroduodénale touche presque 10 % de la population, avec une incidence globale de 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants. L'ulcère du bulbe est plus fréquent chez l'homme (sex ratio 3/1), la parité est respectée pour l'ulcère gastrique. En détail, la maladie ulcéreuse duodénale a une incidence annuelle de 60 à 80 000 nouveaux cas par an.

*H.pylori* est alors retrouvé dans la muqueuse gastrique 9 fois sur 10.

L'incidence annuelle de la maladie ulcéreuse gastrique est quatre fois plus rare (jusqu'à 20 000 cas par an), une infection à *H.pylori* est retrouvée 7 fois sur dix.

La prise d'anti-inflammatoires non stéroïdiens augmente de 3 à 5 fois le risque d'ulcère gastro-duodéal, l'incidence annuelle est de 1 cas pour 100 patients traités par an. La survenue de lésions gastriques ou duodénales sous AINS est de 5% à cours terme et de 30% en cas de traitement prolongé.

Les traitements par inhibiteurs spécifiques de la COX 2 réduisent le risque d'ulcère symptomatique, ce bénéfice est annulé en cas de prise concomitante d'aspirine à faible dose [16].

#### **1.4. Facteurs aggravant l'ulcère gastrique**

- ❖ Le tabagisme.
- ❖ La consommation excessive d'alcool.
- ❖ Le stress.
- ❖ Chez certaines personnes, l'alimentation aggrave les symptômes d'ulcère, on peut citer :
  - ✓ Boissons : le café (même décaféiné), le thé, le lait, les boissons à base de cola.
  - ✓ Aliments : les aliments gras, dont le chocolat et les concentrés de viande.
  - ✓ Epices : le poivre noir, les graines de moutarde et la muscade.

#### **1.5. Causes de l'ulcère gastrique**

La cause la plus fréquente d'un ulcère gastrique ou d'un ulcère gastro-duodéal est une infection de la paroi de l'estomac par la bactérie *H.pylori* (entre 75% et 80%). Des causes plus rares incluent la consommation de certains médicaments antalgiques et anti-inflammatoires. Le stress physique et d'autres troubles peuvent également être à l'origine des ulcères gastriques et gastro-duodénaux.

L'identification de la bactérie *H.pylori* comme cause du développement de l'ulcère gastrique et de l'ulcère duodéal a été une découverte importante de ces dernières années. Des données officielles montrent que 35% environ de la population d'Europe occidentale est touchée par l'*H.pylori*, mais seulement 10% des cas d'infections développent une gastrite, des ulcères gastriques ou gastro-duodénaux.

Les causes externes qui contribuent à l'atteinte de la paroi de l'estomac mais dont le rapport direct avec le développement d'un ulcère gastrique n'a pas encore été prouvé sont la nicotine, l'alcool, les médicaments et le stress dû aux nuisances sonores ou à la profession exercée [1].

## 2. *HELICOBACTER PYLORI*

### 2.1. Généralités

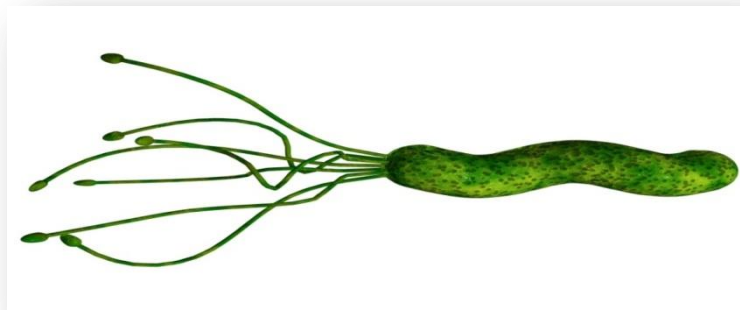
L'intérieur de l'estomac baigne dans environ un demi-gallon de jus gastrique chaque jour. Le jus gastrique est composé d'enzymes digestives et d'acide hydrochlorique concentré, qui peut aisément déchirer l'alimentation la plus dure ou le microorganisme. Les bactéries, des virus et le dîner de bifteck d'hier sont tous consommés dans ce bain mortel de produits chimiques. On a déjà pensé que l'estomac ne contenait aucune bactérie et était en réalité stérile, mais la bactérie *H.pylori* a changé cela. Normalement la haute concentration acide dans l'étendue digestive empêche des bactéries de survivre dans cet environnement.

Avant 1982 où on n'avait pas encore découvert la bactérie, les ulcères étaient généralement associés au stress, l'acide, l'alimentation épicée et un style de vie malsain. Les ulcères ont été traités en prescrivant des médicaments à long terme qui traiteraient et diminueraient les symptômes et guériraient peut-être l'ulcère, mais ne guériraient pas l'infection. Quand les médicaments ne sont plus pris, les ulcères reviennent. Une fois que l'on l'a découvert que la majorité d'ulcères a été liée avec une infection bactérienne, on pourrait recommander les médicaments appropriés afin d'éliminer l'infection avec une petite chance du retour d'ulcères [17].

### 2.2. Définition de *H.pylori*

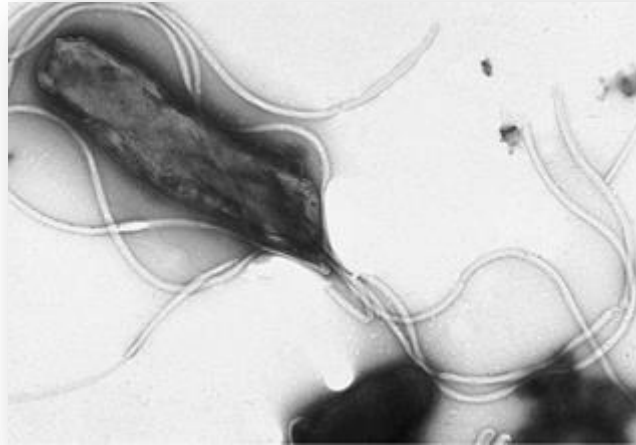
*H. pylori* est un pathogène qui colonise sélectivement l'épithélium gastrique humain. C'est un bacille Gram-négatif spirale mesurant 2 à 4  $\mu\text{m}$  de long et 0,5 à 1  $\mu\text{m}$  de large et qui peut également exister sous une autre forme ronde dite coccoïde viable mais non cultivable [18].

*H. pylori* est une bactérie micro aérophile, uréase, catalase et oxydase positives. Elle possède 3 à 5 flagelles polaires et en gaines conférant une motilité et permettant un mouvement rapide dans la muqueuse gastrique visqueuse lui assurant ainsi une meilleure colonisation [19].

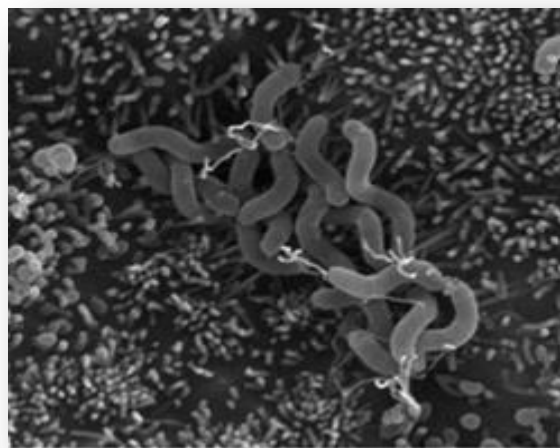


**Figure03 : Hélicobacter pylori.**

*H. pylori* résiste à l'acidité gastrique en hydrolysant l'urée en ammoniac, grâce à son uréase. Elle est également capable de résister au stress oxydatif généré par la réponse immunitaire grâce à la catalase ainsi que d'autres éléments de défense tels que la superoxide dismutase et l'alkylhydroperoxide réductase [20].



**Figure04 : Photo d'une *H. pylori* en microscopie électronique.**



**Figure05 : *H.pylori* au niveau des cellules épithéliales gastriques.**

*H. Pylori* ont été classifié comme la Classe I cancérigène par l'Organisation Mondiale de la santé et malgré la présence répandue des maladies attribuables aux organismes, on en connaît peu de leur mode de transmission et de l'écologie microbienne [21].

### **2.3. Taxonomie d' *H.pylori***

*H. pylori* est une bactérie de forme hélicoïdale découverte dans une zone de l'estomac proche du pylore, d'où son nom. Elle est classée dans le règne des Bacteria, la division Proteobacteria, la classe Epsilonproteobacteria, l'ordre des Campylobacterales, la famille Helicobacteraceae, le genre Helicobacter et l'espèce *H.pylori* [22].

### **2.4. Facteurs majeurs de virulence**

*H. pylori* possède une multitude de facteurs de virulence codés par des gènes dont le polymorphisme est à la base d'un déterminisme pathologique plus ou moins sévère. Ces facteurs de pathogénicité peuvent déclencher et moduler la nature de la réponse inflammatoire et altérer l'intégrité de la muqueuse gastrique conférant à cette bactérie un caractère carcinogène et pro-inflammatoire. *H. pylori* colonise très efficacement la muqueuse grâce à sa motilité, son chimiotactisme, sa résistance à l'acidité gastrique et sa capacité d'adhésion aux cellules épithéliales. La persistance de l'infection par *H. pylori* est rendue possible par des stratégies d'échappement aux défenses immunitaires incluant des mécanismes enzymatiques, des capacités à faire varier les motifs antigéniques présents à sa surface et le relargage d'antigènes immun-dominants servant de leurres aux anticorps [23].

### **2.5. Adaptation d' *H.pylori* au milieu**

La grande mobilité et la morphologie spiralée de *H. pylori* lui permettent de traverser le mucus beaucoup mieux que les autres germes. *H. pylori* est aussi sensible que les autres bactéries à l'acidité gastrique, cependant, on a montré qu'en présence d'urée, il restait viable 2 heures dans un milieu à PH 2. Cette résistance est due à sa puissante uréase qui, en hydrolysant l'urée normalement présente dans l'estomac, libère de l'ammoniac qui tamponne l'acidité du milieu suffisamment longtemps pour permettre à la bactérie de gagner, à travers le mucus, les cellules muqueuses gastriques, là où le PH est voisin de la neutralité [18].

La réaction d'hydrolyse d'urée est importante pour le diagnostic de *H. pylori* par test respiratoire.

### **2.6. Le cycle de vie (pathogénie) de l' *H.pylori***

*H.pylori* est capable de survivre dans l'acide de l'estomac car il produit des enzymes qui neutralisent l'acide.

Ce mécanisme permet aux bactéries de se loger dans le mur protecteur muqueux de l'estomac. Quand la bactérie est dans le mur muqueux, les défenses naturelles du corps ne peuvent l'atteindre. Le système se défendra contre l'infection, mais il ne sera pas capable de tuer les bactéries puisqu'elles sont dans le mur muqueux de l'estomac. Le système immunitaire continuera à se battre en envoyant des substances nutritives aux combattants de

l'estomac, mais *H. pylori* se nourrira de ses substances nutritives lui permettant ainsi de survivre dans l'estomac.

Les bactéries affaiblissent le mur muqueux de l'estomac. L'acide et les bactéries irritent l'estomac entraînant ainsi la gastrite (inflammation de l'estomac) et peut aussi causer des ulcères quelques jours après l'infection initiale. Ironiquement ce ne sont pas les bactéries *H. pylori* qui causent les ulcères mais bien les bactéries de l'inflammation [24].

### **2.7. Transmission d' *H.pylori***

Le réservoir exclusif de *H. pylori* est l'estomac de l'homme. Plusieurs animaux qui avaient été considérés comme des réservoirs potentiels (porc, chat, mouton, singe) sont maintenant disculpés. Les mouches et les cafards pourraient être impliqués si la bactérie était éliminée en quantité importante et sous forme viable dans les selles.

Les sources de contamination potentielles sont les vomissures, la salive et les selles. Chez les sujets infectés, *H. pylori* est toujours présent au niveau des vomissures et va survivre quelques heures dans l'environnement. La salive est parfois positive, du fait de régurgitations, mais les selles ne renferment des formes viables qu'en cas de transit accéléré et de manière inconstante. La transmission survient essentiellement dans l'enfance et est le plus souvent intrafamiliale. Cependant, il a pu être démontré, que la bactérie peut survivre pendant 30 heures chez des mouches domestiques. De ce fait, on pense qu'il est possible qu'il y ait des réservoirs dans l'environnement et que des mouches ou d'autres insectes puissent transmettre le germe de façon indirecte par l'intermédiaire d'aliments ou d'eau potable. De plus *H. pylori* a pu être mis en évidence dans l'estomac de chats et d'autres animaux domestiques, alors que leur rôle dans la transmission de la bactérie n'est pas précisé et est probablement d'importance mineure [25].

#### **2.7.1. Transmission oro-orale**

C'est le mode prédominant de transmission des *Helicobacter* chez l'animal; chez l'homme, le visage de l'enfant en contact étroit avec celui des adultes qui l'entourent, est hautement exposé à leurs projections salivaires.

#### **2.7.2. Transmission féco-orale**

L'hypothèse de la contamination à partir des selles a été longtemps écartée, du fait que l'excrétion fécale de la bactérie est difficile à mettre en évidence, en raison des concentrations bactériennes inférieures à celles des micro-organismes pathogènes, habituellement rencontrés. En fait, contrairement à ces derniers, *H. pylori* n'est pas dégradé dans l'estomac mais il y est métaboliquement stimulé par activation de son uréase. Il est donc possible, que des doses faibles soient infectantes.



### 2.7.3. Transmission par le matériel d'endoscopie

On peut certainement contaminer un sujet au cours d'une endoscopie digestive haute, ce risque de transmission de *H. pylori* est un des motifs de désinfection du matériel endoscopique entre deux examens [26].

### 2.8. Maladies provoquées par *H.pylori*

L' *H.pylori* a été associé à beaucoup de maladies comme des ulcères duodénaux, ulcères gastriques, cancer de l'estomac et la dyspepsie (indigestion). Cette infection a été aussi liée aux gastrites (inflammation de l'estomac) chez les adultes et les enfants. Les personnes infectées ont plus de risques d'avoir le cancer de l'estomac et avoir des lymphomes (tumeurs malignes dans les tissus lymphatiques).

Si l'ulcère cause vraiment un saignement, le saignement prolongé peut provoquer l'anémie menant à des faiblesses et de la fatigue. Si les saignements sont importants (vomissement de sang ou excréments contenant du sang), il peut y avoir d'importants problèmes [27].

### 2.9. Traitements de *H.pylori*

Puisque nous savons maintenant que la plupart des ulcères sont causés par *H. pylori*, des régimes antibiotiques appropriés peuvent supprimer l'infection avec succès chez la plupart des patients, avec la résolution complète d'inflammation muqueuse et une chance minimale pour la répétition d'ulcères.

La thérapie pour l'infection *H. pylori* dure de 10 jours à 2 semaines d'un ou deux antibiotiques efficaces, comme l'amoxicilline, tetracycline ( ne peut pas être utilisé pour des enfants < 12 ans.), metronidazole, ou clarithromycin, plus citrate de bismuth ranitidine, bismuth subsalicylate, ou un inhibiteur de pompe de proton. La suppression acide par le H2 blocker ou l'inhibiteur de pompe de proton en accord avec les aides d'antibiotiques soulage des symptômes concernant l'ulcère (c'est-à-dire, la douleur abdominale, la nausée), les aides guérissent l'inflammation muqueuse gastrique et peuvent augmenter l'efficacité des antibiotiques contre *H. pylori* à la surface muqueuse gastrique.

La résistance antibiotique et le refus d'obéissance des patients sont les deux raisons majeures de l'échec de traitement. En général des régimes de thérapie triples ont montré des meilleurs taux d'extermination que la thérapie duelle. La durée plus longue de traitement (14 jours contre 10 jours) aboutit aux meilleurs taux d'extermination.

Un traitement aux antibiotiques entraînera, dans 9 cas sur 10, la disparition de la bactérie de votre estomac: vous serez alors à jamais guéri de la maladie ulcéreuse qui vous assaillait depuis de nombreuses années. Les combinaisons d'antibiotiques pour traiter les ulcères sont variées. On les accompagne également de médication antiacide. Le but du traitement est de détruire la bactérie et de redonner à votre estomac des conditions optimales de guérison [28].

Les personnes infectées par le *H. pylori* reçoivent habituellement une trithérapie qui dure en tout de 7 à 14 jours.

La trithérapie comprend un inhibiteur de la pompe à protons (IPP) et deux antibiotiques :

- ✓ Le médicament appelé IPP réduit la production d'acide dans l'estomac, ce qui permet aux tissus endommagés par l'infection de guérir.
- ✓ Les antibiotiques aident à s'assurer que le traitement soit efficace.

L'infection à *H. pylori* réagit habituellement au traitement. Le traitement guérit l'infection à *H. pylori* chez 80 à 90 % des gens.

