



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

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

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé

**ETUDE THEORIQUE DU MECANISME D'ACTION
DES INHIBITEURS DE LA CATHEPSINE K, ENZYME
INTERVENANT DANS L'OSTEOPOROSE**

Le : 03 / 07 / 2018

Présenté et soutenu par : AIT HAMOUDI LINDA

CHAMI SELMA

Jury d'évaluation :

Président du jury : BENSEGUENI A Pr. Université Frères Mentouri Constantine 1

Rapporteur : CHIKHI A. Pr. Université des Frères Mentouri Constantine 1

Examineur : MOKRANI E.H M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire
2017 - 2018



Résumé

Avec le développement des outils informatiques pendant ces 20 dernières années, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire représentent des techniques performantes très utiles qui étudient l'interaction potentielle entre un ligand et sa cible protéique pour améliorer le processus de découverte d'un nouveau médicament et réduire les essais expérimentaux.

Le programme Surflex nous a permis d'atteindre l'objectif de ce modeste travail : la recherche *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la cathepsine k, une enzyme cible pour le traitement de l'ostéoporose.

La performance de ce programme a été prouvée par le bon pourcentage des valeurs du RMSD (68 %) inférieures ou égales à 2Å et du coefficient de corrélation se rapprochant de 1 ($r = 0.71$).

Le docking a été réalisé sur 162 similaires proposés par la banque de données PubChem de l'inhibiteur de référence (le FSP) dont l'affinité est égale à 5.76 M^{-1} .

L'évaluation de leurs affinités vis-à-vis de notre cible a permis de sélectionner les 4 meilleurs composés **A** (CID 52897549), **B** (CID 69707681), **C** (CID 52910183) et **D** (CID 70360201). Leurs affinités respectives sont égales à : 6.43, 6.39, 6.06 et 5.87 M^{-1} .

L'application de la règle de Lipinski a permis d'évaluer positivement leurs propriétés pharmaco-dynamiques ADME et l'analyse visuelle des interactions responsables de la stabilité de ces composés dans le site actif de l'enzyme nous permettent de les proposer comme de nouveaux inhibiteurs potentiels plus puissants de la cathepsine k.

Ces résultats théoriques doivent être cependant confirmés par des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo*.

Mots clés: Docking moléculaire, Surflex, Ostéoporose, Cathépsine k, règle de Lipinski.





Abstract

With the development of computer tools over the last 20 years, molecular modeling and more specifically molecular docking represent very useful high-performance techniques that study the potential interactions between a ligand and its protein target to improve the discovery process of a new drug and reduce experimental testing.

The Surflex program has enabled us to achieve the objective of this modest work: the *in silico* research of new, more potent inhibitors of cathepsin k, a target enzyme for the treatment of osteoporosis.

The performance of this program was proved by the good percentage of the values of the RMSD ($68\% \leq 2 \text{ \AA}$) and of the coefficient of correlation getting closer to 1 ($r = 0.71$).

The docking was carried out on 162 similar proposed by the PubChem database of the reference inhibitor (FSP) whose affinity is: 5.76 M^{-1} .

The evaluation of their affinities towards our target allowed to select 4 better compounds A (CID 52897549), B (CID 69707681), C (CID 52910183) and D (CID 70360201). Their respective affinities are: 6.43, 6.39, 6.06 and 5.87 M^{-1} .

The application of the Lipinski rule has allowed us to positively evaluate their ADME pharmacodynamic properties and visual analysis of the interactions responsible for the stability of these compounds in the active site of the enzyme allow us to propose them as potential new, more potent cathepsin k inhibitors.

However, these theoretical results must be confirmed by experimental studies *in vitro* and/or *in vivo*.

Keywords: Molecular docking, Surflex, Osteoporosis, Cathépsine k, Lipinski's rule.



الملخص:

مع تطوير أدوات الكمبيوتر على مدى السنوات الـ 20 الماضية، تمثل النمذجة الجزيئية والالتصاق الجزيئي بشكل أكثر تحديدًا تقنيات عالية الأداء مفيدة للغاية والتي تدرس التفاعل المحتمل بين جزيء (الرابيطة) والبروتين المستهدف لتحسين عملية اكتشاف بروتين جديد وتقليل الدراسات التجريبية.

سمح لنا برنامج سيرفلاكس (*surfex*) بتحقيق هدف عملنا في البحث *in silico* لمثبطات جديدة أكثر فعالية ل *cathepsine K* وهو الإنزيم المستهدف لعلاج هشاشة العظام.

اثبتت نتائج *RMSD* ($2A^\circ < 68\%$) مصحوبة بتحليل بصري بالإضافة إلى معامل الارتباط الذي يقترب من 1 (0.71) كفاءة برنامج *surfex*.

بتطبيق النمذجة الجزيئية على 162 جزيئة المقترحة من طرف القاعدة البيانات *PubChem* للمثبط المرجع (*FSP*) بحصيلة تقدر بـ 5,76.

سمح التقييم لتقاربه (الاجاذبية المحسنة) مقابل هدفنا باختيار أفضل 4 مركبات

A (CID 52897549), B (CID 69707681), C (CID 52910183), D (CID 70360201)

بحصيلة على الترتيب ($6.43, 6.39, 6.06, 5.87 M^{-1}$).

ان التطبيق لقاعدة *Lipinski* سمح بتقييم خصائصهم الصيدلانية *ADME* والتحليل البصري للتفاعلات المسؤولة عن ثبات هذه المركبات في الموقع النشط للإنزيم والذي سمح لنا باقتراحها على انها مثبطات جديدة محتملة لتثبيط *Cathepsine K*

ومع ذلك يجب تقييم هذه النتائج النظرية من خلال الدراسات التجريبية في المختبر أو في الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية: برامج الارساء الجزيئية، سيرفلاكس، هشاشة العظام، *cathepsine k*، قاعدة ليبينسكي.



Remerciements

*Au nom de dieu le tout puissant,
que nous tenons à remercier infiniment pour nous
avoir donné la force, le pouvoir, la patience et le courage à
réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont contribuées
de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

*A cette occasion nous adressons nos profonds remerciements et notre
reconnaissance à notre encadreur **Mr. CHIKHI A.** Professeur à
profondes l'Université des Frères Mentouri Constantine pour son
aide, ses orientations, sa patience, sa gentillesse et surtout sa confiance.*

*C'est aussi avec plaisir que nous exprimons notre profonde gratitude et
nos remerciements les plus vifs à **Mr. BENSEGUENI A.** professeur à
l'Université des Frères Mentouri Constantine d'avoir accepté et fait
l'honneur de présider le jury de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier aussi à **Mr MOKRANI E.H.**
Maitre-assistant 'A' à L'Université des Frères Mentouri
Constantine d'avoir accepté d'être membre de
notre jury.*

Dédicaces

À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre
À cette source de tendresse, de patience et de générosité

À ma chère mère : **Sabah**

Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je te porte. Ton amour, ta patience, ton encouragement et tes prières ont été pour moi le gage de la réussite. J'espère que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes efforts et un témoignage de ma profonde affection.

À mon cher père : **Nour Eddine**

Signe de fierté et d'honneur, ce travail est le vôtre, Inchallah tu trouveras ici toute mon affection et ma profonde gratitude pour toutes ces années de sacrifice pour moi.

À mon cher mari : **Aiman**

Qui a toujours été à mes côtés

À mon cher frère : **Bachir**

À ma sœur **Meriem** et son mari, ainsi que leurs enfants **Maram** et **Anis**

Aux membres des familles **Ait Hamoudi, Boudelioua, et Boulahmair**

À mes chères amis (es) et particulièrement,

Soulef et Samia

À ma binôme « **Selma** » qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.

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

À vous tous merci.

Linda

Dédicaces

*Au Seigneur Dieu tout puissant
pour m'avoir donné la patience et le courage de surmonter tous les obstacles
auxquels j'ai fait face surtout cette année.*

*Je dédie ce travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est
Sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère*

Ghanouja

*A mon père **Allaoua**, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes
les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à
me donner l'aide et à me protéger.*

Que dieu les garde et les protège.

*A mes frères : **Ayoub, AbdErahim** et mon petit frère de maison **Fahd***

*A ma sœur : **Amina***

*Fiancé de ma soeur Amina: **Sghiri .H***

*Chère amie et soeur: **Linda** face à tous les problèmes, surtout ma santé, prie
dieu de protéger.*

*Cher ami et frère m'a soutenu dans la volonté et le visage de toutes les
circonstances appelez dieu pour le protéger de tout mal :*

Benselem .Y

Et à tous les enseignants et enseignantes qui ont contribué à ma formation.

Selma

Table des matières

Résumé	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	III
Liste des abréviations	IV

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Inroduction	1
--------------------------	---

CHAPITRE 1 : RAPPELS PHYSIOLOGIQUE DE L'OS ET DESCRIPTION DE L'OSTEOPOROSE

1. RAPPELS PHYSIOLOGIQUE DE L'OS	3
1.1 Fonction physiologique des os	3
1.2 Les cellules osseuses	3
1.2.1 Les ostéoblastes	3
1.2.2 Les ostéoclastes	4
1.2.3 Les ostéocytes	4
1.2.4 Les cellules bordantes	4
1.3 Le remodelage osseux et le mécanisme de la perte osseuse	5
1.4 Mécanismes de la perte osseuse accélérée à la ménopause	8
1.5 Régulation du remodelage	8
1.6 Régulation locale du remodelage	9
1.7 Évolution du squelette	9
2. L'OSTEOPOROSE	10
2.1 Définition	10
2.2 Les types d'ostéoporose	11
2.2.1 Ostéoporose primaire	11
2.2.2 Ostéoporose secondaire	11
2.3 Les facteurs de risque	11

2.4 Physiopathologie	12
2.5 Le rôle calcium dans l'ostéoporose	13
2.6 Les Symptômes de l'Ostéoporose	13
2.7 Les marqueurs de l'ostéoporose	14
2.8 Conséquence de l'ostéoporose	15
2.9 Diagnostique d'ostéoporose	16
2.10 Le traitement pharmacologique de l'ostéoporose.....	16
2.10.1 Les bisphosphonates	16
2.10.2 Le denosumab	16
2.10.3 Les SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator)	16
2.10.4 LeTériparatide	16
2.10.5 Le Ranélate de strontium	16