Pour certains spécialistes les trithérapies probabilistes ne sont plus suffisamment efficaces et adaptées pour rester recommandées (résistance aux antibiotiques) et un traitement séquentiel associant trois antibiotiques est nécessaire.

- ✓ IPP à double dose en 2 prises pendant 10 jours.
- ✓ Amoxicilline 1g matin et soir pendant les 5 premiers jours.
- ✓ Puis Clarithromycine 500mg matin et soir + Trnidazole 500mg matin et soir les 5 jours suivants [29].

## **II.LA SHIKIMATE 5-DEHYDROGENASE**

### **1. GENERALITES**

La voie du shikimate est présente uniquement chez les bactéries, les champignons et les plantes. Les animaux ne possèdent pas cette voie métabolique, ceci ayant pour conséquence Que les acides aminés aromatiques doivent faire partie intégrante de leur alimentation. La spécificité de ce métabolisme aux microorganismes et aux plantes supérieures a conduit à la recherche et à l'obtention de nouveaux antibiotiques et herbicides ayant pour cibles moléculaires des enzymes intervenant dans cette voie [30].

### **2. DEFINITION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE**

Shikimate 5-déshydrogénase (SDH) est la quatrième enzyme dans la voie shikimique et a été étudié abondamment à servir de biocatalyseur possible et en tant que cibler pour herbicide inhibition [31 ; 32]. Elle catalyse la réduction réversible de 3 déhydroshikimate à shikimate avec NAD (P) H comme donneur d'électrons.

### **3. FONCTION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE**

La shikimate déshydrogénase est une enzyme qui catalyse une étape de la voie du shikimate. Cette voie est trouvée dans des bactéries, des plantes, des champignons, des algues, et des parasites et est responsable de la biosynthèse des acides aminés aromatiques

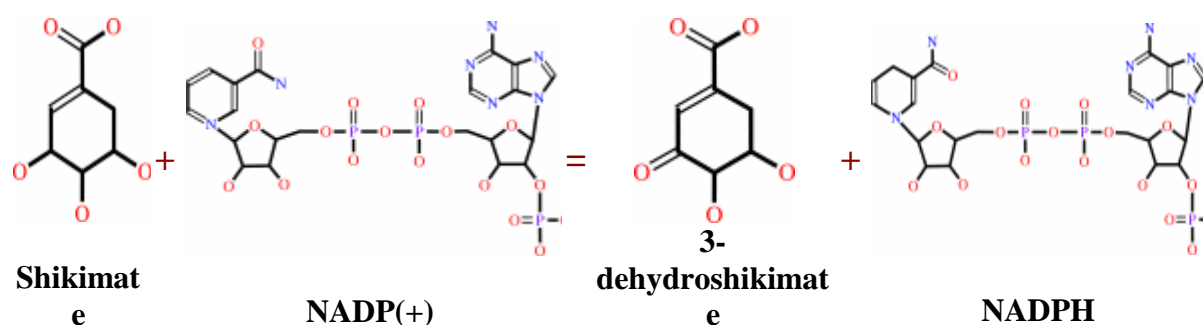


(phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et du métabolisme des glucides. En revanche, les animaux et les humains n'ont pas cette voie où les produits de cette voie de biosynthèse des acides aminés sont essentiels qui doivent être obtenus par le biais du régime alimentaire d'un animal.

Il existe sept enzymes qui jouent un rôle dans cette voie. Shikimate déshydrogénase (également connu sous le nom déshydrogénase 3-déhydroshikimate) est la quatrième étape du processus en sept étapes. Cette étape convertit 3-déhydroshikimate à shikimate ainsi que de réduire le NADP<sup>+</sup> en NADPH.

#### 4. LA REACTION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE

Shikimate déshydrogénase catalyse la réaction réversible NADPH-dépendante de la 3-déhydroshikimate à shikimate. L'enzyme réduit la liaison carbone-oxygène à double liaison d'un groupe fonctionnel carbonyle en un groupe hydroxyle (OH), la production de l'anion shikimique. La réaction est dépendante de NADPH est oxydé en NADP<sup>+</sup> + NADPH. [33]



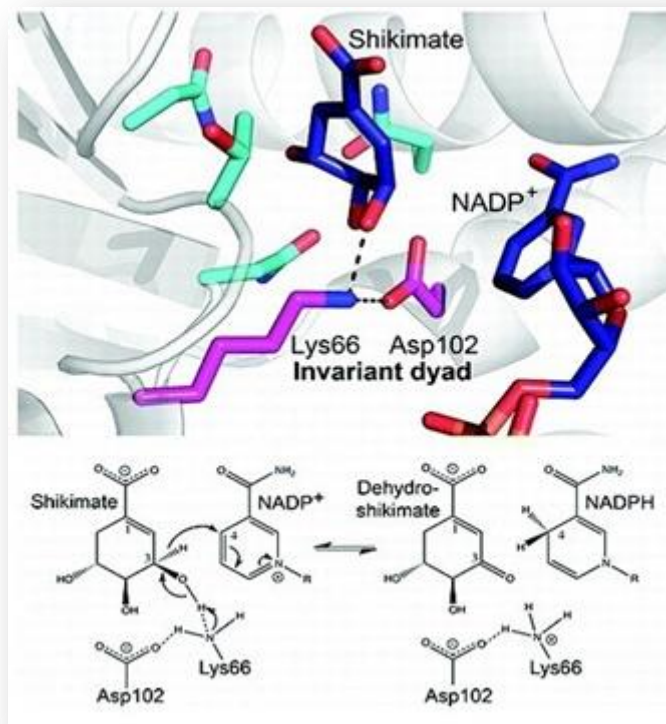


Figure06 : Réaction de la shikimate déshydrogénase.

## 5. LE MODE D'ACTION DE LA SHIKIMATE DESHYDROGENASE

### 5.1. Le domaine N terminal

Le domaine de liaison de substrat shikimate déshydrogénase trouvé à l'extrémité N-terminale se lie au substrat, la 3-déhydroshikimate. Il est considéré comme étant le domaine catalytique. Il a une structure de six brins bêta formant un feuillet bêta torsadée avec quatre hélices alpha.

### 5.2. Le domaine C terminal

Le domaine C-terminal se lie à NADPH. Il a une structure spéciale qui compose à deux domaines le premier domaine de fixation de NADPH, le second domaine catalytique.

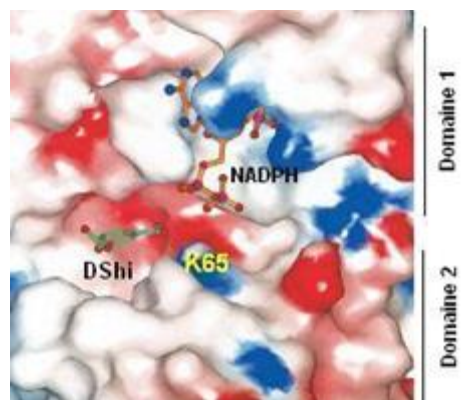


Figure07 : Le domaine C de shikimate déshydrogénase.

## 6. LES INHIBITEURS DE SHIKIMATE DEHYDROGENASE

AroE a été déterminée comme une cible prometteuse pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens.

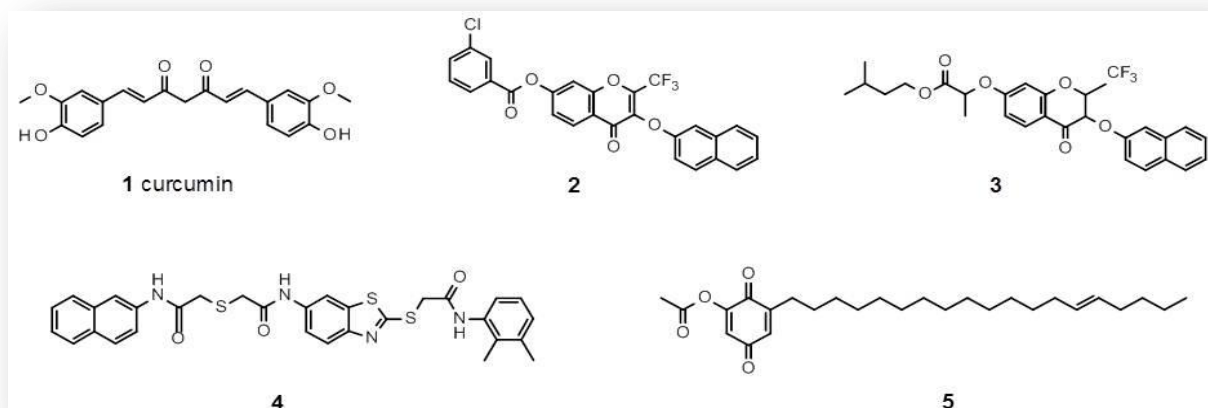


Figure08 : Les inhibiteurs de shikimate déshydrogénase.

Compte tenu de la diversité des SDH, la mesure exacte dans laquelle d'autres SDH peuvent compenser la perte de la fonction AroE doit être clarifiée.

La capacité potentielle de SDH supplémentaires dans le génome d'un agent pathogène donné pour compléter la perte de la fonction AroE peut rendre une approche chimio thérapeutique qui cible cette enzyme largement inefficace et peu pratique. Ainsi l'ensemble des SDH présents dans un pathogène donné ainsi que leur caractéristique enzymatique par

rapport au substrat spécificités et affinités doivent être établies en premier afin de permettre une déclaration concluante si une telle approche est prometteuse. Pour autant que nous savons qu'il ya un seul rapport sur les inhibiteurs SDH, où le gène *aroE* SDH codé de *H. pylori* a été utilisé dans un criblage à haut débit. Cette approche a conduit à l'identification de cinq inhibiteurs de HpSDH nouveaux:

le curcumin (1), la 3 - (2-naphtyloxy)-4-oxo-2-(trifluorométhyl)-4H-chromène-7-yle 3-chlorobenzoate (2), de butyle 2 - {[3 - (2-naphtyloxy)-4-oxo-2-(trifluorométhyl)-4H-chromène-7-yl] oxy} propanoate de méthyle (3), le 2 - ({2 - [(2 - {[2 - (2,3-diméthylanilino)-2-oxo-éthyl] sulfanyl} -1,3-benzothiazol-6-yl) amino] -2 oxoéthyl} sulfanyl)-N-(2-naphtyl) acétamide (4), et le diacétate de maesaquinone (5) présentant des valeurs de IC<sub>50</sub> sur la HpSDH de 15,4, 3,9, 13,4 et 3,5 uM, respectivement. Pour la structure chimique des composés consulter la Figure 8 [34].

Les composés 1 et 4 sont des inhibiteurs compétitifs du shikimate et les composés 2 et 3 des inhibiteurs compétitifs par rapport à NADP. Le composé 5 n'a pas montré une inhibition compétitive avec shikimique ou NADP, ce qui suggère qu'il n'est pas un inhibiteur compétitif de l'enzyme. Parmi les cinq composés uniquement des substances 2 et 5 avaient un effet modéré de *H. pylori* avec la croissance des valeurs de CMI de 16 et 32 ug / mL, respectivement, tandis que les composés 3 et 4 n'ont montré aucune inhibition significative. Le curcumin est considéré comme l'élément le plus actif de la plante vivace herbacée longa Curcuma, qui est une épice courante dans les currys de la cuisine du Sud-est asiatique et du Moyen-Orient. Dans une deuxième étude, son effet sur 65 cliniques de *H. pylori* isolé de Kolkata a été étudiée résultant des variations de CMI variant de 5 à 50 pg / ml. En outre, son efficacité dans la réduction des lésions gastriques a été étudiée histologiquement dans un système de souris [35].

CHAPITRE 2:  
LE DOCKING  
MOLECULAIRE

## 1. INTRODUCTION

Connaitre la structure en trois dimensions des macromolécules et comprendre leurs mécanismes de complication est fondamental pour la compréhension des systèmes biologiques, et donc essentiel dans de nombreux domaines.

Dans ce but, la chimie apporte sa collaboration à la biologie structurale qui s'intéresse quant à elle au rapport qui existe entre la structure des molécules et leur fonction biologique cette union débouche sur des avancées couvrant différentes applications, telles que :

- ✓ La recherche pharmacologique (conception de médicaments en trouvant un ligand, c'est-à-dire une molécule médicamenteuse complémentaire, à assembler avec un récepteur membranaire connu).
- ✓ La biologie cellulaire (interaction entre macromolécules, protéines ou acides nucléiques, intervenant dans les cycles cellulaires).
- ✓ La recherche médicale (élaboration de nouveaux traitements visant les cellules une à une ...).

Le plus souvent, le récepteur est une protéine qui possède un ou plusieurs sites actifs spécifiques, plus ou moins accessibles selon les cas. Le ligand est généralement une molécule flexible étrangère de petite taille. La liaison entre le ligand et le récepteur introduit un signal biologique qui peut avoir diverses formes [36].

## 2. DEFINITION DE DOCKING MOLECULAIRE

Le Docking moléculaire vise à prédire la structure d'un complexe formé par deux molécules, la formation de ces complexes est fondée sur la reconnaissance de la structure tridimensionnelle d'un ligand par site récepteur et contrôle de l'activité de nombreuses molécules [37].

Le processus de docking consiste à faire interagir une petite molécule organique avec le récepteur, généralement de nature protéique. Des études ont montré que certains algorithmes de docking sont plus fiables que d'autres pour reproduire le mode de fixation expérimentale de ligands [38 ,39 ,40].

## 3. PRINCIPE DE DOCKING

Le docking moléculaire se déroule en deux étapes principales [41] :

- ❖ La première consiste à rechercher et générer toutes les conformations possibles et donc générant les modes d'interaction possibles entre la protéine et le ligand. Cette étape doit parcourir au mieux l'espace conformation elle pour trouver l'énergie minimale globale.

- ❖ La deuxième est une donnée numérique dite fonction de score capable de déterminer la conformation qui représentera le mode d'interaction le plus juste pour chaque ligand par rapport à son récepteur. En calculant rapidement l'énergie libre totale du complexe protéine-ligand formé : c'est l'étape de marquage de score [42].

#### 4. PRINCIPE THEORIQUE

Docking (ancrage ou amarrage en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interactions entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible de docking) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand). Le récepteur macromoléculaire étant le plus souvent une protéine [43]. Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring.

- La première (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celle qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à 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 [43,44].

#### 5. LES INTERACTIONS PROTEINE-LIGAND

Pour attacher un ligand à une protéine (docking) le problème est de prédire la conformation et l'orientation du ligand relative au site actif de la protéine cible. Le docking est la base de la reconnaissance moléculaire et du type de l'interaction [45].

Les interactions entre une protéine et un ligand sont en général de nature non covalente.

L'énergie libre de Gibbs se calcule selon l'Équation 1 [46] :

$$\Delta G = -RT \ln K_i = \Delta H - T\Delta S$$

#### Équation 1. Energie libre de Gibbs

*R*: constante des gaz (8,314 J. K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>)

*T*: Température (K)

*K<sub>i</sub>*: constante d'inhibition

- Les interactions intermoléculaires

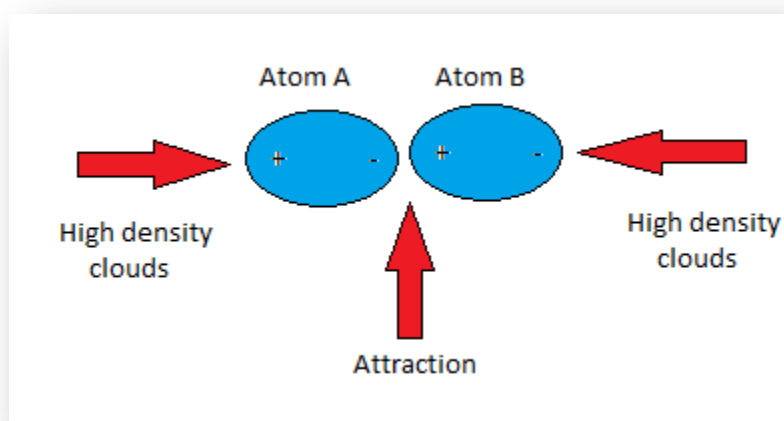
Les interactions intermoléculaires, plus faibles par leur nature que des liaisons covalentes ou intramoléculaires permettant ainsi de distinguer molécules et assemblages de molécules sont adressées souvent sous le nom “interactions non covalentes”, “interactions faibles” ou “interactions van der Waals”(VDW). Les interactions intermoléculaires ont un rôle important dans des domaines aussi variés que la physique, la chimie et la biologie.

Le Docking moléculaire est l'étude des interactions non-liantes intervenant lors de la formation de complexes moléculaires telle que :

- ✓ Les interactions VDW.
- ✓ Les interactions électrostatiques.
- ✓ Les interactions Hydrogènes.

Le but du Docking moléculaire est de déterminer le mode d'interaction d'un complexe formé de deux ou de plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur [47].

Types Van Der Waals lorsqu'elles se rapportent aux nuages électroniques de deux atomes adjacents conduisant à la présence d'une force attractive pour des distances de 3-4 Å° (ces forces comprennent une composante attractive à longue portée [force de dispersion de London] et une composante répulsive à très courte portée). De par leur grand nombre, ces interactions jouent un rôle important dans la stabilisation des complexes et favorisent leur compacité.



**Figure09 : Les forces de Van Der Vaals.**



Types hydrogènes lorsqu'elles se forment de manière électrostatique entre un atome d'hydrogène(H), lié lui-même par covalence à un atome électronégatif (O, N, S) (donneur) et un atome électronégatif possédant une paire d'électrons non partagée (accepteur). Les liaisons hydrogènes sont plus fortes que les liaisons de Van der Waals ; leurs énergies sont estimées entre 3 et 9 kcal/mol. Les acides aminés polaires peuvent ainsi former des liaisons hydrogène entre eux ou avec des molécules d'eau à très courte distance (0.8 à 2.8 Å). Les liaisons hydrogènes sont peu nombreuses et s'adaptent à la flexibilité (l'angle peut varier de 120° à 180°).



Figure 10 : La liaison Hydrogène.

Les liaisons hydrogènes habituelles sont :

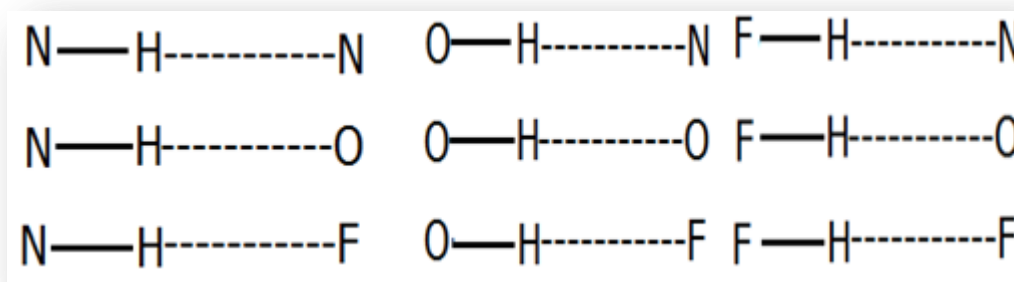


Figure11 : Les différentes liaisons hydrogènes

De types hydrophobes et de solvations lorsque les molécules non polaires tendent à se rapprocher les unes des autres afin de limiter les contacts avec l'eau, et créer entre elles des liaisons dites interactions non covalentes.

## 6. LES PROGRAMMES DE DOCKING MOLECULAIRE

Le docking est une méthode qui prédit l'orientation d'une molécule dans le site actif du récepteur pour former le complexe le plus stable. Il est basé sur deux approches : la complémentarité des surfaces et le calcul d'énergie du complexe [48]. De nombreux

programmes de docking sont disponibles [49] (voir le tableau 1) tels que SURFLEX et GOLD sont devenus des outils utilisés régulièrement par les modélisateurs moléculaires.

Nom	Editeur	Site Internet
<b>Auto Dock</b>	Scripps	<a href="http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/">http://www.scripps.edu/mb/olson/doc/autodock/</a>
<b>Dock</b>	UCSF	<a href="http://dock.compbio.ucsf.edu/">http://dock.compbio.ucsf.edu/</a>
<b>Flex X</b>	BioSolveIT	<a href="http://www.biosolveit.de/flexX/">http://www.biosolveit.de/flexX/</a>
<b>Fred</b>	Open Eyes	<a href="http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html">http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html</a>
<b>Glide</b>	Schrödinger	<a href="http://www.schrodinger.com/Products/glide.html">http://www.schrodinger.com/Products/glide.html</a>
<b>Gold</b>	CCDC	<a href="http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/">http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/</a>
<b>ICM</b>	Molsoft	<a href="http://www.molsoft.com/products.html">http://www.molsoft.com/products.html</a>
<b>Ligand Fit</b>	Accelrys	<a href="http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html">http://www.accelrys.com/cerius2/c2ligandfit.html</a>
<b>Surflex</b>	Biopharmics	<a href="http://www.biopharmics.com/products.html">http://www.biopharmics.com/products.html</a>

**Tableau 01 : Les principaux programmes de docking moléculaire.**

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

- Définir une géométrie du complexe.
- Évaluer la qualité de cette géométrie.
- Recommencer en classant les géométries.

Une simulation de Docking comprend essentiellement deux étapes le searching et le scoring.

La première sert à trouver et sélectionner des géométries possibles pour le complexe en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine. Elle est utile pour échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) éventuelles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables. Cette étape est le plus souvent exécuter de manière automatisée à l'aide d'algorithme de Docking, ce qui améliore la vitesse et précision des simulations. La seconde consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine dans chacun des complexes sélectionnée lors de l'étape précédente. Cette tâche est accomplie par des outils informatiques nommés fonctions de score. Celles-ci évaluent d'abord les différentes contributions énergétiques pour la stabilisation des complexes protéine-ligand, et les ordonnent ensuite, pour permettre l'identification des modes d'interactions les plus probables [50,51].

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

### ❖ Searching

Il existe plusieurs méthodes de recherche de l'espace conformationnel, celles basées sur la

complémentarité géométrique d'une part et celles fondées sur la complémentarité atomique d'autre part. Elles utilisent différents algorithmes (Monté Carlo, recherche stochastique, exhaustive, construction incrémentale...etc.) afin de trouver le meilleur positionnement du ligand au sein de la cavité enzymatique [52].

### ❖ Scoring

Les résultats du docking consistent le plus souvent en différentes poses du ligand dans le site d'interaction, correspondant à plusieurs conformations favorables que le ligand peut adopter. Les méthodes de "scoring" permettent d'évaluer l'énergie de liaison du complexe formé et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking.

Ce score permettra d'une part de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées, mais également de classer la meilleure pose de différents ligands pour identifier les meilleurs d'entre eux.

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe [53].

## **7. EVALUATION DES PROGRAMMES DE DOCKING**

Les performances d'un programme de docking sont évaluées en termes de capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Le mieux possible signifie que la valeur du RMSD (Root Mean Square Deviation) entre la pose du ligand calculée par le logiciel et la conformation dans le complexe expérimental est la plus petite possible. Le positionnement, c'est-à-dire l'identification correcte du site de liaison sur la protéine, l'orientation et la conformation du ligand influent sur la valeur du RMSD [54].

CHAPITRE 3:  
MATERIEL ET  
METHODES

## 1. MATERIEL

Dans notre étude nous avons utilisé :

- ❖ Deux micro-ordinateurs présentant les performances suivantes :
  - Un PC Packard bell avec 2GO de RAM, 320 GB HDD et une vitesse de 2;20 GHz.
  - Un PC HP avec 4GO de RAM, 320 GB HDD et une vitesse de 2,53 GHz.
- ❖ Le réseau internet comme outil principal pour le téléchargement des programmes, des complexes et des ligands dont on a besoin.
- ❖ Surfex v 1.3, 2005 [55]: logiciel de docking.
- ❖ ArgusLab v 4.0.1 2003 [56]: logiciel de docking et de construction moléculaire.
- ❖ MSViewer v 4.2 : programme de visualisation des molécules.
- ❖ Une banque de données appelée la PDB (Protein Data Bank) [57]: c'est la principale source de données de biologie structurale, elle permet en particulier d'accéder à des structures 3D de protéines d'intérêt pharmaceutique. Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN.

## 2. METHODES

Pour réaliser le docking il faut avoir les structures dont on a besoin et pour cela il faut consulter la PDB.

### 2.1. Banque de données protéiques « Protein Data Bank »

La banque de données protéiques contient 30 structures cristallographiques de la shikimate déshydrogénase de *H.pylori* dont la majorité est sous forme de complexes avec le shikimate.

Les principales différences entre ces complexes sont :

- ✓ Le microorganisme : *Helicobacter pylori* , *Salmonella enterica*....
- ✓ Oligo-éléments : Ca, K...
- ✓ Divers ligands.

### 2.2. Le protocole d'utilisation des logiciels

#### 2.2.1. ArgusLab

Les étapes de la réalisation du docking moléculaire sont les suivantes :

1. Après démarrage du programme ouvrir le fichier de la molécule en cliquant sur le signe +, une liste va apparaître.
2. Cliquer sur le miscellaneous (misc) une liste de ligand va apparaître.
3. Choisir le ligand et cliquer dessus pour le sélectionner en rouge.

4. Cliquer sur le menu Edit/Hide unselected ou appuyer sur les touches Ctrl+U pour cacher le reste du complexe et obtenir le ligand seul.
5. Ajouter les hydrogènes en cliquant sur la lettre H.
6. Sélectionner le ligand, cliquer sur le bouton droit de la souris et choisir l'option « Make a ligand group from this residu » nous obtiendrons le ligand dans le groupe.
7. Sélectionner la molécule dans le miscellaneous (misc) et appuyer sur les touches Ctrl+C puis Ctrl+V, nous obtiendrons la copie du ligand.
8. Sélectionner la copie puis cliquer sur le bouton droit de la souris choisir l'option « Make a ligand group from this residu » pour obtenir la copie dans le groupe.
9. Ouvrir le dossier groupe en cliquant sur le signe + les molécules que nous avons créées apparaissent à l'intérieur du dossier.
10. Cliquer sur le premier ligand qui est le ligand de référence et le renommer en cliquant sur le bouton droit de la souris et choisir l'option Modify group et en le renommant X-ray.
11. Changer la couleur des deux ligands pour bien les différencier en cliquant sur le bouton droit de la souris et choisir l'option set color.
12. Sélectionner le ligand de référence pour déterminer les acides aminés du site actif en cliquant sur le bouton droit de la souris et choisir l'option Make a binding site group for this group.
13. Faire le docking en cliquant sur calculation qui se trouve en haut et choisir l'option dock à ligand dans le menu en haut ou bien appuyer sur le raccourci Alt+D. Après quelques temps et selon la taille du ligand nous observons ce dernier qui prend place à l'intérieur du site d'interaction de la protéine, ainsi l'énergie d'interaction et le temps de calcul entre le ligand et la protéine s'afficheront sur l'écran.
14. Calculer RMSD en sélectionnant les deux ligands et en appuyant sur la touche shift, puis cliquer par le bouton et avec le bouton droit de la souris choisir l'option calcul RMSD, une boîte de dialogue apparaîtra.

### La construction des molécules

ArgusLab permet de construire de nouvelles molécules et de modifier celles existant déjà dans la littérature, pour mieux comprendre comment construire une molécule on peut consulter "tutorials" en cliquant sur help/tutorials and FAQs, un sommaire contenant les principaux titres apparaîtra, ensuite cliquer sur "molecule builder".

#### 2.2.2. Surflex

Pour réaliser l'arrimage il faut passer par :

- La séparation de la protéine et du ligand : pour cela il y a deux méthodes, l'une consiste à utiliser le fichier wordpad c'est-à-dire que les constituants des molécules apparaissent sous

format texte, et l'autre c'est la technique que nous avons choisie et qui est plus rapide, elle consiste en l'utilisation du logiciel MSViewer :

1. Cliquer sur le menu File/Open.
2. Choisir le complexe.
3. Cliquer sur Window /New Hierachy Window ou bien le raccourci Ctrl+ H.
4. Cliquer sur le signe + pour obtenir le contenu du complexe (les chaines de la protéine, les ligands et les molécules d'eau).
5. Pour obtenir la protéine seule il faut garder l'une des chaines et supprimer le reste.
6. Pour obtenir le ligand seul il faut garder l'un des ligands de la même chaine et supprimer le reste.
7. Enregistrer les modifications sous format pdb et les renommer en ajoutant la lettre P pour la protéine et L pour les ligands.

- Réalisation du docking en utilisant l'invite de commandes MS Dos :

1. Création du site d'interaction (Protomol) en lançant la commande suivante :  
Surflex-dock proto ligand.pdb proteine.pdb pl
2. Le docking :  
Surflex-dock dock ligand.pdb pl-protomol.mol2 proteine.pdb
3. Le calcul de RMS :  
Surflex-dock rms final-0.mol2 ligand.pdb
4. En cas de l'obtention d'un rms supérieur à 2 et inférieur ou égal à 3, on peut lancer la commande suivante pour optimiser le résultat.  
Surflex-dock oprms final-0.mol2 ligand.pdb

-La visualisation :

Après l'arrimage vient l'étape de la visualisation par le biais de MSViewer :

1. Cliquer sur file/open dans la barre des menus pour ouvrir les différents fichiers :
  - ✓ La protéine.
  - ✓ Le ligand de référence.
  - ✓ Le final-0.
  - ✓ L'optrms dans certains cas.
2. Changer la couleur du ligand de référence (vert), le final-0 (violet), oprms (bleu)
3. Cacher les hydrogènes de la protéine en cliquant sur tools /hydrogens /hide dans la barre des menus.
4. Mettre les fenêtres verticalement en cliquant sur window/tile vertical dans la barre des menus pour visualiser le tout.

5. Copier et coller au niveau de la protéine le ligand de référence, final-0 et l'optrms(en cas d'une optimisation du RMSD) pour comparer leur superposition au niveau du site d'interaction.

6. Enregistrer les résultats des modifications effectuées et les renommer.

Pour réaliser l'inhibition de la shikimate déshydrogénase il est indispensable de tester la fiabilité des deux logiciels utilisés « ArgusLab, Surfex »

### 2.3. Le test de fiabilité des logiciels

Deux programmes de docking ArgusLab (v 4.0.1 2003), Surfex (v1.3, 2005) ont été testés sur 160 complexes protéines-ligands tirés de la PDB.

Les performances d'un programme de docking peuvent être jugées au moyen de deux critères : détermination du RMSD suivi d'une visualisation et du coefficient de corrélation.

#### 2.3.1. RMSD (root mean square deviation)

Correspond à la moyenne de la déviation de chacun des atomes du ligand (ligand de calcul) par rapport à ceux de la molécule d'origine (le ligand de référence).

Les performances d'un programme de docking sont évaluées en termes de capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Le mieux possible signifie que la valeur du RMSD (Root Mean Square Deviation) entre la pose du ligand calculée par le logiciel et la conformation dans le complexe expérimental est la plus petite possible. Le positionnement, c'est-à-dire l'identification correcte du site de liaison sur la protéine, l'orientation et la conformation du ligand influent sur la valeur du RMSD.

#### 2.3.2. Coefficient de corrélation

En probabilités et en statistiques, étudier la corrélation entre deux ou plusieurs variables aléatoires ou statistiques numériques, c'est étudier l'intensité de la liaison qui peut exister entre ces variables. La liaison recherchée est une relation affine. Dans le cas de deux variables numériques, il s'agit de la régression linéaire.

Une mesure de cette corrélation est obtenue par le calcul du coefficient de corrélation linéaire. Ce coefficient est égal au rapport de leur covariance et du produit non nul de leurs écarts types. Le coefficient de corrélation est compris entre -1 et 1.

Ce test consiste à évaluer le degré de corrélation qui existe entre l'affinité des inhibiteurs simulés par docking moléculaire à l'aide du programme Surfex et les valeurs de leurs IC50 (la concentration anti bactérienne inhibant 50 % de la multiplication bactérienne) déterminées expérimentalement par des essais *in vitro* et obtenues à partir de la littérature [58].

La liste des complexes protéines-ligands testés sera retrouvée dans l'Annexe-1.



### 3. INHIBITION DE L'ENZYME DU COMPLEXE 3PHH

#### 3.1. Choix du complexe 3PHH

Parmi les 30 complexes de la shikimate déshydrogénase (SDH) de *H. pylori* trouvés dans la PDB, nous avons choisi le complexe 3phh en raison de sa bonne résolution (1.45Å), son bon rmsd (1.42Å) et sa bonne affinité ( $5.05M^{-1}$ ) par rapport aux autres complexes testés, son ligand est le shikimate. L'inhibiteur considéré dans cette étude est le curcumin, inhibiteur naturel de la SDH de *H. pylori* selon la littérature.

Pour qu'un médicament soit biodisponible oralement, il doit répondre à certains critères définis par la règle de Christopher A. Lipinski [59]:

Outre une affinité qui lui confère une activité biologique, une molécule tête de série doit pouvoir survivre dans l'organisme humain suffisamment longtemps pour pouvoir exercer cette activité biologique. Les propriétés d'ADME-T de ces molécules se vérifient lors de la première phase clinique, c'est-à-dire chez le sujet sain. Lipinski définit un ensemble de règles permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Ces règles concernant les propriétés physico-chimiques ont été définies après l'analyse de 2245 médicaments commercialisés ou en phase finales de développement :

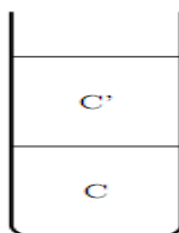
- ✓ le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da).
- ✓ le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1-octanol, noté LogP, doit être inférieur à 5.
- ✓ le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 5.
- ✓ le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 10.
- ✓ le nombre de liaisons rotatives doit être inférieur à 15.