CHAPITRE 2 : LA CATHEPSINE K ET SES INHIBITEURS

I. LA CATHEPSINE K ET SON MECANISME D'ACTION	17
1. Définition	17
2. La structure moléculaire	17
3. Caractéristiques de l'enzyme	18
4. Sites de clivage de la cathepsine K sur le collagène et l'agrécan	18
4.1 Clivage du collagène de type I	18
4.2 Clivage du collagène type II.....	19
4.3 Clivage de l'agrécan	19
5. Localisation de cathepsine k et son rôle	20
6. Pathologique	20
7. Régulation génétique	20
II. L'ETUDE DES INHIBITEURS DE LA CATHEPSINE K	21
1. L'odanacatib (ODN)	22
1.1 Propriétés pharmacocinétiques de l'odanacatib	22
a. Mécanisme d'action de l'odanacatib	22

2. La Balicatib	24
3. Les anti-RANKL	24
3.1 Mécanisme d'action de dénosumab.....	24

CHAPITRE 3 : DOCKONG MOLECULAIRE

1. Définition	26
2. Les étapes de docking moléculaire	26
3. Les programmes	27
4. Les interaction Proteine_ligand	27

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	30
1.1 Microordinateur.....	30
1.2 Les programmes	30
II. Méthodes	30
2.1 Test d'évaluation de la fiabilité du programme Surflex.....	31
2.1.1 RMSD (déviation de la racine de la moyenne des carrés)	31
2.1.2 Le coefficient de corrélation	31
2.2 Le choix du complexe (1tu6).....	32
2.3 Préparation des molécules d'arrimage.....	32
2.3.1 Préparation de la protéine :	32
2.3.2 Préparation du ligand	33
2.4 Recherche de nouveaux inhibiteurs de la cathepsine k	34
2.5 Filtrage ADME (La règle de cinq de Lipinski 1997)	34
2.6 Analyse visuelle des liaisons hydrogène établies entre le ligand et les acides aminés du site actif	35

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Test d'évaluation de la fiabilité du programme Surflex :	36
--	----

1.1 Le test RMSD	36
1.2 Analyse visuelle des molécules superposées.....	37
1.3 Test du coefficient de corrélation linéaire	38
2. Recherche de nouveaux inhibiteurs de la cathepsine k	40
2.1 Le docking moléculaire des similaires	40
3. La règle de cinq de Lipinski	42
4. Les interactions.....	43
4.1 Les liaisons hydrogènes.....	43
CONCLUSION.....	48
Les références bibliographiques	50
Annexes	58

Liste des figures

Figure 1: Les types d'os	3
Figure 2: L'activation de l'ostéoclaste	5
Figure 3: La résorption osseuse.....	6
Figure 4: La phase d'inversion du remodelage osseux	6
Figure 5 : La formation osseuse	7
Figure 6: La terminaison du remodelage osseux.....	7
Figure 7: évolution de la masse osseuse au cours de la vie.....	9
Figure 8: Travées osseuses d'un sujet sain et d'un sujet ostéoporotique	10
Figure 9 : La structure moléculaire	17
Figure 10: Clivage du collagène de type II par la cathepsine K et les collagénases	19
Figure 11: Site de clivage de la cathepsine K sur l'agrécane	20
Figure 12:Structure chimique de L'odanacatib	22
Figure 13: Interactions entre l'odanacatib et la cathepsine K	23
Figure 14: Mécanisme d'action de l'odanacatib	23
Figure 15: Structure chimique de la balicatib	24
Figure 16:Mecanisme d'action de dénosumab	25
Figure 17: La formation du complexe protéine-ligand	27
Figure 18: Les interactions électrostatiques	28
Figure 19: Les interactions de Van der Waals	28
Figure 20: Les liaisons hydrogène	29
Figure 21 Les interactions hydrophobes	29
Figure 22: structure tridimensionnelle du complexe 1tu6.....	32
Figure 23: Résultats en % des RMSD(Å) obtenus par Surfex.	36

Figure 24 : Superposition des trois ligands des complexes (1ITO, 4X6Het 1IA2) et celles calculées par docking moléculaire avec Surflex.	37
Figure 25 Courbe de corrélation entre l'activité biologique (logIC50) de 30 ligands et leurs scores obtenus par Surflex.....	39
Figure 26 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé A avec le site actif de la cathepsine k.	44
Figure 27: Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé B avec le site actif de la cathepsine k	45
Figure 28: Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé L144 avec le site actif de la cathepsine k.....	46
Figure 29 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé L185 avec le site actif de la cathepsine k.....	47

Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques exemples de logiciels de criblage virtuel	27
Tableau 2 : les caractéristiques pharmacologiques du ligand de référence (FSP)	32
Tableau 3: les propriétés de la macromolécule ‘‘ cathepsine k ‘‘	33
Tableau 4: résultats de l’analyse par la régression linéaire d’affinité obtenus par docking moléculaire (surflex) et les logIC ₅₀	38
Tableau 5: Les scores des meilleurs similaires	41
Tableau 6: propriété pharmacocinétique de la règle de Lipinski pour des 4 inhibiteurs	42
Tableau 7: Les liaisons hydrogène établies par le composé A avec le site actif.....	43
Tableau 8: Les liaisons hydrogène établies par le composé B avec le site actif.....	44
Tableau 9: Les liaisons hydrogène établies par le composé C avec le site actif.....	45
Tableau 10: Les liaisons hydrogène établies par le composé D avec le site actif.....	46
Tableau 11: Liste des résultats des 130 complexes utilisés pour tester le programme Surflex par RMSD et leur IC ₅₀	58

Liste des abréviations

ARNm: MicroARNs

CSF-1: Colony stimulating factor 1

DMO : Densité Minérale Osseuse

ESF : Extrémité supérieure du fémur

LPS : lipopolysaccharides

OB : Ostéoblaste

OC : Ostéoclaste

OMS : Organisation mondiale de la santé

OPG : l'ostéoprotégérine

PDB : Protein Data Bank

P-C-P : phosphore-carbone-phosphore

r : le coefficient de corrélation linéaire

RANK L: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand

RMSD : root-mean-square deviation

SERMs: Selective Estrogen Receptor Modulator

SHBG: Sex Hormon Binding Globulin

TGF- β : facteur de croissance transformant- β

I - Partie
Bibliographique

Introduction

Inroduction

Le processus de découverte d'un nouveau médicament doit logiquement débiter par la définition de la maladie pour laquelle un traitement adapté fait défaut. [1]

L'ostéoporose est un sujet particulièrement d'actualité qui se développe tout au long de la vie et dont les conséquences apparaissent à un âge avancé, caractérisée par des fractures telles que: les fractures de la hanche, les fractures du poignet, de l'épaule, des vertèbres sont les plus fréquentes. Elle est due à de nombreux facteurs génétiques mais aussi environnementaux comme la sédentarité, l'inflammation chronique ou encore le déséquilibre acido-basique. [2]

Cette maladie prend des allures d'épidémie dans les pays développés. L'OMS « Organisation Mondiale de la Santé » et l'Agence de la santé publique du Canada estiment qu'environ 1,5 million de Canadiens âgés de 40 ans et plus (10 %) sont atteints d'ostéoporose. Elles ont également déclaré que les femmes sont quatre fois plus souvent atteintes d'ostéoporose que les hommes [3]. En France, trois millions de femmes ménopausées sont atteintes d'ostéoporose. Concernant principalement des personnes âgées, ces accidents sont particulièrement graves et handicapants. [4]

Une fois la maladie définie, une cible thérapeutique, à l'aide de données issues de la littérature, doit être identifiée. Cette cible est une biomolécule, en général une protéine ou une enzyme, impliquée dans un processus pathologique. Il s'agit de la cathepsine k, enzyme intervenant de l'ostéoporose.

Notre thème est orienté vers la recherche et le développement de nouveaux inhibiteurs plus efficaces de cette enzyme pour le traitement de l'ostéoporose à l'aide d'une méthode de plus en plus utilisée ces dernières années, le docking moléculaire. C'est une méthode *in silico* de détermination de l'affinité d'un grand nombre d'inhibiteurs envers une cible thérapeutique donnée pour en sélectionner les meilleurs. Une évaluation de leurs propriétés pharmacocinétiques peut être également effectuée.

Notre mémoire est divisé en deux grandes parties :

- Une partie théorique avec trois chapitres : Le premier chapitre est consacré à la physiologie de l'os et la description de l'ostéoporose. Le deuxième chapitre traite de notre cible thérapeutique, la cathepsine k, son mécanisme d'action et ses différentes

classes d'inhibiteurs. Le troisième chapitre décrit le docking moléculaire et ses applications.

- Une partie pratique, elle-même divisée en deux : une partie consacrée au matériel utilisé dans notre travail et la méthode suivie ; une deuxième qui relate les résultats obtenus et les discussions apportées, suivie de la conclusion qui en découle.

Chapitre I

Physiologie de l'os et
description de
l'ostéoporose

1. RAPPELS PHYSIOLOGIQUE DE L'OS

1.1 Fonction physiologique des os

Les os ont une structure rigide, possèdent trois fonctions principales :

- Une fonction mécanique pour le soutien de l'organisme et la locomotion(transport).
- Une fonction de protection des organes vitaux et de la moelle osseuse hématopoïétique.
- Fonction métabolique avec un réservoir d'ions et de minéraux, principalement calcium, phosphore et magnésium, rapidement mobilisables en cas de déséquilibre dynamique.

[5]

1.2 Les cellules osseuses

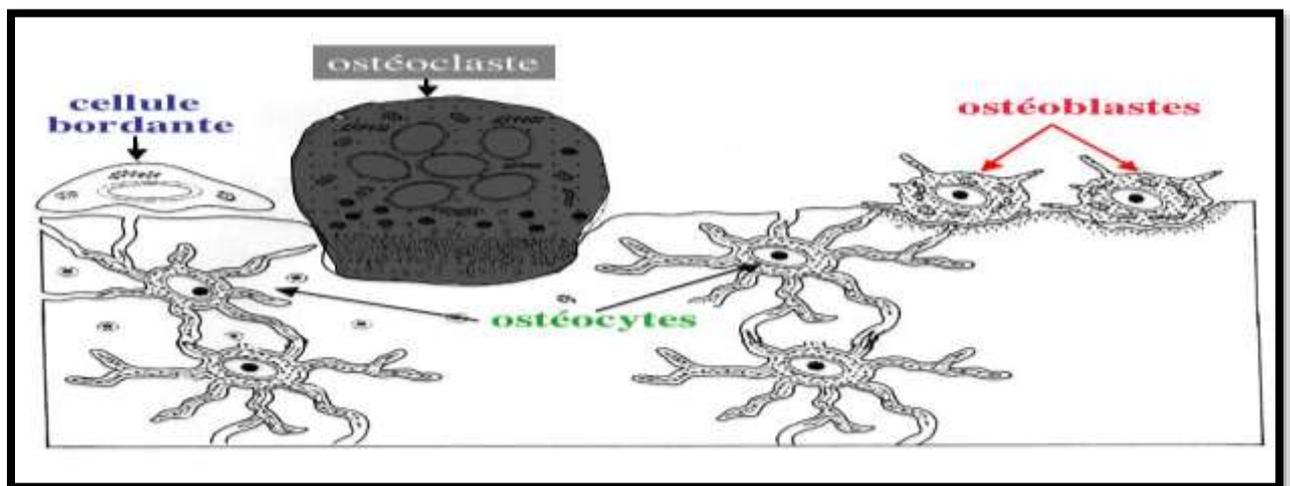


Figure 1: Les types d'os

1.2.1 Les ostéoblastes

Ces cellules ont une origine mésenchymateuse ; responsable de la formation osseuse, qu'ont une fonction principale de synthétiser la matrice osseuse et de minéralisation du tissu ostéoïde (Figure 2). [6]