- **Définition du LogP**

On considère le partage d'un soluté entre l'eau et un solvant non miscible

(Hexane, éther, chloroforme, octanol...).

Le coefficient de partage P est égal au rapport des concentrations du soluté dans les deux phases :



$C'$  : solvant (saturé d'eau).

$C$  : eau (saturé de solvant).

$P = C/C'$ .

$C' > C \Rightarrow P > 1 \Rightarrow \log P > 0$  : le soluté est dit lipophile (hydrophobe).

$C' < C \Rightarrow P < 1 \Rightarrow \log P < 0$  : le soluté est dit hydrophile.

Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins 2 des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité. En effet, moins de 10 % des molécules en phase clinique présentent plus de deux critères en dehors de la gamme préconisée par Lipinski.

### 3.2. Calcul des interactions « enzyme- composés substitués »

Dans le but de développer de nouveaux inhibiteurs plus efficaces shikimate dehydrogenase, nous avons utilisé comme structure de départ, le meilleur inhibiteur étudié le curcumin .

Afin d'améliorer l'affinité de le curcumin, plusieurs groupements fonctionnels présentant la capacité d'engager des liaisons hydrogène avec le site actif de l'enzyme ont été introduits sur différentes positions de la molécule. Il s'agit des fonctions : acide (-COOH) ; amine (-NH<sub>2</sub>) ; amide (CONH<sub>2</sub>), hydroxyle(OH). (Voir Figure 12).

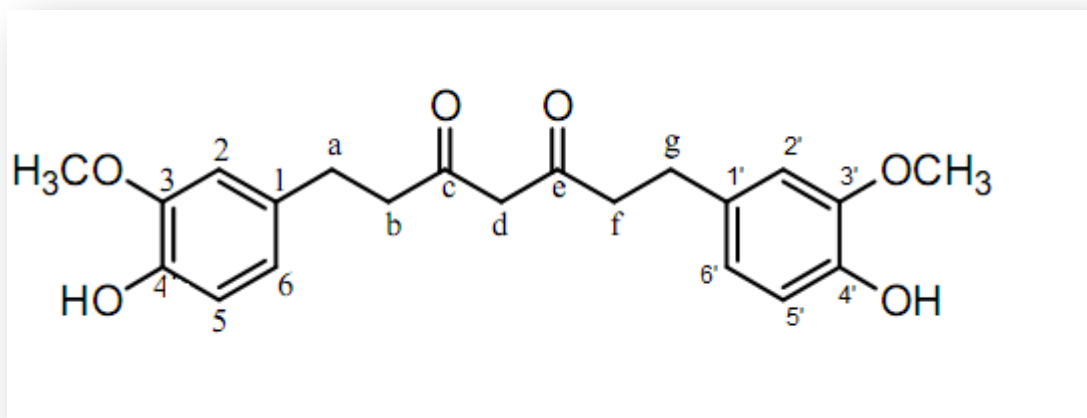


Figure 12 : Structure du curcumin.

3.2.1. Les mono-substitutions

composé	Mono substitution											
	C2	C3	C4	C5	C6	a	b	c	d	e	f	g
1		NH2										
2	NH2											
3			NH2									
4				NH2								
5					NH2							
6							NH2					
7								NH2				
8		COOH										
9	COOH											
10			COOH									
11				COOH								
12					COOH							
13						COOH						
14							COOH					
15								COOH				
16			OH									
17				OH								
18					OH							
19						OH						
20							OH					
21									OH			
22										OH		
23		CONH2										
24			CONH2									
25				CONH2								
26					CONH2							
27	CONH2											
28						CONH2						
29							CONHH2					
30								CONH2				
31									CONH2			
32										CONH2		
33						NH2						
34									NH2			
35											CONH2	
36												CONH2

37										OH			
----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----	--	--	--

Tableau02 : Les mono-substitutions du curcumin .

3.2.2. Les bi-substitutions

Composé	BI SUBSTITUTION											
	C2	C3	C4	C5	C6	a	b	c	d	e	f	G
38	OH	NH2										
39	OH				OH							
40	NH2	COOH										
41		COOH		NH2								
42		COOH					OH					
43	OH							COOH				
44	OH							CONH2				
45	COOH	COOH										
46	OH						COOH					
47								COOH		OH		
48	OH					OH						
49	OH						COOH					
50	COOH	OH										
51	COOH							OH				
52	OH									COOH		
53		COOH						NH2				
54	OH								COOH			
55							COOH	COOH				
56						OH			COOH			
57			OH					COOH				
58	COOH		NH2									
59					OH			NH2				
60	OH			COOH								
61	NH2		OH									
62	NH2		COOH									
63	NH2						COOHH					
64	OH						OH					
65	OH							NH2				
66								COOH		OH		
67								COOH		COOH		
68	OH	COOH										
69				OH	OH							
70	OH							COOH				
71	OH						COOH					
72	OH		NH2									
73			NH2					NH2				
74	OH				OH							
75				COOH			COOH					
76				COOH				COOH				
77							COOH	COOH				
78	OH	OH										
79		OH		OH								
80			NH2		CONH2							
81	NH2				CONH2							
82								NH2	NH2			
83		CONH2							CONH2			
84		CONH2						CONH2				
85		CONH2					CONH2					
86		CONH2								CONH2		
87			CONH2				CONH2					

88		NH2					NH2				
89							NH2			NH2	
90				NH2					NH2		
91			NH2		OH						
92	NH2						COOH				
93	COOH		NH2								
94				COOH				NH2			
95					OH	COOH					
96									COOH		CONH2
97				NH2				COOH			
98						OH	OH				
99				COOH			COOH				
100			CONH2				COOH				
101					CONH2					COOH	
102		OH									NH2
103	OH	CONH2									
104								COOH		NH2	
105			CONH2	CONH2							
106						OH					COOH
107	OH									OH	

Tableau03 : Les bi-substitutions du curcumin.

- **La visualisation des liaisons hydrogènes établies entre le ligand et les acides aminés du site actif :**
  - ❖ Ouvrir le fichier de la protéine du final-0, ou de l'optrms via MSViewer.
  - ❖ Sélectionner le ligand, puis le copier et le coller au niveau du site d'interaction de la protéine en cliquant sur Edit/Copy puis Paste dans la barre des menu, ou bien appuyer sur le raccourcis Ctrl+ C puis Ctrl+V.
  - ❖ Sélectionner le ligand une fois collé dans le site actif, puis cliquer sur tools/Monitor/Hbonds pour visualiser les liaisons hydrogènes établies entre le ligand et les acides aminés du site d'interaction.
  - ❖ Cliquer sur chacun des atomes reliés avec le ligand par un trait discontinu en vert, puis marquer cet acide aminé en cliquant par le bouton droit de la souris et choisir l'option Label : changer la couleur et s'assurer des options suivante résidu, Name ensuite cliquer sur les boutons Apply/Ok.
  - ❖ L'acide aminé sélectionné apparait en bas de l'écran.
  - ❖ Ensuite faire la même chose avec le final-0 du similaire (meilleure affinité) choisi pour comparer les deux résultats.



CHAPITRE 4:  
RÉSULTATS ET  
DISCUSSION

## 1. TESTS DE FIABILITE DES PROGRAMMES DE DOCKING

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de SDH par diverses molécules, à savoir le curcumin et ses dérivés mono et bi-substitués, nous avons jugé utile d'évaluer tout d'abord la performance des 2 programmes Surflex et ArgusLab en faisant appel à trois tests différents :

- L'écart quadratique moyen ou le RMSD (Root mean square deviation).
- L'analyse visuelle.
- Le coefficient de corrélation linéaire (r).

### 1.1. Le test RMSD

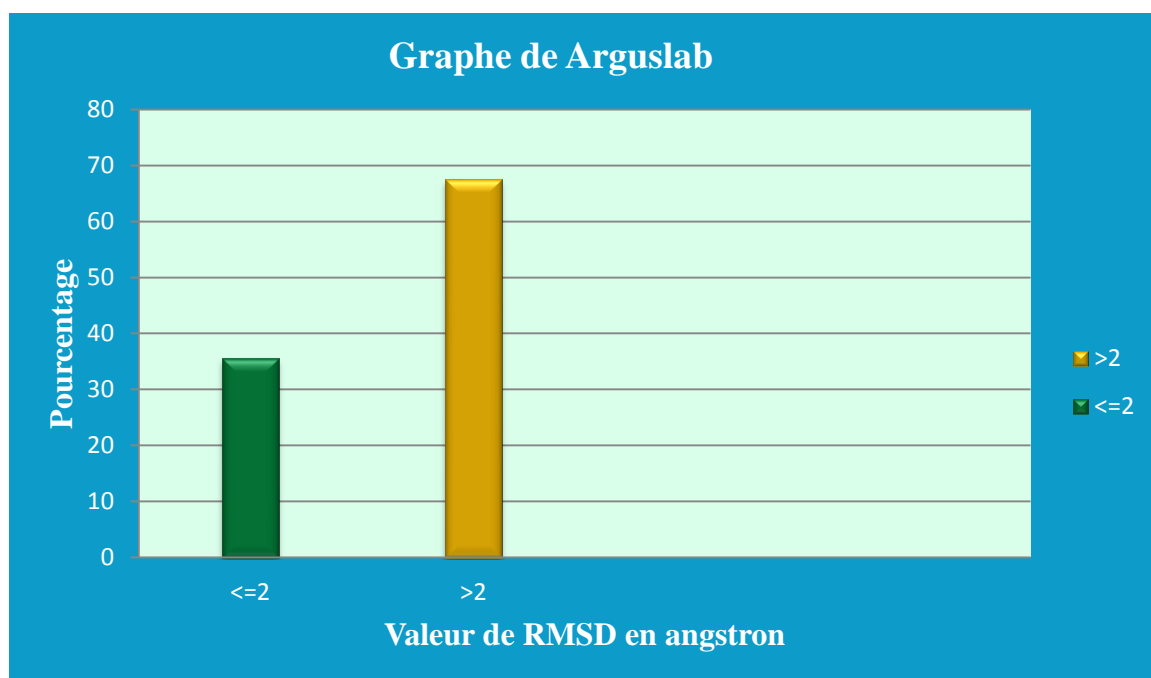
La prédiction du mode d'interaction consiste à déterminer le positionnement correct du ligand par rapport à son récepteur. La capacité d'un programme à réussir ce travail est habituellement jugé au moyen de la déviation quadratique moyenne ou RMSD de la position du ligand calculée par le logiciel par rapport au ligand de référence existant au niveau de la PDB.

La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms [60-61]. La performance des deux logiciels a été évaluée sur 160 complexes protéines-ligands (annexe1) tirés de façon aléatoire de la PDB.

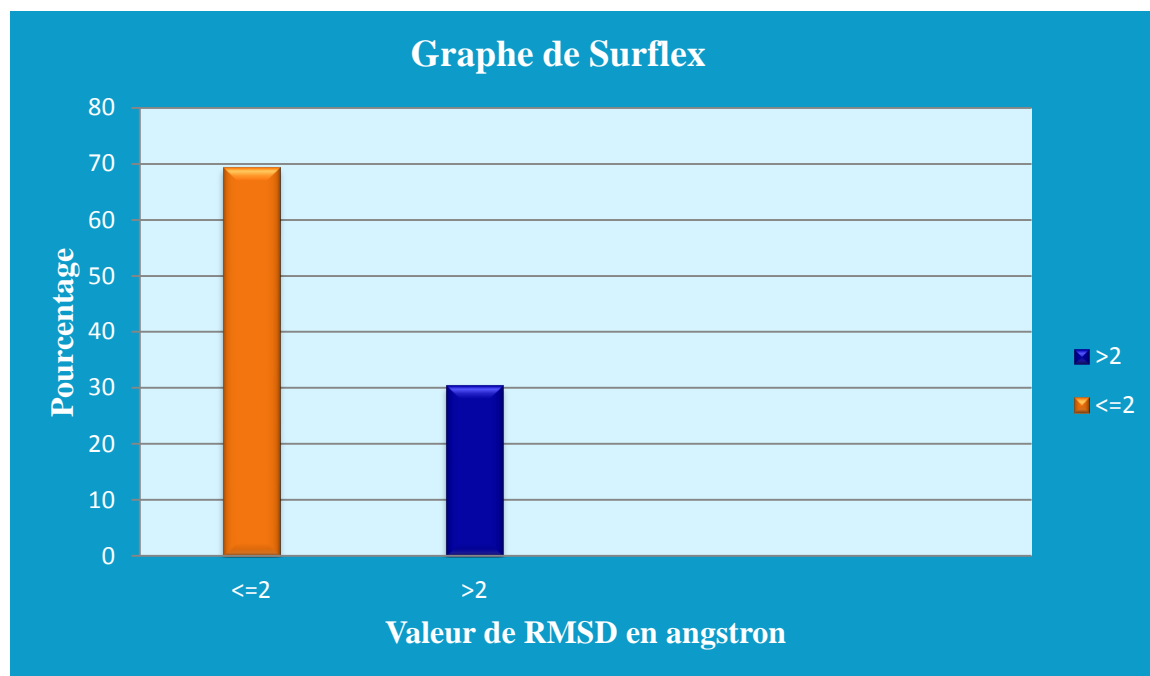
Les écarts quadratiques moyens entre la position du ligand du complexe cristallographique et celles des ligands amarrés par Surflex et ArgusLab, ont été calculés. Une prédiction correcte (résultat positif) est définie par un RMSD entre le mode d'interaction prédit et la structure cristalline, inférieur à 2 Å.

Dans les graphes suivants, les résultats sont donnés en pourcent (%), à deux intervalles de RMSD représentés pour les deux programmes : Surflex et ArgusLab.

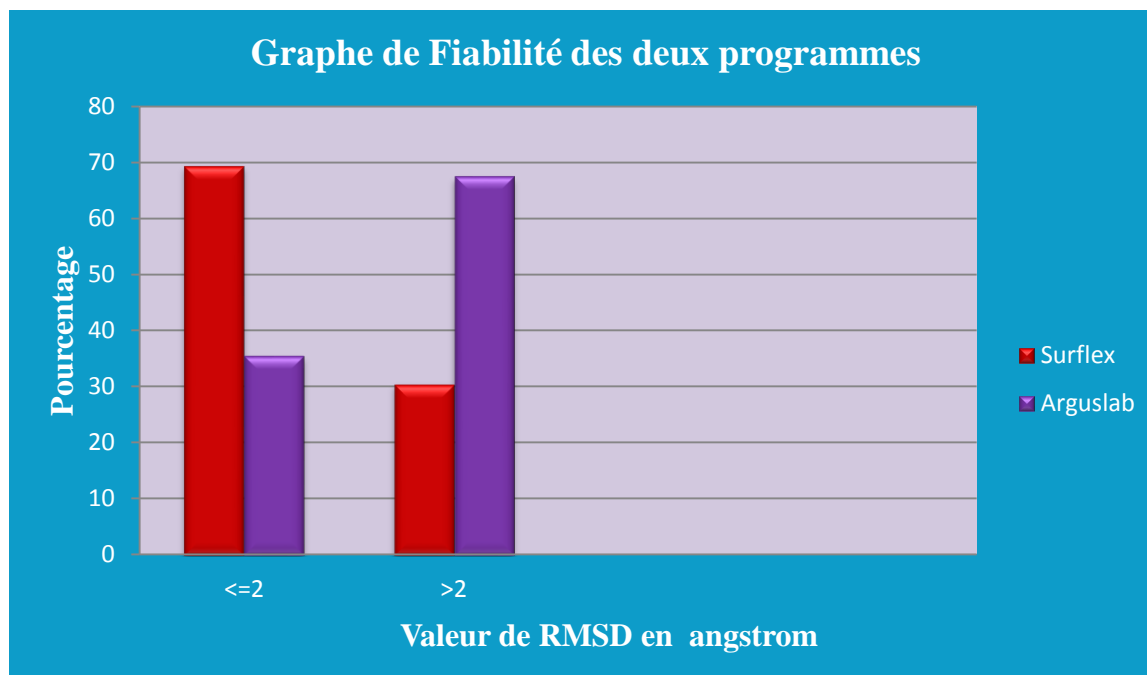




**Graphe01 : Résultats en % obtenus par ArgusLab à deux intervalles de RMSD (Å).**



**Graphe 02 : Résultats en % obtenus par Surfex à deux intervalles de RMSD (Å).**



**Graphe03 : Comparaison des deux programmes.**

Nous remarquons d'après ces résultats que le programme Surfex reproduit bien les données expérimentales, contrairement à ArgusLab. En effet, 69,37% des valeurs de RMSD sont inférieures ou égale à 2 Å pour Surfex, et 35,5% seulement pour ArgusLab. Le programme ArgusLab est moins fiable que Surfex car les valeurs de RMSD qu'il donne sont en général supérieures à 2 Å. Et aussi, le temps de calcul requis par le programme Surfex pour le docking d'un ligand est plus court que le temps requis par le programme ArgusLab.