Ils fabriquent notamment les fibres de collagènes de type 1 qui composent 90% de l'ostéoïde et plusieurs protéines de nature non collagénique régulatrices dont le ligand du récepteur pour l'activation du facteur nucléaire kappa B (RANK-L) et l'ostéoprotégérine (OPG).L'ostéoblaste et ses précurseurs présents dans le stroma-médullaire vont aussi produire des cytokines (M-

CSF, $TNF\alpha$, Interleukines). Les protéines et les cytokines, relarguées dans le milieu extracellulaire vont agir au niveau des cellules précurseurs des ostéoclastes. [6]

1.2.2 Les ostéoclastes

Ces sont des grosses cellules d'origine multinucléées issues de la ligné monocytes et macrophages (cellules souches hématopoïétiques), Ils ont une forme particulière en bas une bordure en brosse avec plein de petites villosités (Figure 3).

Ces cellules sont les agents de la résorption, grâce à cette forme, elles se fixent sur l'os comme une ventouse, de façon étanche(intégrines). Il y a alors libération d'ions acides (H^+) qui va dissoudre le calcium. Cette cellule libère aussi des enzymes (cathepsine K, metalloprotéases...) qui vont détruire la trame osseuse. Elle a donc une double action.

En pathologie, il y a des maladies génétiques de l'enfant où il n'y a pas d'ostéoclastes, ce qui donne des os très denses, qui ne laissent plus la place pour la moelle osseuse, c'est l'**ostéoporose**. Les principales thérapeutiques osseuses sont des thérapeutiques qui bloquent l'ostéoclaste et les empêchent de détruire l'os. [7]

1.2.3 Les ostéocytes

Ils proviennent de la transformation de certains ostéoblastes et établissent des contacts avec les cellules bordantes qui tapissent la surface osseuse (Figure 4). Les ostéocytes représentent les cellules les plus matures et les plus différenciées de la lignée ostéoblastique, qui fonctionnée dans les échanges entre les cellules osseuses et l'environnement, essentiellement par la formation d'un important réseau de communication cellulaire. Ces cellules sont sensibles aux stimuli mécaniques qui détectent le besoin d'une augmentation ou d'une diminution de la formation osseuse. [7]

1.2.4 Les cellules bordantes

Elles recouvrent la surface de l'os en phase de quiescence et interviennent (Figure 5) également dans les échanges entre les cellules osseuses et l'environnement. Elles jouent un rôle dans la phase initiale du remodelage osseux et sous l'effet de certains stimuli, elles sont libérées de la surface osseuse permettant ainsi l'attraction des ostéoblastes à cette surface. [7]

1.3 Le remodelage osseux et le mécanisme de la perte osseuse

Ce remodelage est un dialogue étroit entre OC et OB et, également un couplage de leurs activités respectives résorption et formation osseuse, qu'est la quantité d'os ancien résorbé doit être compensée par le dépôt d'une quantité équivalente de nouvelle matrice. [8]

Ce mécanisme est beaucoup plus important dans l'os trabéculaire, et touche aussi bien l'os cortical mais on remarque que la fréquence d'activation est plus grande dans l'os trabéculaire que l'os corticale. Lorsqu'il y a un défaut au niveau du remodelage osseux, c'est l'os trabéculaire qui sera touché en premier lieu car c'est lui qui se renouvelle le plus.

Le remodelage osseux se décompose en plusieurs phases chronologique, d'une durée totale de 3 mois [9] :

A. Phase d'activation des ostéoclastes

C'est la première étape du remodelage, l'activation (Figure 6) consiste en la détection d'un signal de remodelage. L'un de ces signaux peut être une **contrainte mécanique** engendrant une atteinte de la structure osseuse, à l'origine d'une apoptose localisée d'ostéocytes. Ces ostéocytes ne produisant plus de TGF- β , on assiste alors à la différenciation des pré-ostéoclastes en ostéoclastes actifs multi nucléés. [10]

Une **diminution des concentrations sériques en calcium** peut également être un autre signal de remodelage, à l'origine d'une sécrétion de parathormone qui va favoriser la libération de RANK-Ligand et de CSF-1 par les ostéoblastes, et favoriser la maturation des pré-ostéoclastes. [11]

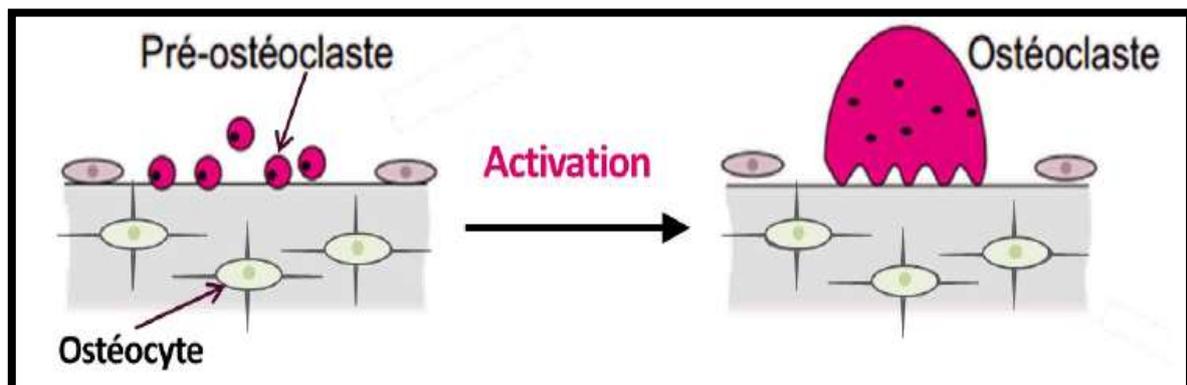


Figure 2: L'activation de l'ostéoclaste

B. Phase de résorption osseuse

Durant cette phase les ostéoclastes vont dégrader la matrice osseuse ancienne et former une lacune de résorption (Figure 3). Cette dégradation s'accompagne par la libération de produits de dégradation, tels que du collagène (principal constituant de la matrice organique) et des minéraux, qui deviennent à leur tour des signaux d'activation pour le recrutement d'ostéoclastes. Ce processus dure environ 2 à 4 semaines et se termine par l'apoptose des ostéoclastes. [12].

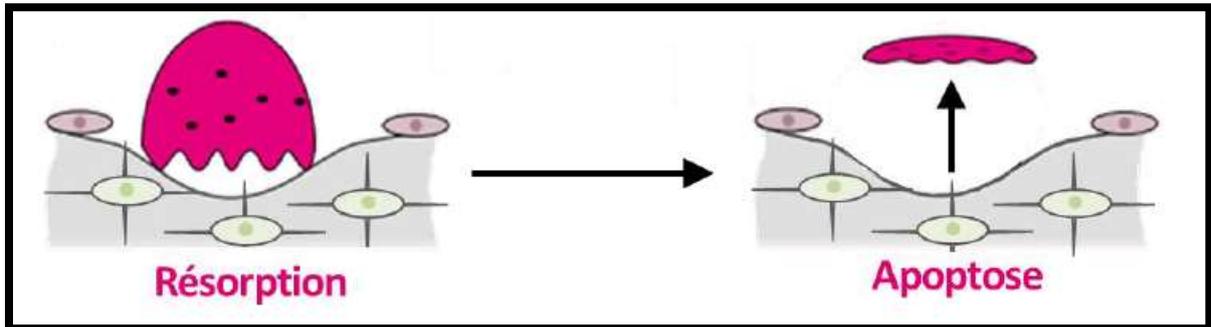


Figure 3: La résorption osseuse

C. Phase d'inversion ou réversion

Cette phase est caractérisée par la présence dans la lacune de résorption de cellules mononuclées tels que des monocytes qui une fois activés vont préparer la matrice osseuse en la débarrassant des débris cellulaires d'ostéocytes. On trouve également dans la lacune des pré-ostéoblastes en cours de recrutement et d'activation. Cette phase dure entre 4 et 5 semaines, et marque la transition d'activité de résorption vers une activité de formation osseuse (Figure 4). [12]

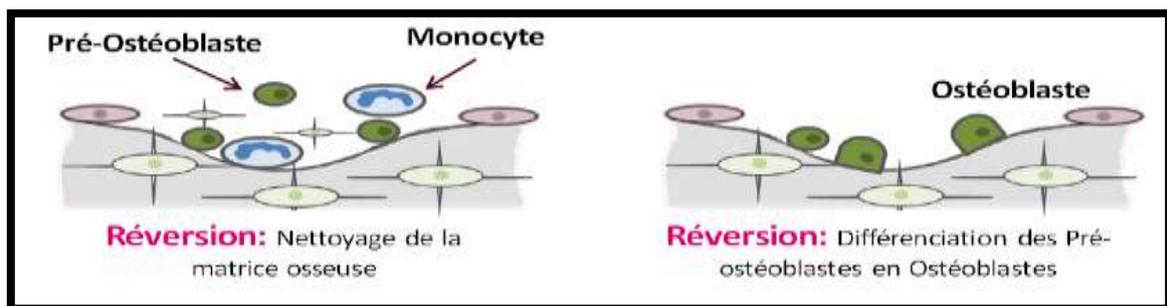


Figure 4: La phase d'inversion du remodelage osseux

D. Phase de formation osseuse par la synthèse de l'os neuf

Durant cette phase, les ostéoblastes vont combler les lacunes créées par les ostéoclastes avec de l'os nouveau, en synthétisant une nouvelle matrice organique non minéralisée, appelée tissu

ostéoïde, qui compose 20 à 40 % des os. Cette matrice se compose principalement de collagène de type I, mais aussi de protéines non collagéniques (protéoglycanes et protéines glycosylées) et des lipides. [13] La période de cette étape d'environ 4 mois, 50 à 70% des ostéoblastes meurent par apoptose (Figure 5).. Les autres deviennent des ostéocytes ou des cellules bordantes. [14]