Ces résultats montrent que le programme Surfex est beaucoup plus performant qu'ArgusLab et qu'il peut être utilisé en arrimage moléculaire pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

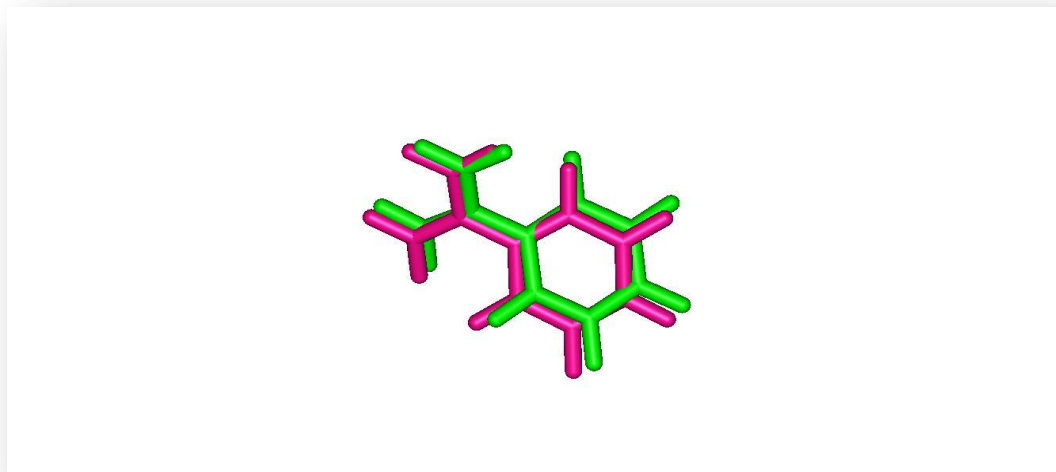
Le même programme utilisé par Chikhi A. (2007), et Teniou S. (2012) Présente des résultats positifs plus élevés soit 88.4 %, et 85.8% respectivement [45-62]. Avec ces résultats, nous confirmons que Surfex est suffisamment efficace dans la modélisation par docking moléculaire.

## 1.2. L'analyse visuelle

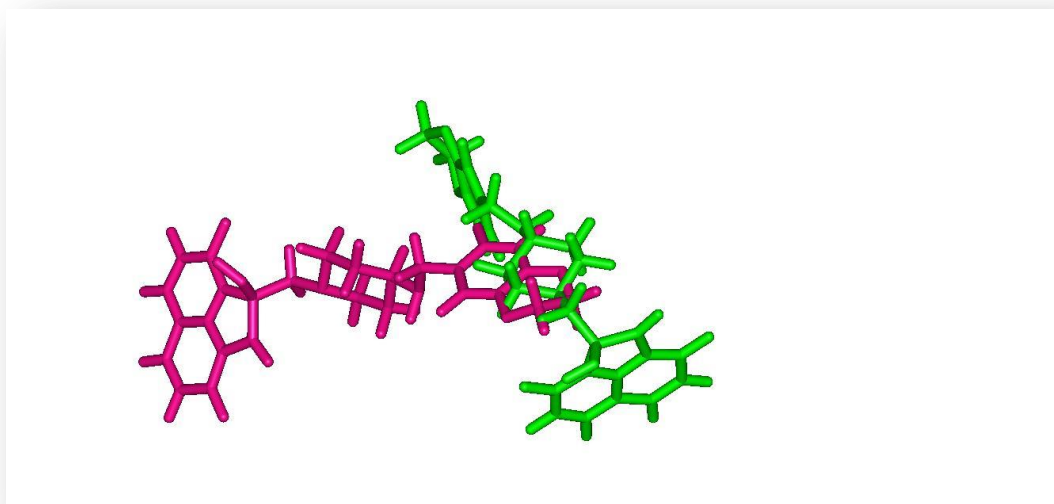
- **Visualisation des complexes**

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape essentielle pour juger la performance du programme SURFLEX. Elle permet de visualiser les résultats décrits par la valeur numérique RMSD.

La comparaison des conformations expérimentales des 2 complexes (colorée en rose) : le 3ITI (le meilleur), le 4BUL (le mauvais) avec les conformations optimales calculées par le logiciel SURFLEX (colorées en vert), est montrée dans les figures suivantes.



**Figure 13 :** Superposition de l'inhibiteur (coloré en rose) et final-0 calculé par Surfex (Coloré en vert) du complexe 3ITI (RMSD=0,455Å).



**Figure14 :** Superposition de l'inhibiteur (coloré en rose) et final-0 calculé par le Surfex (Coloré en vert) du complexe 4BUL (RMSD=7.802 Å).

Dans le premier complexe, avec un RMSD de 0.455 Å, on obtient une bonne superposition de la solution du docking avec celle coordonnée de la structure observée expérimentalement. De ce fait la superposition est presque parfaite (figure 13); alors que dans le deuxième complexe, avec un RMSD de 7.802 Å elle est mauvaise, c'est à dire du ligand arrimé est éloigné de ligand naturel (figure 14).

### 1.3. Le coefficient de corrélation (r)

L'analyse par régression linéaire a été réalisée sur différents complexes dont l'activité biologique a déjà été testée. La corrélation entre l'activité biologique et le résultat obtenu par le docking moléculaire est un des moyens pour tester la fiabilité du programme Surflex dans cette étude.

**IC50** : c'est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition de l'enzyme.

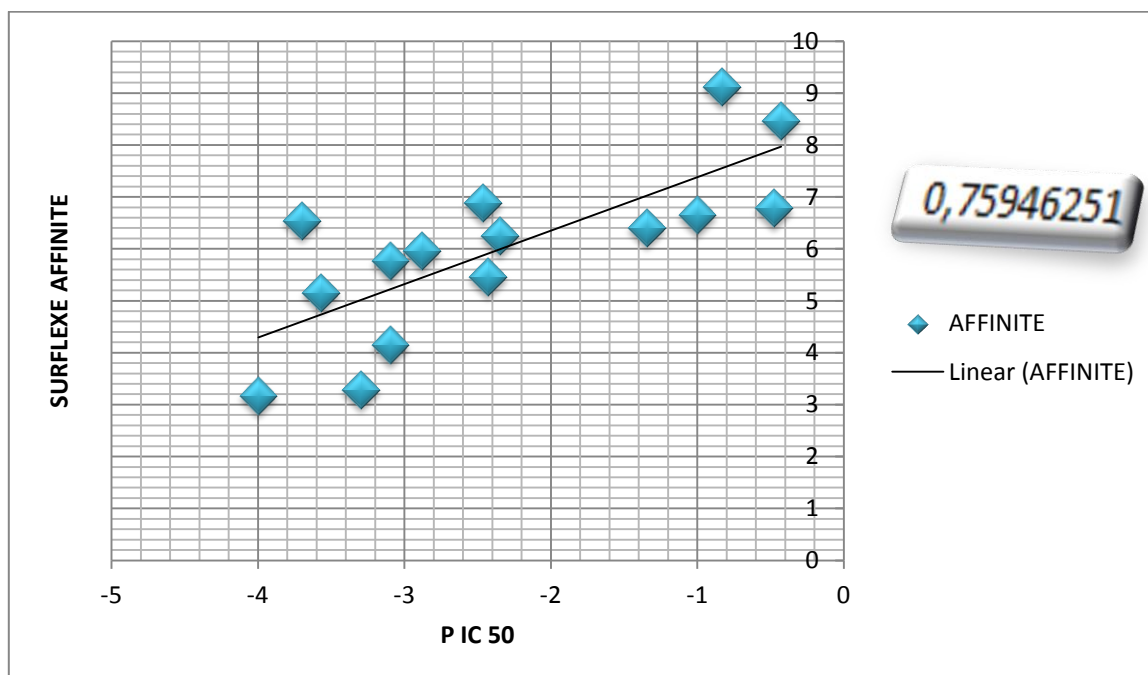
Ce test consiste à évaluer le degré de corrélation qui existe entre l'affinité de 15 complexes différents simulés par docking moléculaire avec Surflex.

Ces complexes téléchargés à partir de la PDB dans le format pdb portant des codes et des IC50 différents, Dans le tableau ci-dessous nous présentons les valeurs suivantes IC 50 =  $-\log IC_{50}$  et l'affinité données par Surflex.

N	CODE	IC 50(nm)	P IC50	AFFINITE (M <sup>-1</sup> )
1	2AA6	22	-1.342	6.41
2	2EW5	1250	-3.096	5.77
3	2W1C	10	-1	6.66
4	2W1G	3	-0.477	6.79
5	2VPP	760	-2.880	5.97
6	2W4I	5000	-3.698	6.55
7	2FB8	290	-2.462	6.89
8	3EIO	223	-2.348	6.25
9	3ITI	270	-2.431	5.46
10	3KWF	6.8	-0.832	9.12
11	3LCS	2.68	-0.428	8.48
12	3FOH	1250	-3.096	4.15
13	3DOZ	1980	-3.296	3.30
14	3MKO	3700	-3.568	5.16
15	3DP1	9920	-3.996	3.18

**Tableau 04: Résultats de l'analyse par régression linéaire.**

L'analyse par régression linéaire a permis d'obtenir la courbe de corrélation suivante (voir figure 15).



**Figure 15 : Corrélation entre l'activité biologique (PIC50) des différents complexes et leurs Affinités données par Surfex.**

Le coefficient de corrélation « r » est égal à 0,75. Ce coefficient montre donc qu'il y a une bonne corrélation entre les deux paramètres analysés, à savoir l'activité biologique représentée ici par PIC50 et les Affinités données par Surfex.

Surflex établit une bonne corrélation ce qui est en accord avec les résultats de Boucherit H. (2012), Mokrani E.H. (2012) soit respectivement : 0,76, 0,86 [63 ; 64].

En conclusion nous retenons le programme Surfex pour poursuivre notre étude de docking moléculaire.

## 2. INHIBITION DE L'ENZYME DU COMPLEXE 3PHH

Dans la perspective de proposer de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la SDH, nous avons pris le curcumin, en tant qu'inhibiteur de la SDH, comme structure de départ (Voir figure 12) et nous avons réalisé des substitutions.

## ❖ Règle de Lipinski

Avant d'entamer le calcul des interactions entre la shikimate et l'inhibiteur étudiés, il est nécessaire d'évaluer les paramètres permettant leur validation comme antibiotiques.

Parmi les principales raisons de l'échec des particules pendant le développement de médicaments, et le manque de succès chez les humains et les problèmes de produits pharmaceutiques, les caractéristiques de l'absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité d'une Molécule peuvent être estimées à partir de sa composition chimique, ce qui permet de réduire défaillance due à de mauvaises propriétés ADME-T.

Ces propriétés ont été mesurées par Molinspiration, il permet de dessiner des molécules ou donner leur formule SMILES et de calculer les propriétés moléculaires importantes (LogP, la surface polaire, le nombre de donneurs et accepteurs de liaison hydrogène...etc.), et leurs valeurs sont présentées dans le tableau suivant :

Ligand	Poids moléculaire (g/mol)	Log P	Donneur d'H	Accepteur d'H	Nb de liaisons rotables
<b>Curcumin</b>	360.318	1.434	1	4	3

**Tableau05 : Les propriétés pharmaceutiques de curcumin.**

Nous remarquons que l'inhibiteur utilisé dans cette étude répond à la règle de Lipinski.

Les résultats du docking entre la SDH et les différents composés mono et bi-substitués ayant présenté des résultats intéressants regroupés dans le tableau suivants :

composés	Affinités ( $M^{-1}$ )
Le substrat shikimate déshydrogénase	5,05
Le curcumin	3,04
Composé 37	5,41
Composé 44	5,77
Composé 103	5,83
Composé 101	6,23

**Tableau 06 : Les affinités des meilleurs composés substitués, le curcumin et le substrat .**

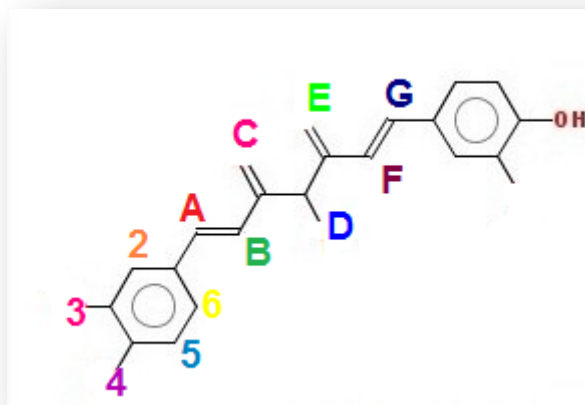


Figure16 : Les positions ciblées lors de la Substitution.

### 2.1. Mono-substitution

Parmi les 37 composés monosubstitués testés, nous avons pu définir un nouveau composé ayant présenté une meilleure valeur d'affinité. (compose37)(Voir figure 17)

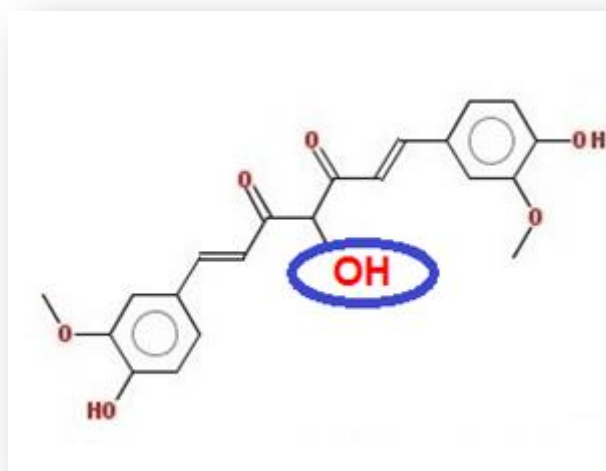
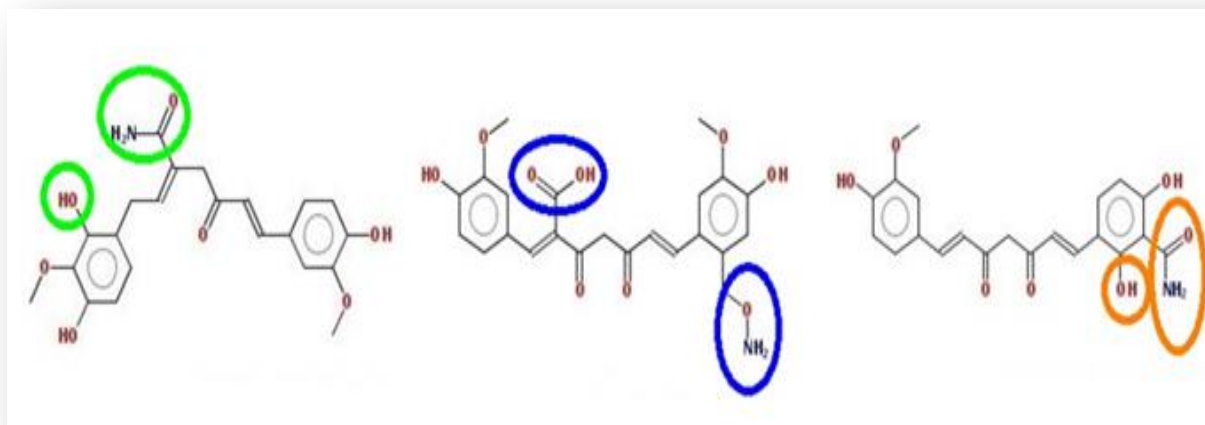


Figure17 : Le meilleur mono substitué (compose37).







**Figure 19 : Les meilleurs dérivés bi-substituée (composé 44, composé101, composé 103).**

Parmi les 68 composés bi substitués, seuls 3 composés ont présenté des affinités supérieures à celle du shikimate ( $5.05 \text{ M}^{-1}$ ), le composé 103 ( $5,83 \text{ M}^{-1}$ ), le composé 44 ( $5,77 \text{ M}^{-1}$ ) et le composé 101 ( $5,63 \text{ M}^{-1}$ ).

La liste des affinités des composés mono et bi-substitués testés sera retrouvée dans l'annexe2.

### 3. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LE CURCUMIN ET SHIKIMATE DEHYDROGENASE

Pour étudier le mode d'interaction de l'inhibiteur avec le site actif de l'enzyme SDH de *Helicobacter pylori* par le docking moléculaire, nous avons utilisé le programme Surflex.

L'analyse visuelle montre que le curcumin est bien placé dans la cavité du site actif de shikimate déshydrogénase (voir figure 20).

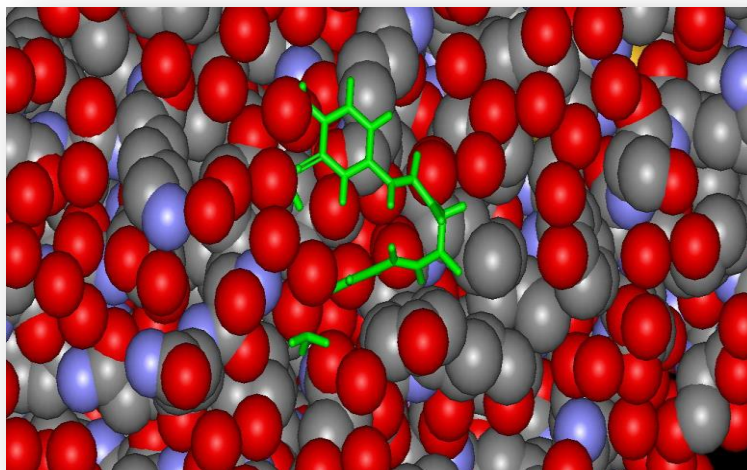


Figure 20 : Illustration du positionnement de l'inhibiteur curcumine dans le site actif de shikimate déshydrogénase.

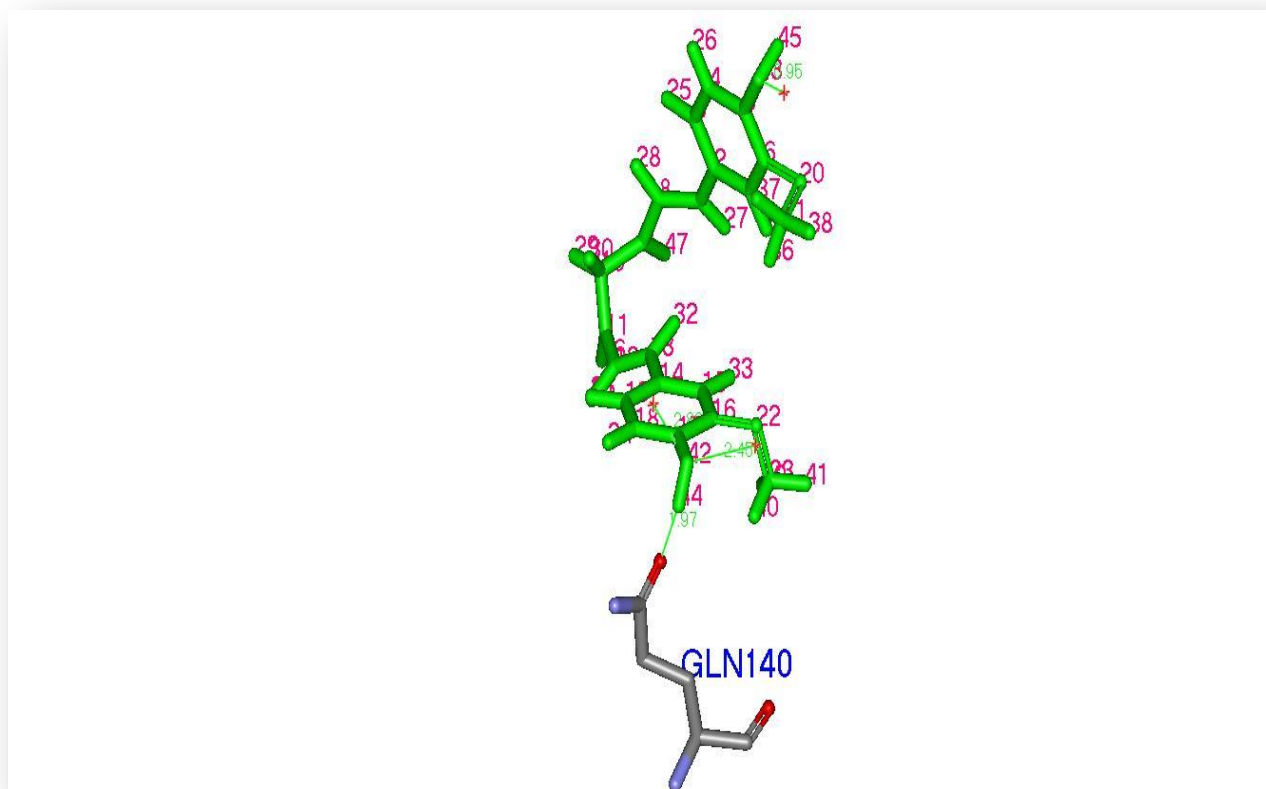


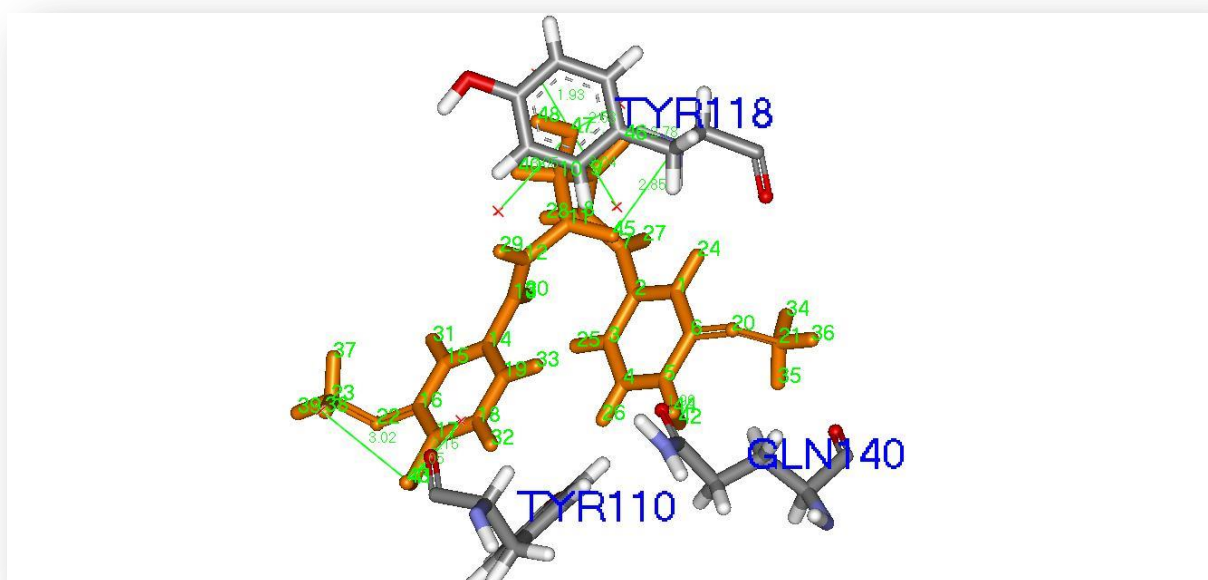
Figure 21 : Le curcumine dans la shikimate dehydrogénase.

On observe la présence de quatre liaisons hydrogène formées pour l'inhibiteur, un pont hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H44) de l'inhibiteur et l'oxygène du résidu GLN 140 (GLN 140-CD -OE1.....H44 ; d=1.97).

Deux ponts hydrogène sont observés d'une part entre l'atome (O42) et 2 molécules d'eau (d= 2.45, d=2.85).

Un pont hydrogène est observé d'une part entre l'atome (O43) et la molécule d'eau (d=0.95).

#### 4. ETUDE DES INTERACTIONS DES COMPLEXES SDH-DERIVES SUBSTITUES



**Figure 22 : Représentation des liaisons hydrogène formées par la SDH et le composé 37.**

On observe la présence de 10 liaisons hydrogène formées pour l'inhibiteur mono substitué (composé 37).

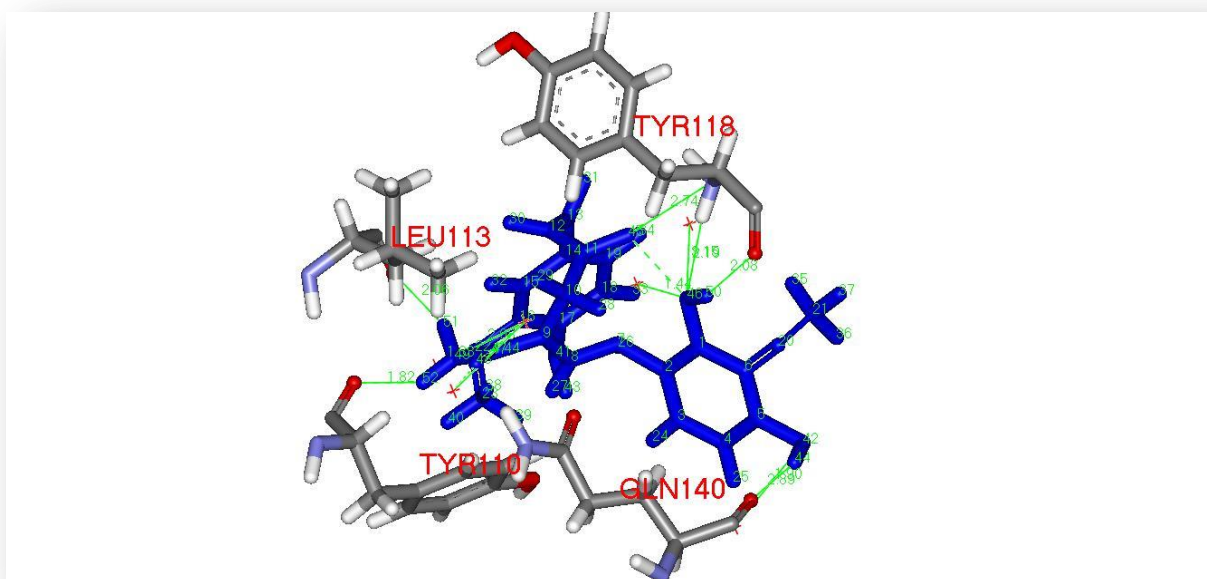
Un pont d'hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H44) du Composé 37 et l'oxygène du résidu GLN 140 (GLN 140-CD -OE1.....H ; d=1.96).

Un pont hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H43) du Composé 37 et l'oxygène du résidu TYR 110 (TYR110 C -O.....H43 ; d=2.05).

Deux ponts hydrogène sont observés entre les atomes oxygènes (O45) et (O46) du composé 37 d'une part et la fonction amine du cycle du résidu TYR 118 d'autre part (TYR 118 CA-N.....O45 ; d=2.85) (TYR 118 CA-N.....O46 ; d=2.78).

Il ya 4 ponts hydrogène sont observés d'une part entre l'atome (O47) et les molécules d'eau (d=3.04 ; d=3.05 ; d=1.93 ; d=2.53).

Deux ponts hydrogène sont observés d'une part entre l'atome (O41) et les molécules d'eau (d=3.02 ; d=2.15).



**Figure 23 : Représentation des liaisons hydrogène formées par la SDH et le composé 44.**

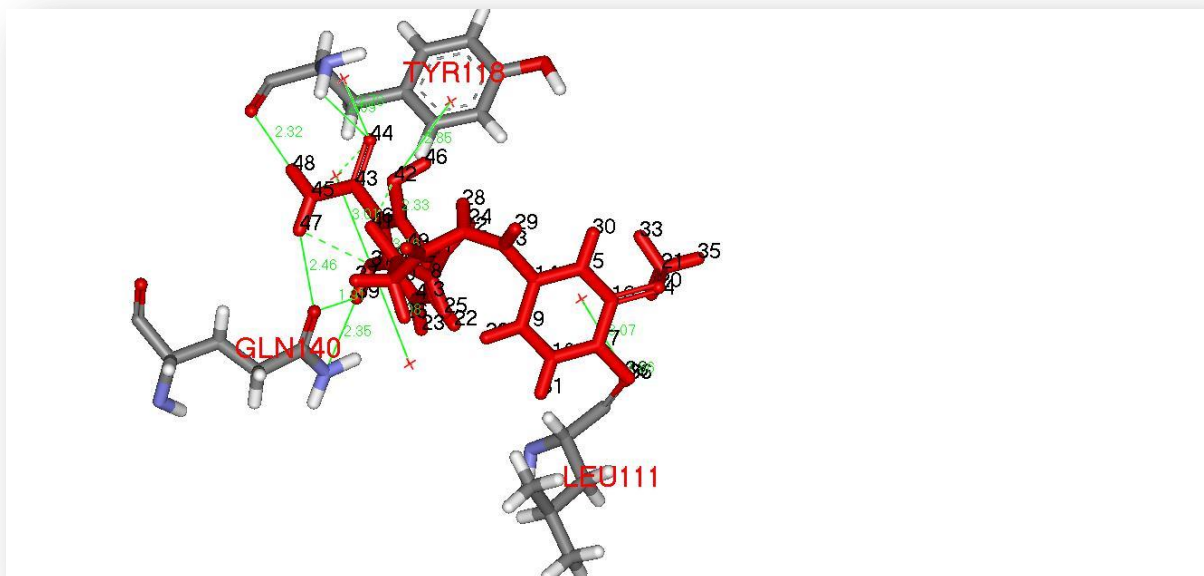
On observe la présence de 12 liaisons hydrogène formées pour l'inhibiteur bi substitué (composé 44).

Un pont d'hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H44) du Composé 44 et l'oxygène du résidu GLN 140 (GLN 140-C-O. ....H44 ; d=1.90).

Un pont d'hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H52) du Composé 44 et l'oxygène du résidu TYR 110 (TYR 110 – C-O.....H52 ; d=1.82).

Un pont d'hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H51) du composé 44 et l'oxygène du résidu LEU 113 (LEU113- C-O.....H51 ;d=2.06).





**Figure 25 : Représentation des liaisons hydrogène formées par la SDH et le composé 103.**

On observe la présence de 12 liaisons hydrogène formées pour l'inhibiteur bi substitué (composé 103).

Un pont hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H38) du composé 103 et l'oxygène O46 du résidu LEU111 (LEU111 C-O....H38; d=1.86).

Deux ponts hydrogène sont observés entre l'atome hydrogène (H39) du composé 103 d'une part et la fonction amine et l'oxygène du résidu GLN 140 d'autre part (GLN 140 CD – NE2.....H39;d=2.35) (GLN 140 CD-OE1.....H39;d=1.91).

Un pont hydrogène est observé entre l'atome hydrogène (H47) du composé 103 et l'oxygène O46 du résidu GLN140 (GLN140 CD-OE1.....H47;d=2.46).

Un pont hydrogène est observés entre l'atome hydrogène (H48) du composé 103 et l'oxygène O46 du résidu TYR 118 (TYR 118 C-O....H48; d=2.32).

Il y a 7 molécules d'eau liées avec le composé 103 , une liée avec l'atome oxygène O36 (O 36;d=3.07), 3 avec l'atome oxygène O37 (O37 ; d=3.08;d=3.01 ; d=3.16), 2 avec l'atome oxygène O42 (O42 ;d=2.85 ;d=2.33) et une liés avec l'atome oxygène O44 (O44 ;d=2.73).

Dans le cas de l'inhibiteur naturel, curcumin, le complexe enzyme-inhibiteur donne une affinité de  $3.04M^{-1}$ . Il forme quatre liaisons hydrogène avec les résidus de



l'enzyme, trois avec les molécules d'eau présentes dans le site actif et une avec le résidu GLN 140.

L'affinité a été améliorée, de manière significative, pour les composés suivants : le 37( $5.41 \text{ M}^{-1}$ ), 44( $5.77 \text{ M}^{-1}$ ), 103( $5.83 \text{ M}^{-1}$ ), 101( $6.23 \text{ M}^{-1}$ ).

Cette amélioration de l'interaction entre la SDH et le composé 37 peut être attribuée à la formation de 2 nouvelles liaisons hydrogène entre les atomes O45 et O46 de l'inhibiteur d'une part et le NH du résidu TYR 118 d'autre part, ce résultat montrant le rôle essentiel de ce carbone dans l'inhibition de SDH.

Les bi substitutions donnent, en général, de meilleurs résultats certainement dus à un plus grand nombre des liaisons hydrogènes qui a atteint 12 pour certains composés.

Les 3 composés bi substitués sont bien placés dans la cavité du site actif de SDH malgré à l'addition des nouvelles fonctions par des différentes positions ; Ces nouveaux groupements interagissent avec les résidus du site actif, et aussi avec les molécules d'eau pour une meilleure stabilité au sein du site actif de SDH.

Malgré une affinité élevée du composé 101( $6.23 \text{ M}^{-1}$ ), le nombre de liaisons hydrogène est de 10 seulement.

- **Application de la règle de Lipinski sur les 4 composés**

Le tableau ci-dessous présente les résultats de la règle de 5 de Lipinski sur les 4 composés présentant une affinité supérieure à celle de shikimate.