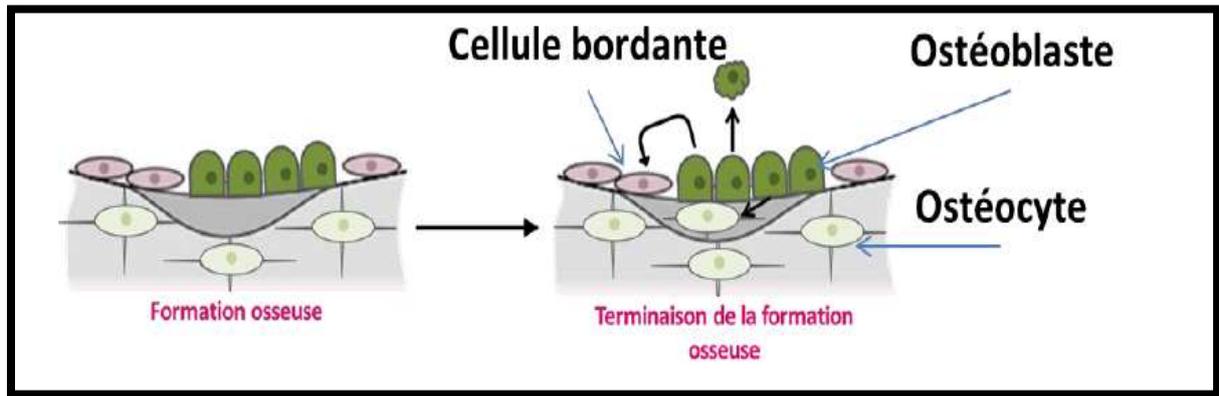


Figure 5 : La formation osseuse

E. Phase de minéralisation

Cette phase correspond à la minéralisation du tissu ostéoïde, avec l'incorporation au sein de cette matrice de cristaux d'hydroxyapatite $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Cette phase débute par une phase rapide appelée minéralisation primaire, puis une phase de minéralisation secondaire continue intervient. Cette étape confère à l'os sa résistance aux chocs, en plus de sa résistance à l'étirement. [14]

F. La phase de quiescence

Au terme du remodelage osseux, l'os est en phase de quiescence, il ne subit ni résorption ni formation osseuse (Figure 6). Sa surface est entièrement tapissée d'une couche de cellules bordantes. Celles-ci sont susceptibles, si elles sont sollicitées, de redevenir des ostéoblastes. [14]

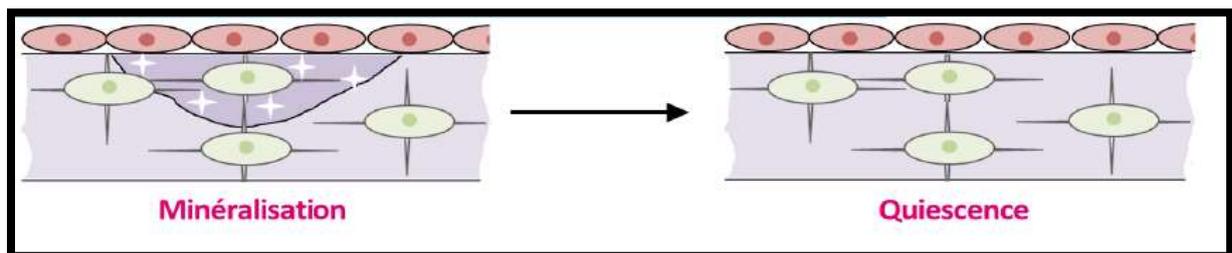


Figure 6 : La terminaison du remodelage osseux

1.4 Mécanismes de la perte osseuse accélérée à la ménopause

Dans les années suivant la ménopause est une perte osseuse rapide au niveau des sites osseux trabéculaires (radius distal, vertèbres) est constatée, dû à une augmentation de la vitesse du remodelage osseux et à une diminution de la quantité d'os déposée lors de chaque cycle de remodelage.

La microarchitecture osseuse se modifie, il apparaît une augmentation de la séparation des travées osseuses entraînant une augmentation du nombre d'ostéoclastes présents et par là même un cercle vicieux d'augmentation de sites de résorption.

L'hypothèse d'une augmentation sérique d'hormones sexuelles responsable de la perte osseuse n'est plus envisagée, ou à tout le moins comme le seul facteur unique responsable. Le mécanisme des hormones sexuelles serait plus local, via l'aromatase et expliquerait le freinage de la perte osseuse à distance de la ménopause.

On constate paradoxalement une augmentation de la taille extérieure de l'os aussi bien chez l'homme que chez la femme. Mais c'est au niveau de l'os cortical que la diminution d'épaisseur se produit chez les femmes à partir de la ménopause. Il semblerait que cette composante corticale n'influence que très peu dans le risque de fracture car la proportion d'os cortical est plutôt faible au niveau des sites de fractures souvent rencontrées dans l'ostéoporose. [15]

1.5 Régulation du remodelage

Il y a deux grands types de régulation :

- **le remodelage local**, à un endroit précis, a pour but de maintenir les propriétés mécaniques du squelette, de solidifier les endroits fragilisés.

- **le remodelage systémique**, sur l'ensemble du squelette, pendant la croissance et chaque fois qu'il faut réguler le calcium.

➤ Les ostéoclastes sont activés par la **voie du RANKL** (RANK ligand). Un des derniers médicaments de l'ostéoporose est un inhibiteur du RANKL.

En physiologie, le RANKL est sécrété par les ostéoblastes, les cellules de la moelle osseuse, et un petit peu par les lymphocytes. Il existe un inhibiteur naturel, l'**ostéoprotégérine**, qui bloque une partie du RANKL, quand le RANKL rencontre son récepteur RANK, il stimule le récepteur des macrophages, lesquels s'agglutinent pour donner au final des ostéoclastes actifs.

- S'il y a un excès de RANKL et pas assez d'inhibiteurs, on a une perte osseuse. [7]

1.6 Régulation locale du remodelage

Il est sous le contrôle de facteurs mécaniques, il y a un rôle positif des stimulations mécaniques en particulier cycliques, en particulier les sports avec impact.

-Si le système fonctionne bien, le squelette est sain.

-S'il est insuffisant, il y a un vieillissement osseux (lors du vieillissement, chez les gens immobilisés ou alités) c'est l'ostéoporose d'immobilisation.

-Au contraire, si l'os est trop sollicité, il y aura aussi un hyper remodelage. Une mauvaise régulation aboutira une fragilisation de l'os. [7]

1.7 Évolution du squelette

Elle se fait en 3 phases :

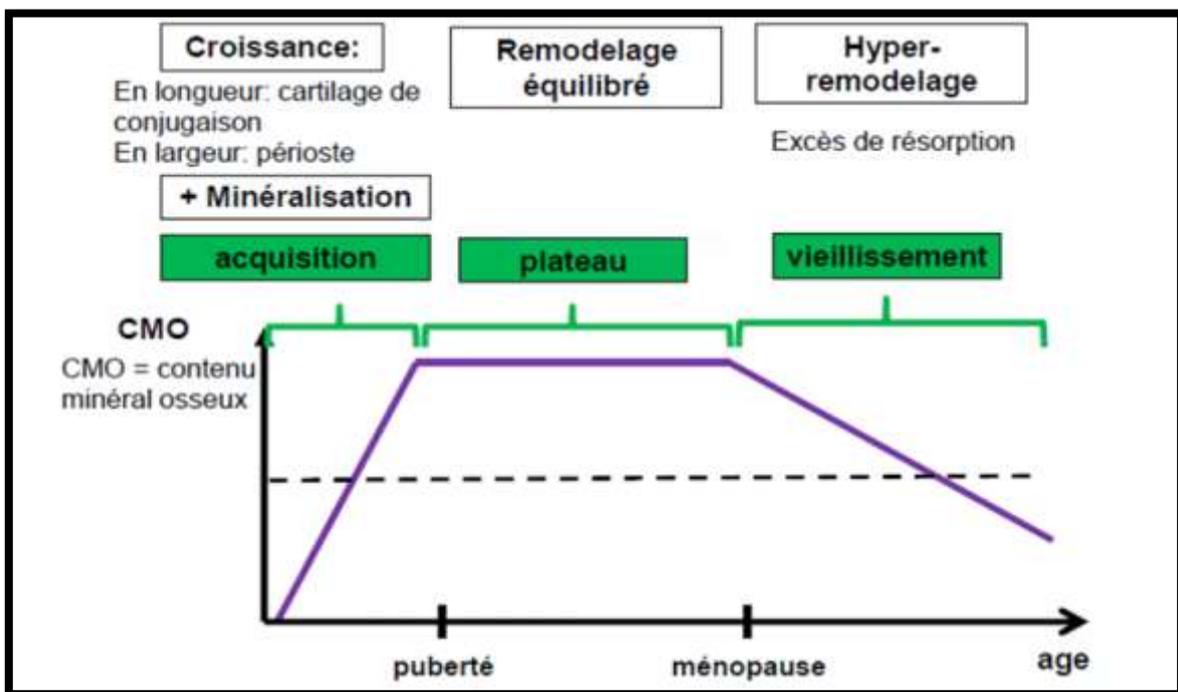


Figure 7: évolution de la masse osseuse au cours de la vie

- **Phase d'acquisition** : de la naissance jusqu'à la puberté (et un peu après). [7]
- **Phase de plateau** : adulte jeune, jusqu'à la ménopause chez la femme, et environ 50 ans chez l'homme. Le capital osseux acquis est maintenu (équilibre).
- **Phase de vieillissement** : diminution du capital osseux (excès de résorption), dans cette dernière phase, l'activité ostéoclastique est majoritaire comparée à l'activité ostéoblastique. [7]

2. L'OSTEOPOROSE

2.1 Définition

L'ostéoporose :

Ostéo = l'os

poros = conduit, passage, pore



Il prend littéralement le sens
« d'os poreux ».

Ce nouveau terme apparaît au début du XIXème siècle suite aux travaux autopsiques de l'anatomo-pathologiste Jean Georges Lobstein (1777-1835), plus connu pour la maladie éponyme : l'ostéogénèse imparfaite ou maladie des os de verres. [16]

-L'ostéoporose est une maladie chronique d'os invalidante qui reliée vieillissement. [17]

-Altérations quantitatives et qualitatives de l'os qui aboutissent à une perte de sa solidité et à des fractures pour des traumatismes.