Ligand	Poids moléculaire (g/mol)	Log P	Donneur d'H	Accepteur d'H	Nb de liaisons Rotables
Composé37	384.384	1.387	3	7	8
Composé103	397.383	1.228	5	8	8
Composé44	413.426	1.681	5	8	9
Composé101	457.345	0.574	5	10	11

**Tableau07 : Table d'application de la règle de Lipinski sur les 4 composés.**

Les résultats du tableau montrent que les 4 composés s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères de la règle de Lipinski.

CONCLUSION



Notre travail de master avait pour objectif d'acquérir des compétences en simulation informatique, notamment le docking moléculaire par Surfex afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de SDH : cible thérapeutique validée pour le traitement d'ulcère gastrique causé par *Helicobacter pylori*.

Pour cela nous nous sommes appuyés sur de récents travaux expérimentaux montrant que le curcumin est un inhibiteur de la shikimate dehydrogenase.

Dans cette optique, à partir de modifications structurales variées, nous avons cherché à développer une nouvelle molécule.

Ce programme a été développé pour aider principalement, à la mise au point de nouveaux médicaments, le docking moléculaire sert souvent à déterminer l'orientation de petites molécules liées à leurs protéines cibles afin de calculer leur affinité et niveau d'activité Antiulcéreuse dans ce cas, en conservant la structure de base du curcumin.

L'objectif primordial de notre travail a été l'évaluation du programme Surfex utilisé dans ce travail, ce programme est parmi les plus utilisés en modélisation moléculaire, il permet de simuler les interactions entre protéines et ligands et d'aider à la mise au point de molécules à activité thérapeutique. Pour cela nous avons fait appel au test RMSD (Root-mean-square dérivation) pour mieux juger la déviation de la géométrie du ligand simulée par Surfex avec celle déterminée expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB, la détermination du coefficient de corrélation entre l'activité biologique (IC50) et le score de docking moléculaire, Ainsi qu'à l'analyse visuelle des complexes formés.

Dans la première partie de notre travail nous avons testé les deux programmes ArgusLab et Surfex.

Le programme Surfex, peut être considéré suffisamment performant puisqu'il reproduit assez bien les résultats expérimentaux avec plus de 69,39 % des valeurs de RMSD inférieures à 2 Å, Tandis que 35,5 % seulement pour ArgusLab. De plus, une corrélation positive pour le Surfex est obtenue entre les deux paramètres analysés avec  $r = 0,75$ .

Les deux tests du RMSD et de la corrélation ainsi qu'une bonne superposition des ligands simulés et expérimentaux ont permis de conclure que Surfex est un programme de docking moléculaire hautement performant et peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions SDH-curcumin.

Dans une deuxième partie, le docking moléculaire nous a permis d'évaluer l'affinité de curcumin avec une valeur de  $3.04 \text{ M}^{-1}$  comme inhibiteur naturel de la shikimate déshydrogénase.

Dans une troisième partie, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs en prenant comme structure de départ le curcumin. L'activité inhibitrice de cet dernier a pu être améliorée grâce à une approche très utilisée dans le domaine de la conception rationnelle des médicaments : la mono substitution et la bi substitution.

Le composé 37 résultant de la mono substitution de la curcumin par l'introduction d'un groupement hydroxyle sur le carbone D, présente une nette amélioration de son affinité qui passe de  $3.04 \text{ M}^{-1}$  à  $5.41 \text{ M}^{-1}$ .

Aussi une amélioration de l'affinité des trois composés 44, 103 et 101 résultant de la bi substitution du curcumin est observée. En effet, l'introduction de la fonction hydroxyle sur la position C2, et le groupement amide sur la position C, ainsi que la fonction amide sur la position C3 et la fonction hydroxyle sur la position C2 et la fonction amine sur la position 6, F de l'inhibiteur améliorent nettement l'affinité qui passe de  $3,04 \text{ M}^{-1}$  à  $5.77 \text{ M}^{-1}$ ,  $5.83 \text{ M}^{-1}$  et  $6.25 \text{ M}^{-1}$  respectivement.

Enfin, il est important de noter que les différents inhibiteurs de la shikimate dehydrogenase testés dans cette étude sont, en général, conformes aux critères imposés par la règle de *Lipinski*. Pour conclure, au vu des résultats obtenus dans ce travail, qui consiste en l'élucidation de l'inhibition de la SDH par les méthodes de modélisation moléculaire dans le but de découvrir de nouveaux antibiotique nous proposons les composés 37, 44, 103, 101 ; comme nouveaux inhibiteurs potentiels de l'enzyme, cependant, des tests *in vitro* et *in vivo* sont indispensable pour valider ces molécule en tant qu'inhibiteurs de la SDH.

RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

[1] Sordo J. A, Probst M, Corongiu G, Chin S et Clementi E., 1987.- Ab Initio Pair Potentials for the Interactions between Aliphatic amino Acids. Journal of the American Chemical Society, 109, 1702-1708.

[2] Truchon J. F., 2008.- Modéliser la polarisation électronique par un continuum diélectrique intramoléculaire vers un champ de force polarisable pour la chimie bioorganique, Université de Montréal.

[3] Dugas H., 1996.- Principes de base en modélisation moléculaire, Aspects théoriques et pratiques, Chapitre 3 introductions aux méthodes de minimisation d'énergie, Librairie de l'Université de Montréal.

[4] Marle C.M., 2003.- (Université Paris 6-Pierre et Marie Curie, France), De la mécanique classique à la mécanique quantique : pourquoi et comment quantifier?, Université Pierre et Marie Curie Paris, France, P18.

[5] Wilfred F. van Gunsteren et Herman J. C. Berendsen, Angew., 1990.- Chem. International Edition England, 29, 992-1023: "Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry".

[6] Leach A.R., 2001. - Molecular modelling, Principles and Application, Prentice hall, New jersey.

[7] Bastard K., 2005.- Assemblage flexible de macromolécules : la théorie du champ moyen appliquée au remodelage des boucles protéiques. UFR Biologie et Sciences de la Nature.

[8] Liotta D., 1988. - Advances in Molecular Modeling, Ed, JAI Press, P1.

[9] [Consensus development conference on *Helicobacter pylori*. Revised conclusions and recommendations of the Working group (1999)]. Gastro enterol Clin Biol 1999; 23 (10 Pt 2):C95-104.

[10] de Korwin JD. [*Helicobacter pylori*]. Gastroenterol Clin Biol 2007; 31:1110-7; quiz 1108, 1124-6.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [11] Gimenez, F., Brazier, M., Calop, J., Dine, T., Tchiakpé, L., Claerbout, J. F. (2000).  
Traitement de l'ulcère gastro-duodéal dans Pharmacie Clinique et Thérapeutique, Edition  
Masson, Paris, **1065** p.
- [12] Docteur CLIC .Maladies de l'estomac [En ligne]  
<http://www.docteurclic.com/encyclopedie/maladies-de-l-estomac.aspx>  
Consulté le : [10-15-03-2014].
- [13] Caducee.net. L'ulcère gastro-duodéal [En ligne]  
<http://www.caducee.net/DossierSpecialises/gastro/ulcere.asp>  
Consulté le : [15-03-2014].
- [14] Maux de A a Z Ulcère de l'estomac - Ulcère gastrique - Ulcère duodéal [En ligne]  
<http://www.espritsante.com/3-fiche-382-Ulcere+de+l+estomac+Ulcere+gastrique+Ulcere+duodenal.html> Consulté le : [15-18-03-2014].
- [15] MIB – Appareil digestif – Ulcère gastrique et duodéal, gastrite  
[http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle\\_2/MIB/Ressources\\_locales/App-Digest/MIB\\_290\\_ulcere\\_gastrique\\_duodenal\\_gastrite\\_word.pdf](http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/MIB/Ressources_locales/App-Digest/MIB_290_ulcere_gastrique_duodenal_gastrite_word.pdf).
- [16] FDPS, *helicobacter pylori* détaillé  
<http://www.safewater.org/PDFS/knowthefacts/frenchfactsheets/Helicobacterpyloridetaille.pdf>
- [17] Otani, K., T. Watanabe, l. "Anti-inflammatory effects of IL-17A on  
*Helicobacter pylori*-induced gastritis." Biochemical and Biophysical Research  
Communications .1999; **382** :252-258.
- [18] Enroth, H., K. Wreiber. "In vitro aging of *Helicobacter pylori*: changes  
in morphology, intracellular composition and surface properties." *Helicobacter* . 1999; **4** :7-16
- [19] O'Toole, P. W., M. C. Lane, "*Helicobacter pylori* motility." Microbes  
Infect .2000; **2**: 1207-1214.

- [20] Kusters, J. G., A. H. van Vliet,. "Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection." *Clin Microbiol Rev* .2000 ; **19**: 449-490.
- [21] Tan, S., L. S. Tompkins ." *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche." *PLoS Pathog* .1999 ;**5**: e1000407.
- [22] Garrity G, Bell M, Lilburn JA. II. Helicobacteraceae fam. nov. In : Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology New York, NU. Pub. Springer, 2005; pp. 1168-1194.
- [23] Josenhans, C., A. Labigne,. "Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species." *J Bacteriol* 1995; **177**: 3010-3020.
- [24] Pinto-Santini, D. M. and N. R. Salama . "Cag3 is a novel essential component of the *Helicobacter pylori* Cag type IV secretion system outer membrane subcomplex." *J Bacteriol* .2009 ; **191**: 7343-7352.
- [25] Ogura, K., M. Takahashi, "Interleukin-8 production in primary cultures of human gastric epithelial cells induced by *Helicobacter pylori*." *Dig Dis Sci* . (1998);**43**: 2738-2743.
- [26] Oh, J. D., S. M. Karam,. "Intracellular *Helicobacter pylori* in gastric epithelial progenitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* . (2005); **102** : 5186-5191.
- [27] Ohnishi, N., H. Yuasa, "Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* . (2008); **105**. 1003-1008.
- [28] Meyer, F., K. T. Wilson, "Modulation of innate cytokine responses by products of *Helicobacter pylori*." *Infect Immun*. (2000) ; **68**: 6265-6272.
- [29] *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [En ligne]  
<http://www.infosanteprevention.net/spip.php?article163>  
Consulté le : [25-26-03-2014].

- [30] Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. (1999). The shikimate pathway, Russell L. Jones, University of California, Berkeley edn.
- [31] Gonzales-Bello, C., Manthey, M.K., Harris, J.H., Hawkins, A.R., Coggins, J.R. and Abell, C. (1998) Synthesis of 2-bromo- and 2 S. Lim et al. / FEMS Microbiology Letters **238** (2004) 101–106.
- [32] Baillie, A.C., Corbett, J.R., Dowsett, J.R. and McCloskey, P. (1972) Inhibitors of shikimate dehydrogenase as potential herbicides . Pestic. Sci. **3**, 113–120 .
- [33] Otwinowski, Z., R. W. Schevitz, R. G. Zhang, C. L. Lawson, A. Joachimiak, R. Q. Marmorstein, B. F. Luisi & P. B. Sigler: Crystal structure of trp repressor/operator complex at atomic resolution. Nature, **335**, 321-9 (1988) .
- [34] Han, C., L. Wang, K. Yu, L. Chen, L. Hu, K. Chen, H. Jiang & X. Shen: Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. Febs J, **273**, 4682-92 (2006) .
- [35] De, R., P. Kundu, S. Swarnakar, T. Ramamurthy, A. Chowdhury, G. B. Nair & A. K. Mukhopadhyay: Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. Antimicrob Agents Chemother, **53**, 1592-7 (2009) .
- [36] Molecular Graphics and Modelling Society, American Chemical Society. Division of Computers in Chemistry. Journal of molecular graphics and modelling, Volume 15. Edition Elsevier Science, Inc. P9. 1997 .
- [37] B. Daunay. Couplage haptique pour des applications de docking moléculaire. Edition Robotique : Paris 6, P150. 2007 .
- [38] Schrödinger, Portland, OR 97201 .
- [39] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.-C.; Leach, A.-R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking J. Mol. Biol. 1997, **267**, 727-748.
- [40] Kontoyianni, M.; McClellan, L.; Sokol, G.S. Evaluation of docking performance.

- [41] Bermam H M, wesbook j, feng z, et al the protein data bank nucleic acid research 2000, **28**:235-242.
- [42] kerrouch l ,benguedouar f etude in silico de l'inhibition de la dihydroorotate deshydrogenase de plasmodium falciporum dansle cas du paludisme mémoire de master en biochimie option : analyse proteomique et santé Constantine. Université constantine1 algérie 2011.31p comparative data on docking algorithms J.Med.Chem. 2004, **47**, 558-565
- [43] Warren G. L., Andrews C.W., Capelli A. M., Clarke B., LaLonde J., Lambert M.H., Lindvall M., Nevins N., Semus S. F., Senger S., Tedesco G., Wall I.D., Woolven J. M., Peishoff C. E., Head M. S.2006. A Critical Assessment of Docking Programs and Scoring Functions. *Journal of Medicinal Chemistry*. **49**: 5912-5931.
- [44] Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. Principles of Docking: An Over view of Search Algorithms and a Guide to Scoring Functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*.2002 ; **47**: 409-443.
- [45] Chikhi A. W. Calculs et modelisations des interactions peptide deformylase –substances antibacteriennes a l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moleculaire. Thèse Doctorat d'université : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2007. 126p
- [46] Maréchal, Y. The hydrogen bond and the water molecule Elsevier Science & Technology 2007.
- [47] D. Duhovny, R. Nussinov, H.J. Wolfson, Efficient unbound docking of rigid molecules, 2002.
- [48] docking principles et methodes [en ligne] <https://wiki.ubuntu.com/kmezoud/bioinformatics?action=attachfile&target=docking.pdf>. Consulté le:[24-04-2013]
- [49] taylor R D , jewsbury P.J ,essex J.W areview of protein-small molecule docking methods journal of computer aided molecular design 2002;16:151-166.



- [50] Giroud C., 2007.- Etude du mécanisme des NO synthases : importance du réseau de liaisons hydrogène dans l'environnement et la réactivité de l'hème. Thèse de doctorat, Université Descartes, Paris.
- [51] Manunta A., Tirillini B., and Fraternali D., 1992.- Secretory tissue and essential oil composition of *Bupleurum fruticosum* L., *J. Essent. Oil Res.*, 4(5), 461–466.
- [52] Darley-Usmar V., Wiseman H and Halliwell B., 1995.- Nitric oxide and oxygene radicals: a question of balance. *FEBS Letters* 369: 131-135.
- [53] Kollman, P.A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Domini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D.A.; Cheatham, T.E.; Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models *Acc. Chem. Res.* 2000, 33, 889-897.
- [54] HAZAN Corinne; recherche d'inhibiteurs de haute affinite de l'adn polymerase beta par criblage virtuel et rmn ; doctorat de l'universite de toulouse. 2008. P: 64).
- [55] jay A., Jain N. Surflex-Dock 2.1: Robust performance from ligand energetic modeling, ring flexibility, and knowledge-based search. *J Comput Aided Mol Des.* 2007, 21:281–306.
- [56] Mark Thompson. : ArgusLab 4.01, Planaria software LLC (Consulté le 20/2/2014)  
<http://www.arguslab.com/arguslab.com/ArgusLab.html>
- [57] Protein Data Bank (PDB) Biological Macromolecular Resource  
<http://www.rcsb.org/pdb/> page  
Consulté le 16/3/2014.
- [58] Hansch, C. and T. Fujita, r-s-pAnalysis; method for the correlation of biological activity and chemical structure. *Journal of the American Chemical Society*, 1964. 86(8): p. 1616-26.

- [59] Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeny P.J., 2001, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46, 3-26.
- [60] Chikhi A., Bensegueni A. Comparative Study of the Efficiency of Three Protein-Ligand Docking Program. *Journal of Proteomics and Bioinformatics.*2008; 1: 161-165.
- [61] Vieth M., Hirst J. D., Kolinski A., Brooks C. L. Assessing energy functions for flexible docking. *Journal of Computational Chemistry.* 1998; 19: 1612-22.
- [62] Teniou. S. Conception *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la topoisomérase I de cellules cancéreuses. Thèse de magistère. Univ Mentouri Constantine. 2012. 71p.
- [63] Boucherit H. Etude théorique des interactions intervenant dans l'inhibition de la méthionine aminopeptidase et de mycobacterium tuberculosis par diverses molécules. Thèse de Magistère. Univ Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 110p.
- [64] Mokrani E.H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de Magistère. Univ Mentouri Constantine. 2012. 122p.

## ANNEXES

## ANNEXE 1

Liste de 160 complexes et leur RMSD utilisés pour tester le programme Surfex et ArgusLab.