-L'ostéoporose est une maladie diffuse du squelette caractérisée par une diminution de la masse osseuse (diminution de la densité minérale osseuse) et changement de la microarchitecture (structure) osseuse, conduisant à une fragilité osseuse avec un risque augmenté de fractures. [18]

-L'ostéoporose se voit surtout chez les femmes après la ménopause. Schématiquement, cette diminution de la masse osseuse peut provenir d'une insuffisance de la formation osseuse par les ostéoblastes ou d'un excès de résorption osseuse par les ostéoclastes. [19]

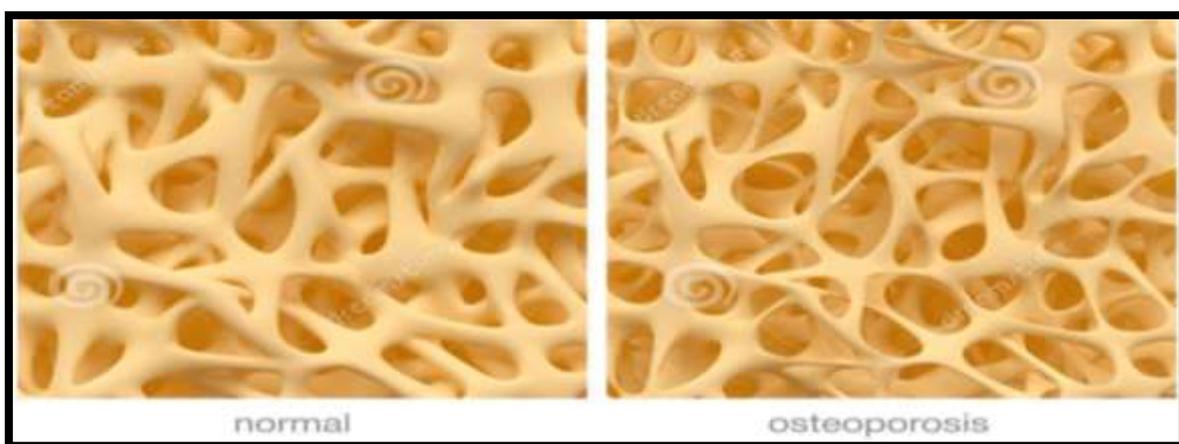


Figure 8: Travées osseuses d'un sujet sain et d'un sujet ostéoporotique

2.2 Les types d'ostéoporose

Il existe deux types :

2.2.1 Ostéoporose primaire

- **Ostéoporose type 1 : post-ménopausique (trabéculaire)**

Est le type le plus commun de l'ostéoporose. Elle est plus fréquente chez les femmes ménopausées de 50 ans plus que les hommes.

Affecte le tissu osseux spongieux et occupe l'intérieur des vertèbres, du bassin, des os plats (superficiel) et des extrémités des os longs.

Les conséquences dues à la carence estrogénique qui augmente le remodelage osseux qu'est traduit par une augmentation des ostéoclastes associée à une diminution de l'activité des ostéoblastes, alors qui donne un déséquilibre entre la résorption et la formation. [20]

- **Ostéoporose type 2 : sénile**

Elle survient chez les deux sexes (2 femmes pour un homme après 70 ans), qui touche l'os trabéculaire et cortical. Elle est en relation avec des facteurs liés au vieillissement tels que l'insuffisance vitaminique D et le défaut d'absorption du calcium qui en résulte. Ils sont responsables d'un hyperparathyroïdisme secondaire qui stimule la résorption osseuse. [20]

- **Ostéoporose idiopathique.**

Elle touche également les enfants âgés de 8 et 14 ans ou pendant les périodes de croissance rapide. Cette maladie est très rare et n'a pas de causes identifiées.

2.2.2 Ostéoporose secondaire

Aux mêmes symptômes que l'ostéoporose primaire, mais elle est provoquée par une autre maladie qui est due aux maladies de la glande thyroïde, aux maladies digestives ou aux cirrhoses du foie. Elles peuvent être provoquées par certains médicaments contre les convulsions, certains anticoagulants et certains corticoïdes administrés à de très fortes doses.

L'ostéoporose secondaire peut survenir à tout âge.

2.3 Les facteurs de risque

L'âge : Son risque augmente avec l'âge qui devient plus grave.

Le sexe : Les femmes sont plus fréquemment atteintes que les hommes

La prédisposition génétique : Les enfants dont les parents ont une ostéoporose ont un risque accru d'ostéoporose.

L'appartenance ethnique : Les blancs et les asiatiques sont plus fréquemment atteints d'ostéoporose.

Le poids : Les personnes minces présentent un risque supérieur de présenter une ostéoporose en raison d'un manque de tissu musculaire protégeant moins bien les structures osseuses.

L'alimentation déséquilibrée : Des apports alimentaires insuffisants en calcium, phosphore et vitamine D prédisposent à la perte osseuse. Les excès d'alcool, le tabac et de caféine sont néfastes pour les os puisqu'ils favorisent l'élimination du calcium dans les urines.

L'activité physique : Permet avant tout de la diminution de la perte osseuse mais également d'entretenir la force musculaire.

Des maladies hormonales : Déficit en hormones sexuelles (ménopause), troubles de la thyroïde et des glandes parathyroïdes, sécrétion anormale de cortisol. [21]

2.4 Physiopathologie

-La physiologie du tissu osseux est donc complexe. L'acquisition du capital osseux, ainsi que la perte osseuse sont soumises à de nombreux facteurs.

-Selon des études sur la densité minérale osseuse (DMO), l'ostéoporose considérée comme une problématique féminine (touche 8 à 18% des femmes de plus de 50 ans)

-La différence de la masse osseuse entre les hommes et les femmes, le vieillissement, l'architecture et la géométrie osseuse de l'homme qui lui confère une plus grande résistance que la femme. Il existe une perte osseuse minimale dans les deux sexes :

- **Chez les femmes**

L'ostéoporose post-ménopausique est principalement liée à la carence d'œstrogènes dus de l'arrêt brutal au moment de la ménopause de la sécrétion ostéogénique ovarienne. Il s'agit de la principale cause de perte osseuse dans cette pathologie, par diminution de la formation osseuse associée à une stimulation de la résorption osseuse. Le nombre d'années passées en état de carence oestrogénique demeure le principal déterminant de l'état du squelette de la femme. La ménopause constitue donc l'élément de rupture entraînant les femmes sur la pente glissante de l'ostéoporose. Ayant pour conséquence l'amincissement des corticales et des travées osseuses ainsi que la perforation des travées et la diminution de leurs connexions focalisée au niveau des vertèbres et du fémur.

Ces mécanismes expliquent la baisse de la DMO et l'altération de la microarchitecture corticale et trabéculaire qui sont à l'origine d'un accroissement du risque de fracture, entraînant en parallèle une difformité et une douleur chronique. [22]

- **Chez l'homme**

La diminution progressive et non brutale de la sécrétion androgénique testiculaire liée au vieillissement [22]. Le taux d'androgène total varie peu avec l'âge, cependant, il y a une augmentation de la SHBG (Sex Hormon Binding Globulin) qui se fixe à la testostérone et l'inactive. Les androgènes jouent un rôle direct sur le phénotype osseux, mais aussi indirect par aromatisation en œstrogènes, notamment l'œstradiol. Plus de 85% des œstrogènes circulants proviennent de l'aromatisation à partir de la testostérone. L'effet des œstrogènes serait plus important chez l'homme que celui de la testostérone.

Chez l'individu sain, la testostérone circulante est divisée en trois formes : la testostérone libre (2%), la testostérone fixée à l'albumine (40 à 60%) et la testostérone fixée à la SBHG (40 à 60%). La testostérone biodisponible est la forme libre et la forme liée à l'albumine (faible affinité et aisément dissociable). Avec le vieillissement, le taux de testostérone biodisponible chute, lié à la fois à l'augmentation de la SHBG et à la baisse de production d'androgène. L'axe hypothalamus-hypophyse-testicule ne parvient pas à compenser l'augmentation de la SHBG. [23]

2.5 Le rôle calcium dans l'ostéoporose

En cas de carence en calcium pendant la période de croissance, le capital osseux maximal est diminué. La perte osseuse nécessaire pour donner de l'ostéoporose est alors moins importante. Chez l'adulte, le calcium est toujours nécessaire, puisqu'il permet de préserver le tissu osseux, notamment en venant minéraliser l'os nouvellement formé. Il doit donc être apporté en quantité suffisante dans l'organisme, sinon le risque est d'avoir une moins bonne résistance osseuse. Les causes d'insuffisance calcique sont le plus souvent un défaut d'apport alimentaire via les produits laitiers et un défaut d'absorption intestinale. [24] [25]

2.6 Les Symptômes de l'Ostéoporose

En début, il ne faut pas confondre l'ostéoporose avec l'ostéomalacie
-L'ostéoporose est une maladie qui évolue de façon silencieuse (maladie sournoise) car, sans aucun symptôme et malheureusement, le diagnostic n'est établi après la fracture, le plus souvent

au niveau du col du fémur, du poignet, la réduction de la taille de l'ordre de 3 à 5 cm provoquée par un affaissement des vertèbres, et aussi les déformations de la colonne vertébrale dues ou encore des douleurs violentes au niveau des vertèbres. La fracture peut survenir spontanément ou faisant suite à un traumatisme bénin. [26]

2.7 Les marqueurs de l'ostéoporose

Il existe des marqueurs plus spécifiques. [27]

A. Les marqueurs protéiques

Cathepsine K

C'est une enzyme catalytique exprimée par les ostéoclastes, les cellules responsables de la résorption osseuse. Elle joue un rôle important dans la dégradation du collagène osseux et constitue une des cibles privilégiées dans la recherche d'une thérapie anti ostéoporotique.

Sclérostine

Il s'agit d'un marqueur de résorption osseuse par excellence puisque sa présence a un effet négatif sur la formation osseuse. La répression du gène codant pour cette protéine chez la souris a pour effet d'augmenter la densité osseuse d'une manière très significative. D'autre part, il a été bien démontré une augmentation linéaire du taux de Sclérostine avec l'âge. Ainsi chez les femmes post ménopausées, le taux de ce marqueur est plus élevé que chez les femmes prèménopausées

Ostéocalcine

Il s'agit d'une hormone protéique secrétée par les ostéoblastes. Elle joue un rôle très important dans la minéralisation en favorisant la déposition du phosphate de calcium au niveau des tissus minéralisés comme l'os et les dents. L'ostéocalcine est un marqueur de formation osseuse.

Le rapport RANKL/Ostéoprotégerine

RANKL : est une protéine ligand qui en se fixant sur son récepteur RANK situé à la surface des cellules précurseurs d'ostéoclastes comme les monocytes ou les cellules hématopoïétiques conduit à la différenciation de ces cellules en ostéoclastes ; les cellules osseuses responsables de la dégradation du tissu osseux. Ainsi l'augmentation de ce marqueur dans le sang indique une forte activité ostéoclastogénique à l'origine d'une augmentation du nombre d'ostéoclastes susceptibles de dégrader l'os.

Ostéoprotégérine (OPG) est une protéine synthétisée par les ostéoblastes qui a une forte affinité vis à vis de RANKL. La présence d'OPG en quantité suffisante a pour effet d'inhiber la fixation de RANKL sur son ligand RANK diminuant ainsi le nombre d'ostéoclastes dans le tissu osseux avec par conséquent une baisse de l'activité de dégradation osseuse.

B. Les marqueurs nucléotidiques

Les microARNs ont la propriété de se fixer d'une manière spécifique à des ARNm qui sont des transcrits de différents gènes. Ces ARNm vont donner des protéines après leur traduction dans le cytoplasme au niveau des ribosomes. La fixation de microARN sur les ARNm conduit inexorablement à l'inactivation de ces derniers empêchant ainsi leur traduction en protéines.

2.8 Conséquence de l'ostéoporose

A. La fracture

L'os devenu fragile peut se briser lors d'un choc même léger. Une glissade chez un malade de l'ostéoporose peut entraîner des fractures très invalidantes. [28]

- **De type :**
 - **Traumatique** : besoin d'un choc de faible force pour casser (ex : col du fémur)
 - **Spontanée** : dans les gestes de la vie courante (ex : tassement vertébral)
- **Localisée à :**
 - **Poignet** : après 55 ans ; les fractures deviennent plus fréquentes mais n'augmente pas la morbi ou la mortalité
 - **Extrémité supérieure du fémur (ESF)** : en âge 81ans Fracture de l'ESF peut résulte :
20% me mortalité à 1 an ; 30% d'handicap permanent ; 40% ne peuvent plus marcher seuls et 80% ne peuvent plus réaliser au moins 1 acte de la vie quotidienne.
 - **Vertèbre** : Ce type de fracture peut être à l'origine de douleurs intenses. Dans plus de la moitié des cas, les fractures vertébrales ne donnent aucun symptôme et peuvent s'accompagner d'une diminution importante de la taille ainsi que d'une courbure du dos vers l'avant, appelée cyphose.

B. Morbi/mortalité associées

Augmentation de risque cardio-vasculaires et le cancer, accru d'infections respiratoires.

2.9 Diagnostique d'ostéoporose

Il existe plusieurs examens possibles qui permettent de reconnaître l'ostéoporose ; tels que :
L'examen clinique, examen biologique, examens radiologiques, examen densitométrique

2.10 Le traitement pharmacologique de l'ostéoporose

2.10.1 Les bisphosphonates

Sont les traitements de première intention qui inhibent la résorption osseuse, ils sont des analogues structuraux du pyrophosphate inorganique, caractérisé par un squelette commun phosphore-carbone-phosphore (P-C-P) qui a une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite de l'os. [29] [30]

2.10.2 Le denosumab

Il est indiqué dans le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique 60 chez les femmes à risque élevé de fractures. [31]

2.10.3 Les SERMs (Selective Estrogen Receptor Modulator)

-Est comme les bisphosphonates, est un agent anti ostéoclastique, qui permet de mimer les effets favorables du traitement hormonal substitutif sur le tissu osseux sans en avoir les conséquences néfastes sur le système cardiovasculaire et sur le tissu mammaire. [32]

2.10.4 LeTériparatide

Il est sous la forme d'une injection sous-cutanée quotidienne, qu'est indiqué pour le traitement de l'ostéoporose post-ménopausique avérée des femmes présentant au moins deux fractures vertébrales. [33]

2.10.5 Le Ranélate de strontium

Est le seul traitement de l'ostéoporose qui soit à la fois antirésorptif et ostéoformateur. [34]

Chapitre II
Cathepsine K et ses
inhibiteurs

I.LA CATHEPSINE K ET SON MECANISME D’ACTION

Le terme protéase fait référence aux enzymes qui dégradent des substrats protéiques en hydrolysant les liaisons peptidiques [35]. Ainsi on distingue 6 classes de protéases : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases acides (à aspartate et à glutamate), les métalloprotéases et les protéases à thréonine [36]. En ce qui concerne les protéases à cystéine, il y a 72 familles de protéases à cystéine sont référencées correspondant à environ 160 protéases [37]. Parmi ces protéases, la famille la plus représentée et la plus documentée est la famille de la papaïne. On a onze protéases à cystéine, dénommées cathepsines, sont identifiées : les cathepsines B, H, L, S, C, K, O, F, V, X et W, découvertes par des techniques de biologie moléculaire et l'étude du génome humain (cathepsine K, O, V, X et W) avec une expression non pas ubiquitaire mais spécifique à un type cellulaire. [38]

1. Définition

La cathepsine K est une enzyme lysosomale de la famille des cystéines protéases, qui est spécifique de l'ostéoclaste, et y est la plus abondante. [39]

- plusieurs noms ont été donnés à cette protéase : cathepsine O, O2, K, X et OC2 [40], mais finalement le comité de l'union internationale de la biochimie et biologie moléculaire lui a assigné le nom de **cathepsine K**.

2. La structure moléculaire

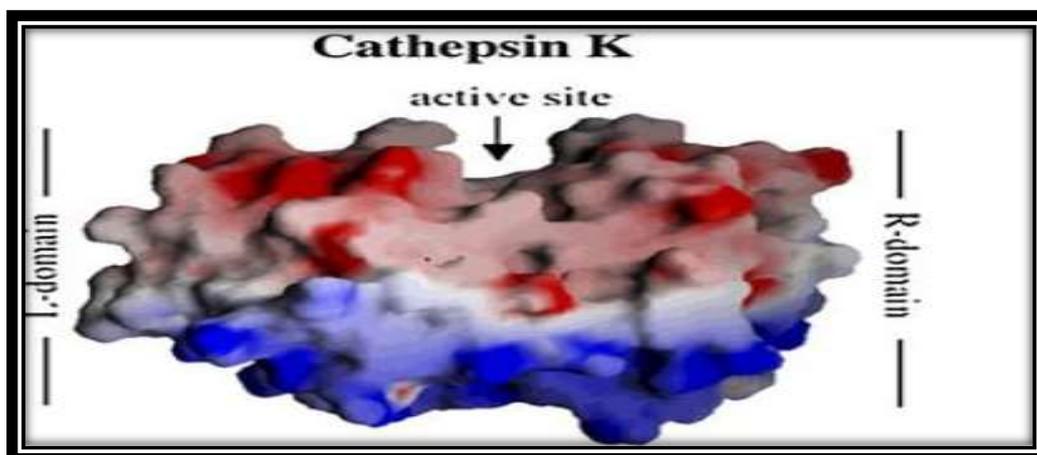


Figure 9 : La structure moléculaire

La cathepsine K est identifiée par le numéro (EC : 3.4.22.38) et classée sous le titre de cystéine endopeptidase de 215 acides aminés, et possédant deux domaines (Figure 9) :

Un domaine à gauche(L) : possède trois hélices alpha, qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures. [40]

Un domaine à droite(R) : possède un feuillet bêta très large qui se tord et s'enroule pour former un tonneau bêta. [40]

Les deux domaines sont ouverts à leur sommet et forment le site actif qui est un sillon qui s'étend sur toute la longueur du lieu créé par les domaines R et L. Plusieurs résidus importants sont retrouvés dans le site actif comme l'asparagine (Asp) 175 qui aide à la réaction enzymatique comme dans les autres cathepsines similaires à la papaïne. La cystéine 25 est également importante, car elle serait partiellement responsable de la constante de dissociation acide $Pka = 4.5$. [41]

Elle possède une charge positive (+6 chez l'humain et +7 chez le lapin).

3. Caractéristiques de l'enzyme

Chez l'humain, cathepsine k forme native est un zymogène monomérique le pro-CK, de 37 kDa. Son activation se produit suite au sectionnement d'une séquence de la protéine par les pepsines, sécrétées par les chondrocytes, ce qui lui confère sa forme active de 29 kDa. Il semblerait que l'activation de l'enzyme serait possible par l'auto-protéolyse à 4°C et à un pH de 4, et peut également être catalysée par une enzyme mature, ainsi que l'activation par d'autres CK actives. [42]

4. Sites de clivage de la cathepsine K sur le collagène et l'agrécan

La cathepsine K est une endopeptidase, c'est-à-dire qu'elle hydrolyse les liaisons peptidiques internes. [43] Elle est connue pour son rôle dans l'os et dégrade donc des composantes de la matrice osseuse.

4.1 Clivage du collagène de type I

Le collagène de type I est une triple hélice faite de deux chaînes alpha 1 et une chaîne alpha 2 [44]. La cathepsine K coupe le collagène de type I à plusieurs sites et la plupart des sites de clivage sont près de l'extrémité N-terminale et de l'extrémité C-terminale [45]. On retrouve un clivage au résidu 811 sur la chaîne $\alpha 1$ et un autre sur le résidu 815 sur la chaîne alpha 2 à partir de l'extrémité N-terminale. Il y a également un clivage au 97e résidu sur la chaîne alpha 1 et au 100e résidu sur la chaîne alpha 2 à partir de l'extrémité N-terminale. La cathepsine K

clive également le 22^e résidu dans les deux chaînes [46]. Atley et al, ont démontré que la cathepsine K libère le N-télopeptide du collagène de type I.

4.2 Clivage du collagène type II

Ont démontré que la cathepsine K dégrade également le collagène de type II bovin et humain. Leur expérience a permis de démontrer que la cathepsine K clive la triple hélice du collagène de type II près de l'extrémité N-terminale et qu'elle fait son clivage à l'intérieur de la molécule, ont trouvé six sites de clivage de la cathepsine K (Figure 10) sur le collagène de type II équin dont le premier site de clivage se trouve trois résidus (d'acides aminés) avant le site de clivage identifié [47]. **Mort et al** ont également proposé que la cathepsine K dégrade progressivement la molécule de collagène de type II à partir de l'extrémité N-terminale en enlevant premièrement 60 résidus d'acides aminés [48]

L'activité collagénique de la cathepsine K exige la présence de chondroïtine sulfate ou de kératane sulfate [59].

Ce type de collagène se trouve principalement dans le cartilage.