NUMERO	CODE SUIVANT DE PDB	AFFINITE (M <sup>-1</sup> )	RMSD(Å) Surfex	RMSD (Å) ARGUSLAB
1	1BGO	3.93	3.919	1.264
2	1ELA	2.01	1.530	4.56
3	1GSJ	9.61	0.913	3.63
4	1LKA	2.27	6.851	1.74
5	1OIR	4.70	2.737	0.691
6	1OIT	4.31	1.868	1.825
7	1PPI	5.34	2.155	15.65
8	1RGS	7.17	1.073	7.51
9	1RLO	-2.3	3.807	5.25
10	1RM8	7.46	1.717	6.42
11	1T4T	3.31	2.633	5.61
12	1TA1	3.07	2.548	2.95
13	1UN9	8.11	1.655	7.58
14	1VQZ	4.54	4.272	1.56
15	1X2E	5.08	1.408	4.87
16	1XF1	1.83	1.384	1.90
17	1PHP	8.74	0.866	2.40
18	1OHA	10.64	0.801	1.65
19	1K70	3.48	2.175	2.41
20	1NDW	7.16	2.734	1.52
21	1ZAB	3.93	1.213	2.05
22	1H4P	3.74	1.267	1.98
23	1BDG	4.54	1.157	0.614
24	1WXD	3.03	5.497	1.032
25	1PPN	2.32	10.532	0.79
26	1K7H	4.68	2.048	3.99
27	1NVT	6.12	2.065	2.97
28	1P49	2.76	6.681	4.58
29	1X3Z	0.99	7.160	5.75
30	1DOY	1.58	1.608	2.30
31	2BHA	5.65	7.539	5.71
32	2BHB	6.20	7.420	2.36
33	2BHD	6.12	7.528	4.42
34	2BWT	4.10	4.636	2.86
35	2BWY	3.83	7.448	5.16
36	2CEV	3.39	1.883	2.00

37	2EJ9	9.62	1.398	2.98
38	2EK8	2.80	2.108	2.43
39	2HPO	3.93	1.539	2.10
40	2OQV	7.15	2.425	2.81
41	2PMJ	2.29	5.417	5.84
42	2POK	2.82	1.238	4.93
43	2QLY	2.51	1.341	3.44
44	2W1G	6.79	2.337	9.20
45	2W1C	6.66	2.845	8.54
46	2BH3	5.05	7.656	4.53
47	2HPT	10.19	1.226	2.06
48	2A6J	7.09	2.527	3.01
49	2VPP	5.97	0.506	2.16
50	2NXF	1.66	1.375	3.15
51	2J77	3.21	3.431	1.46
52	2J7E	3.12	2.927	1.39
53	2D61	6.54	1.354	3.19
54	2ZJG	1.97	3.558	2.81
55	2CH1	3.10	1.828	1.90
56	2J78	0.34	3.116	3.32
57	2R2N	5.99	5.168	2.11
58	2JAL	2.98	2.796	1.51
59	2J79	6.50	2.097	1.10
60	2J7C	10.00	1.619	1.77
61	2X41	5.25	1.325	2.49
62	2CBU	2.97	2.753	1.52
63	2Z1S	-1.11	4.760	6.43
64	2B1M	2.18	5.240	4.39
65	2CY0	11.00	2.666	4.67
66	2D5C	5.89	1.082	1.92
67	2EV9	6.21	0.823	1.81
68	2HK9	5.20	1.345	1.84
69	2C4W	2.77	3.219	2.46
70	2NSZ	2.95	4.320	5.65
71	2AA6	6.41	1.288	1.47
72	2EW5	5.77	1.574	5.58
73	2FB8	6.89	2.283	11.43
74	2W4I	6.55	0.763	1.38
75	2GLP	3.12	1.746	2.42
76	2B7P	6.68	2.998	3.25
77	3A9V	3.45	1.807	3.99
78	3AHM	3.64	1.002	1.86
79	3CTT	5.42	0.552	3.23
80	3EIO	6.25	2.376	6.40
81	3ERV	3.10	0.707	1.64
82	3FNB	4.16	2.920	1.67
83	3ITI	5.46	0.455	2.43

84	3KWF	9.12	0.467	5.36
85	3L4T	2.65	3.619	5.24
86	3L4u	6.21	1.069	3.00
87	3L4X	3.70	3.682	4.44
88	3MJL	5.35	2.539	1.86
89	3NFB	0.63	5.913	2.21
90	3PUU	2.04	1.986	2.47
91	3SJT	6.75	2.360	6.04
92	3SKK	4.22	4.060	1.88
93	3TRS	2.66	7.388	2.44
94	3UOU	1.25	6.875	3.05
95	3KCK	7.65	0.683	4.37
96	3LCS	8.48	0.930	5.42
97	3FUH	4.15	5.674	4.44
98	3RN6	8.19	0.574	2.80
99	3GXF	4.86	1.077	2.48
100	3KK6	-1.91	8.676	5.88
101	3N8Z	1.32	11.464	1.27
102	3U53	4.16	1.772	1.97
103	3QN6	2.70	4.58	1.84
104	3ZZJ	2.04	2.031	1.61
105	3TCM	8.21	1.275	2.25
106	3W53	5.44	1.770	2.32
107	3ZYZ	5.21	1.115	3.26
108	3GNP	3.17	3.423	4.76
109	3B8A	7.39	0.423	3.03
110	3BG3	1.18	8.603	1.04
111	3DOO	5.68	1.255	0.80
112	3DOZ	3.30	5.80	3.26
113	3DPC	1.97	1.820	3.57
114	3E9S	7.76	0.769	2.44
115	3K4J	3.54	2.733	5.87
116	3KMO	5.16	4.601	7.41
117	3MKO	1.29	3.376	2.20
118	3TNL	3.41	0.551	1.57
119	3DP1	3.18	3.581	2.09
120	3NM4	3.30	1.219	0.90
121	3PHH	5.05	1.422	0.55
122	3LMP	6.90	1.650	2.33
123	3PAX	3.95	5.208	7.14
124	3B7J	1.45	1.826	3.22
125	3NM6	1.48	1.548	2.94
126	3NM5	7.93	0.435	3.01
127	4CEV	3.67	1.969	1.01
128	4DYO	2.51	1.047	2.14
129	4EAN	4.24	1.122	4.24
130	4FCI	4.47	1.212	4.15

---

<b>131</b>	4FCK	3.21	4.305	4.36
<b>132</b>	4IE1	6.84	2.31	3.89
<b>133</b>	4KSI	2.13	1.650	1.91
<b>134</b>	4KXB	8.04	0.920	1.90
<b>135</b>	4NV4	2.71	1.843	1.96
<b>136</b>	4ANS	4.58	4.666	4.53
<b>137</b>	4CGA	5.35	2.817	4.14
<b>138</b>	4HEJ	8.20	0.643	6.51
<b>139</b>	4IAA	3.82	1.985	2.46
<b>140</b>	4LGH	2.23	1.807	4.84
<b>141</b>	4C8B	12.63	0.907	2.85
<b>142</b>	4DHK	3.26	3.535	1.35
<b>143</b>	4F66	6.19	0.592	1.53
<b>144</b>	4O1Z	4.20	2.010	1.63
<b>145</b>	4HFQ	2.16	5.588	2.36
<b>146</b>	4LPO	7.16	4.573	2.66
<b>147</b>	4LPB	5.84	2.867	2.97
<b>148</b>	4BUL	1.86	7.802	7.06
<b>149</b>	4E9A	2.48	1.968	2.00
<b>150</b>	4MQQ	7.85	1.596	1.69
<b>151</b>	4CMD	4.19	3.547	1.92
<b>152</b>	4L3Q	2.42	1.542	2.98
<b>153</b>	4MLH	4.40	1.418	1.26
<b>154</b>	4AXI	2.31	4.330	2.99
<b>155</b>	4FSH	3.74	1.535	1.39
<b>156</b>	4FOS	4.93	1.573	7.60
<b>157</b>	4LME	2.42	1.270	1.07
<b>158</b>	4ISF	3.79	1.840	0.98
<b>159</b>	4ECV	3.67	1.01	2.00
<b>160</b>	5CEV	3.35	1.918	2.49

## ANNEXE 2

- L'affinité des composés mono substitués.

composé	Affinité ( $M^{-1}$ )
1	3.97
2	3.06
3	4.40
4	3.80
5	4.97
6	3.81
7	4.33
8	3.70
9	3.04
10	3.07
11	3.71
12	3.62
13	3.24
14	4.04
15	4.56
16	4.01
17	5.00
18	2.65
19	4.05
20	4.08
21	3.48
22	3.06
23	3.81
24	3.21
25	2.86
26	4.02
27	3.68
28	3.33
29	2.90
30	4.52
31	0.67
32	3.35
33	4.19



34	4.46
35	3.29
36	2.50
37	5.41

- L'affinité des composés bi substitués.

Composé	Affinité (M <sup>-1</sup> )
38	2.80
39	4.41
40	2.96
41	3.12
42	3.22
43	3.99
44	5.77
45	2.52
46	3.04
47	3.48
48	4.87
49	4.21
50	3.60
51	2.86
52	4.32
53	2.86
54	3.89
55	3.65
56	2.89
57	4.24
58	3.57
59	2.84
60	3.88
61	4.06
62	2.93
63	2.90
64	4.11
65	2.54
66	2.56
67	3.47
68	5.08

---

69	2.89
70	4.76
71	3.35
72	3.76
73	3.99
74	3.22
75	1.13
76	2.90
77	3.87
78	4.49
79	3.63
80	3.25
81	3.38
82	3.10
83	4.46
84	4.84
85	3.53
86	4.53
87	4.56
88	3.91
89	3.75
90	3.97
91	1.31
92	3.51
93	4.10
94	2.48
95	5.04
96	3.88
97	2.92
98	3.40
99	2.82
100	3.12
101	6.23
102	3.51
103	5.83
104	2.29
105	3.41
106	2.47
107	3.00

## RÉSUMÉS

The molecular docking is one of the methods that are commonly used in medicinal Chemistry for the discovery and development of new drugs by checking thousands of compounds to specific target protein.

Surflex has been used to develop the program *in Silico* new and more effective inhibitors dehydrogenase shikimate, an enzyme that inhibition plays a key role in the treatment of stomach ulcers caused by *Helicobacter pylori*.

The curcumin, recently described in the literature as natural shikimate dehydrogenase inhibitor, was used as the starting structure for the production of single and dual alternatives. This showed that it is possible to achieve a significant increase in the affinity of curcumin for SDH.

Among the mono substitution the affinity can improve from 3,04 M<sup>-1</sup> to 5.41 M<sup>-1</sup> through the introduction of OH group on the carbon **D**.

The bi substitution allows an increasement of the affinity from 3,04 M<sup>-1</sup> to 5.83 M<sup>-1</sup> through the introduction of amide group in the carbon **3** and group OH on carbon **2**, until 5,77 M<sup>-1</sup> through the introduction of the amide to the position of **C** and OH at position 2 of curcumin and finally until 6.23 M<sup>-1</sup> through the introduction of polyamide on **6** position and the carboxyl group on position **F** at the curcumin.

The study of the pharmacological properties of these molecules that fit perfectly within the proposed set of requirements imposed by the rule of Lipinski.

**Key words:** molecular docking, Surflex, affinity, protein ligand interaction, shikimate dehydrogenase.

الالتحام أو "الإرساء" هو استخدام الأساليب الجزيئية في الكيمياء الطبية لاكتشاف و تطوير أدوية جديدة من قبل الفرز الآلاف من المركبات لبروتين هدف معين.

و قد استخدم سرفلكس و سيليكون لتطوير مثبطات جديدة و أكثر قوة من نازعة شكماط الإنزيم الذي يلعب دورا رئيسيا في علاج قرحة المعدة التي تسببها هيليكوباكتر بيلوري.

وصف الكركم مؤخرا في الأدب كمثبط طبيعي للنازعة شكماط حيث يستخدم كهيكل انطلاق لإنتاج بدائل أحادية و ثنائية. و أظهرت هذه الأخيرة انه من الممكن تحقيق زيادة كبيرة في تقارب من الكركم و نازعة شكماط.

من بين البدائل الأحادية يمكن تحسين قيم التقارب من 3,04 إلى 5,41 من خلال إدخال مجموعة هدر كسيل على الكربون د.

بإستبدال ثنائية تحسنت قيم التقارب من 3,04 إلى 5,83 من خلال إدخال مجموعة أميد على الكربون رقم 3 مجموعة هدر كسيل على الكربون رقم 2.

قد تصل إلى 5,77 من خلال إدخال مجموعة أميد على الكربون سي و مجموعة هدر كسيل على الكربون رقم 2 على مستوى الكركم.

و أخيرا قد تصل إلى 6,23 من خلال إدخال مجموعة أميد على الكربون رقم 6 و إدخال مجموعة هدر كسيل في الوضع اف على مستوى الكركم.

من دراسة الخصائص الدوائية لهذه الجزيئات المقترحة تظهر أنها تتناسب تماما مع مجموعة من المتطلبات التي تفرضها سيادة بيبينسكي.

**الكلمات الرئيسية:** الإرساء الجزيئية، سرفلكس، الألفة، التفاعل البروتين-رابط، نازعة شكماط.

L'arrimage ou « docking » moléculaire est une des méthodes communément utilisée en pharmaco-chimie pour découvrir et mettre au point de nouveaux médicaments par criblage de milliers de composés pour une protéine cible donnée.

Le programme Surflex a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la shikimate déshydrogénase, enzyme dont l'inhibition joue un rôle clé dans le traitement de l'ulcère gastrique causé par *Helicobacter pylori*.

Le curcumin, décrit récemment par la littérature comme inhibiteur naturel de la shikimate déshydrogénase, a été utilisé comme structure de départ pour réaliser des mono et des bi substitutions. Celles-ci ont montré qu'il est possible d'augmenter, de manière significative, l'affinité du curcumin à la SDH.

Parmi les mono substitutions l'affinité a pu être améliorée de  $3,04 \text{ M}^{-1}$  à  $5,41 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un groupement OH sur le carbone **d**.

La bi substitution a permis une amélioration de l'affinité de  $3,04 \text{ M}^{-1}$  à  $5,83 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un groupement amide sur le carbone **3** et un groupement OH sur le carbone **2**, jusqu'à  $5,77 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un amide en position **c** et d'un OH en position 2 au niveau du curcumin et enfin jusqu'à  $6,23 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un amide en position **6** et d'un groupement carboxyle en position **f** au niveau du curcumin.

L'étude des propriétés pharmacocinétiques de ces molécules proposées montre qu'elles s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de Lipinski.

**Mots clés :** Docking moléculaire, Surflex, Affinité, Interaction protéine-ligand, shikimate déshydrogénase.

Présenté par :

Dirigé par : Pr CHIKHLA

MEGUENANI KARIMA

ZEBILA ASMA

Soutenu le : 22/06/2014

## Thème

### **Inhibition *in silico* de la Shikimate 5-Déshydrogénase (aroE) de *Helicobacter pylori* pour combattre l'ulcère.**

#### **Résumé :**

L'arrimage ou « docking » moléculaire est une des méthodes communément utilisée en pharmaco-chimie pour découvrir et mettre au point de nouveaux médicaments par criblage de milliers de composés pour une protéine cible donnée.

Le programme Surflex a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la shikimate déshydrogénase, enzyme dont l'inhibition joue un rôle clé dans le traitement de l'ulcère gastrique causé par *Helicobacter pylori*.

Le curcumin, décrit récemment par la littérature comme inhibiteur naturel de la shikimate déshydrogénase, a été utilisé comme structure de départ pour réaliser des mono et des bi substitutions. Celles-ci ont montré qu'il est possible d'augmenter, de manière significative, l'affinité du curcumin à la SDH.

Parmi les mono substitutions l'affinité a pu être améliorée de  $3,04 \text{ M}^{-1}$  à  $5,41 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un groupement OH sur le carbone **d**.

La bi substitution a permis une amélioration de l'affinité de  $3,04 \text{ M}^{-1}$  à  $5,83 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un groupement amide sur le carbone **3** et un groupement OH sur le carbone **2**, jusqu'à  $5,77 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un amide en position **c** et d'un OH en position 2 au niveau du curcumin et enfin jusqu'à  $6,23 \text{ M}^{-1}$  par l'introduction d'un amide en position **6** et d'un groupement carboxyle en position **f** au niveau du curcumin.

L'étude des propriétés pharmacocinétiques de ces molécules proposées montre qu'elles s'inscrivent parfaitement dans la marge des critères imposés par la règle de Lipinski.

**Mots clés :** Docking moléculaire, Surflex, Affinité, Interaction protéine-ligand, shikimate déshydrogénase.

#### **Devant le jury:**

**Président :** BENSEGUENI A.

**Professeur à Université Constantine 1.**

**Rapporteur :** CHIKHI A.

**Professeur à Université Constantine 1.**

**Examineur :** MOKRANI E .H.

**Maître assistant à l'Université Constantine 1.**

- Session Juin 2014 -