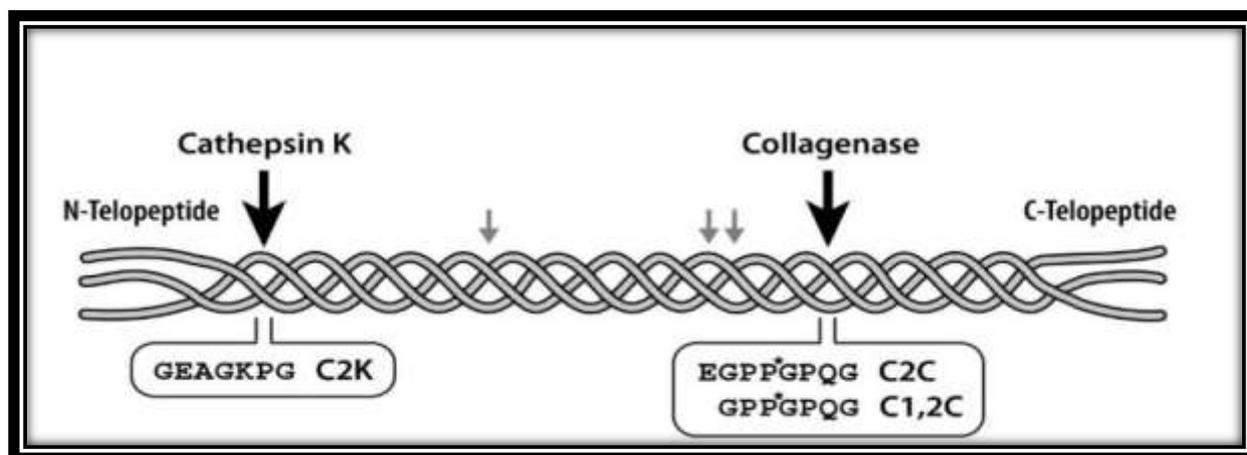


Figure 10: Clivage du collagène de type II par la cathepsine K et les collagénases

4.3 Clivage de l'agrécan

La cathepsine K dégrade l'agrécan, protéoglycane retrouvée dans la matrice du cartilage, afin de s'approvisionner en chondroïtine sulfate nécessaire à son activité collagénique [45]. Une expérience faite chez les bovins a montré que la cathepsine K clive l'agrécan entre Arg24-Leu25 et Gly56-Ser57 à partir de l'extrémité N-terminal. [50]

La cathepsine K est également capable de cliver d'autres composantes de l'agrécan comme son domaine globulaire entre serine19 et valine20.

Au total, il y a cinq sites de clivage sur l'agrécane, quatre sur le domaine G1 et un dans le domaine E. [50]

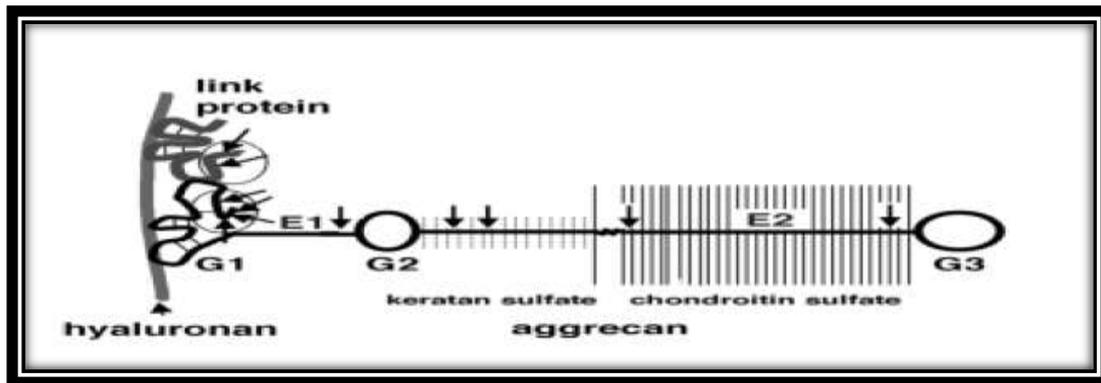


Figure 11: Site de clivage de la cathepsine K sur l'agrécane

5. Localisation de cathepsine k et son rôle

La cathepsine K a été trouvée dans certaines parties de l'embryon en développement notamment dans le tissu épithélial, le système gastro-intestinal, le système respiratoire et dans le système urinaire, il serait impliqué dans la libération des hormones thyroïdiennes [51]. L'expression est plus élevée dans l'os [52], majoritairement trouver dans les ostéoclastes. Son rôle important dans la résorption osseuse est démontré par le fait que 60 % de l'activité hydrolytique [53]. Et aussi a un rôle dans certaines fonctions du cerveau. [54]

6. Pathologique

Certaines conditions pathologiques stimulent l'expression de la cathepsine K :

- Elle a été reconnue pour son implication dans l'ostéoporose, une maladie caractérisée par une diminution de la masse osseuse, causée par une suractivité des ostéoclastes. [56] [57]
- On observe aussi l'expression de la cathepsine K dans plusieurs cancers comme le cancer de la prostate et le cancer du sein où son expression est élevée dans les cellules tumorales et dans les métastases de ces tumeurs. Cela aurait une corrélation avec la progression accélérée de la tumeur et la dégradation de l'os. [58]

7. Régulation génétique

Le gène de la cathepsine K est retrouvé dans le chromosome 1q21 et est composé de huit exons et sept introns. Il en résulte, suite aux modifications post-transcriptionnelles, en un fragment de 1.7 kb de long. [58]

Le gène de la cathepsine K est exprimé en grande quantité dans les ostéoclastes, car elle est essentielle à la dégradation de la matrice osseuse.

Le ligand du récepteur activateur du facteur kappa-B (RANKL) est une molécule importante, car sa liaison au RANK, récepteur présent sur les ostéoclastes, active la différenciation ou l'activation des ostéoclastes. [59]

En activant les ostéoclastes, RANKL stimule aussi l'ARNm de la cathepsine K et augmente l'expression de la protéine. [60]

L'IL-1 α , qui est exprimé dans les conditions pathologiques, augmente également l'expression de RANKL dans les ostéoclastes. [61]

Beaucoup d'autres agents régulent la production de RANKL par les cellules stromales. (La vitamine D, la parathormone, la TNF- α , les glucocorticoïdes, l'IL-11, l'hormone thyroïdienne, la prostaglandine-E2, le facteur de croissance des fibroblastes-2, l'histamine, « insulin-like growth factor»-1 et lipopolysaccharides (LPS). [59]

Le TNF- α stimule directement l'expression l'ARNm de la cathepsine K dans les ostéoclastes. [62]

L'acide rétinoïque quant à lui augmente la régulation de la cathepsine K dans les ostéoclastes matures. [63]

L'OPG est une molécule qui joue un rôle important dans la différenciation et l'activation des ostéoclastes. L'OPG se lie au RANKL et l'empêche de se lier sur le RANK et par conséquent d'activer les ostéoclastes. [64]

II. L'ETUDE DES INHIBITEURS DE LA CATHEPSINE K

En partant du principe que la cathepsine K joue un rôle important dans la résorption osseuse enzymatique, l'utilisation d'inhibiteurs de la cathepsine K pourrait être une nouvelle approche thérapeutique.

Certes, il n'existe pas encore d'inhibiteur de la cathepsine K sur le marché pour le traitement ou la prévention de l'ostéoporose, toutefois il existe des publications d'études sur quatre inhibiteurs de la cathepsine K (**balicatib**, **relacatib**, **odanacatib**, **ONO-5334**) pour le traitement de l'ostéoporose.

Idéalement, les inhibiteurs de la cathepsine K devraient avoir une faible masse moléculaire, un caractère peptidique minimal, un effet réversible et fortement sélectif et ne pas nuire à d'autres membres importants de la famille cystéine-cathepsine.

Parmi les inhibiteurs de cathepsine k, il y a : **des inhibiteurs naturels qu'ils** sont synthétisés par l'organisme, et **des inhibiteurs synthétiques** disponibles ont été développés particulièrement pour l'ostéoporose où son rôle dans cette pathologie est très bien connu. [65]

1. L'odanacatib (ODN)

Est un inhibiteur réversible sélectif de la cathepsine K développé **par le laboratoire Merck (en 2016)** dans le traitement de l'ostéoporose post ménopausique, l'arthrose et les métastases osseuses consécutives à un cancer du sein (Figure 12).

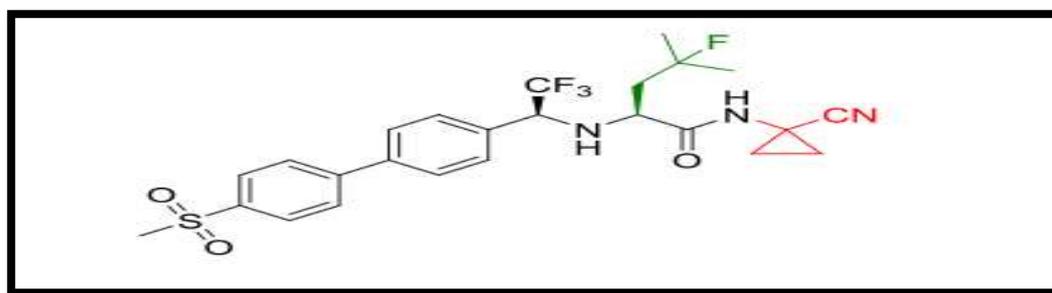


Figure 12: Structure chimique de L'odanacatib

1.1 Propriétés pharmacocinétiques de l'odanacatib

- C'est une molécule non peptidique de faible masse moléculaire.
- Savoir un métabolisme in vitro minimal.
- La demi-vie est longue.
- Une bonne biodisponibilité orale de l'ordre 0.5% à 1%. [66]

a. Mécanisme d'action de l'odanacatib

Le 1er mécanisme d'action

Son action est due à la formation de liaisons hydrogène entre l'amide NH des groupes P1 et P2 de l'odanacatib et le carbonyle du résidu Asn158, ainsi qu'entre le carbonyle entre P1 et P2 et le NH du résidu Gly66. Une liaison hydrogène supplémentaire se forme également entre l'amine NH (entre les groupes P2 et P3) et le carbonyle du résidu Gly66. Le double espace aromatique de la partie P3 de la molécule permet quant à lui de maximiser son interaction avec la poche S3 qui contient un résidu aspartique (Asp61) capable de former des liaisons ioniques et des ponts salins (Figure 13). Ces liaisons hydrogène avec le site catalytique de la cathepsine K permettent d'inhiber l'activité enzymatique en empêchant la fixation du substrat. [67]

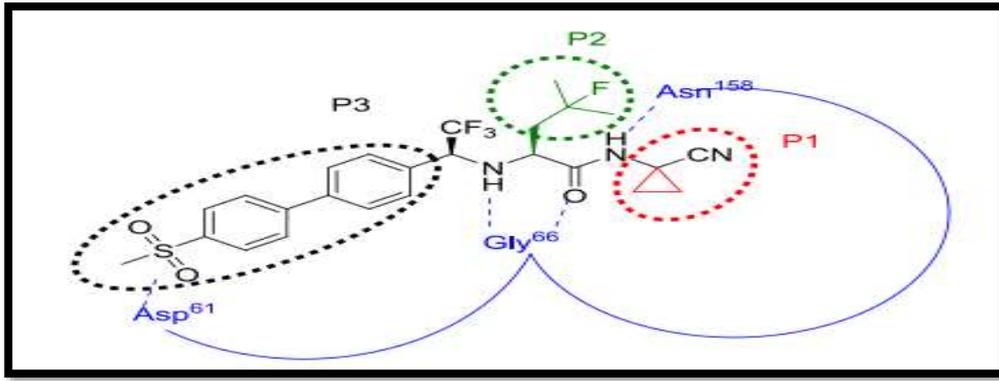


Figure 13: Interactions entre l'odanacatib et la cathepsine K

Le 2ème mécanisme d'action

Cet inhibiteur agit également sur le transport des vésicules intracellulaires de la cathepsine K dans les ostéoclastes. Le blocage de ce transport empêche l'excrétion de la cathepsine K par l'ostéoclaste lors de la phase de résorption du remodelage osseux, d'où l'absence d'hydrolyse du collagène, principal constituant de la matrice organique osseuse. Ce mécanisme va enrayer la résorption osseuse de l'os (Figure 14). Notons que ce mécanisme n'agira pas sur le nombre d'ostéoclastes, ce qui évite une diminution secondaire de la formation osseuse. Ce point est crucial, car c'est un inconvénient des agents anti-résorptif actuellement commercialisés. [68]

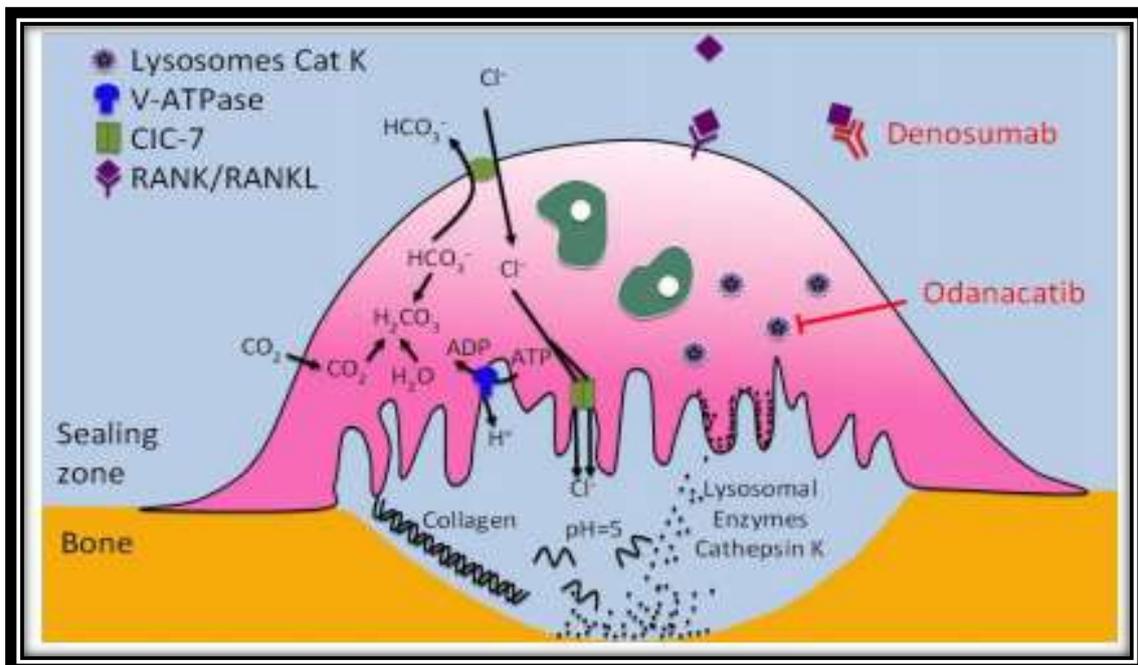


Figure 14: Mécanisme d'action de l'odanacatib

2. La Balicatib

Est un inhibiteur de la cathepsine K le plus avancé et puissant avec une sélectivité élevée contre les cathepsines B, L et S humaines (> 4 800 fois, > 500 fois et > 65 000) (Figure 15).

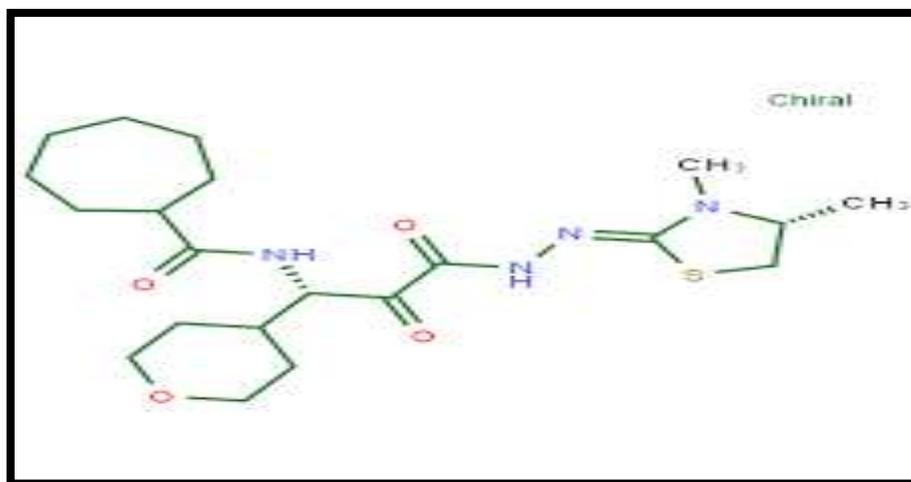


Figure 15: Structure chimique de la balicatib

3. Les anti-RANKL

Denosumab est un anticorps monoclonal (IgG2) humain qui cible le RANKL, ligand du récepteur RANK. [69]

3.1 Mécanisme d'action de dénosumab

Le dénosumab se lie de façon spécifique au RANKL avec une forte affinité, empêchant l'activation du récepteur RANK situé à la surface des ostéoclastes et de leurs précurseurs (Figure 16). Le blocage de l'interaction RANK/RANKL inhibe la formation, la fonction et la survie des ostéoclastes et diminue ainsi la résorption osseuse dans l'os cortical et trabéculaire. [69]

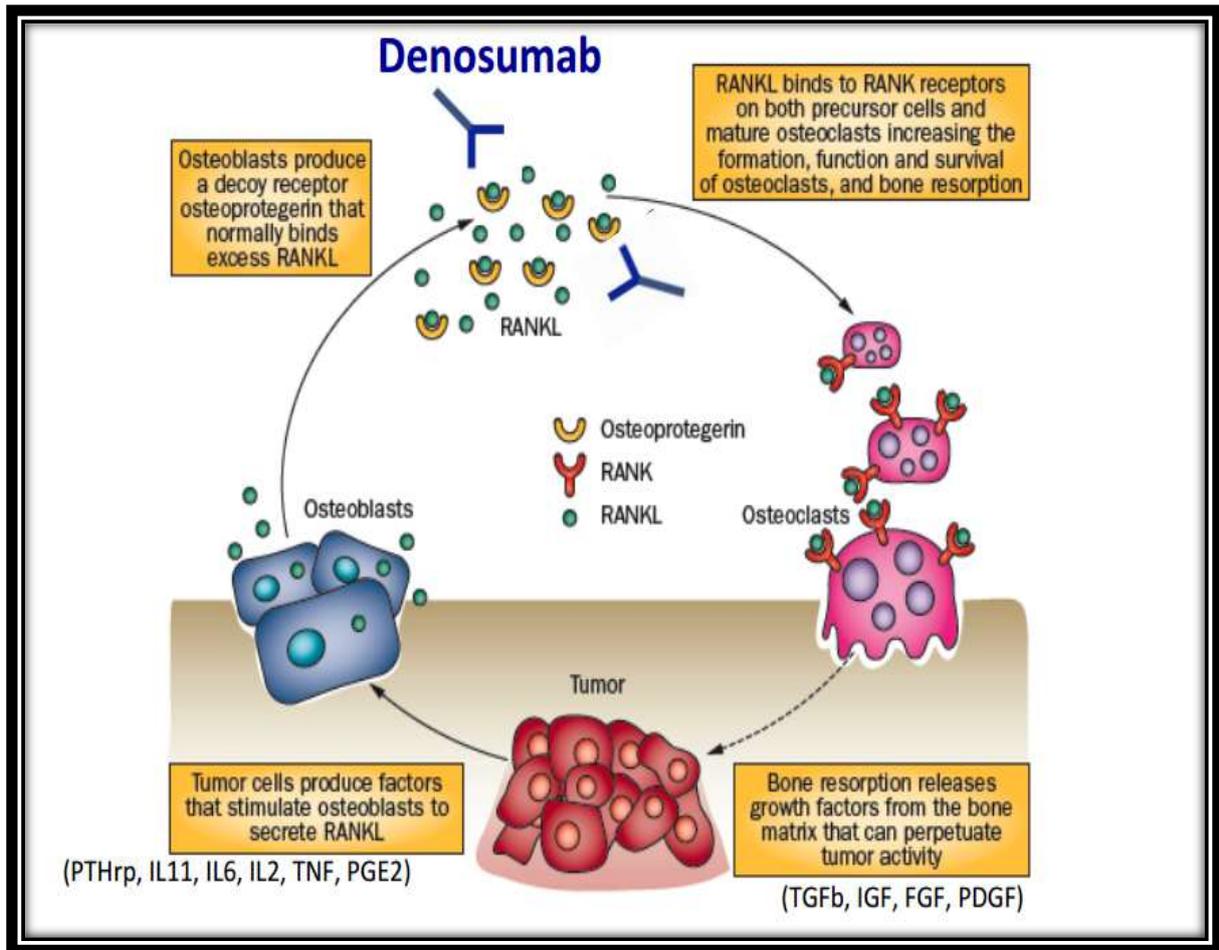


Figure 16: Mécanisme d'action de dénosumab

Chapitre III

Le Docking

Moléculaire

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape de la plupart des réactions biologiques. Comprendre son mode de fonctionnement et définir quels sont les résidus mis en jeu, est donc primordial pour pouvoir expliquer les mécanismes qui influent sur l'affinité entre les molécules. De même, la découverte de nouvelles molécules activant ou inhibant l'activité biologique d'une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leur affinité respective. C'est dans ce but que des techniques de modélisations moléculaires, regroupées sous le nom "amarrage moléculaire" ou "docking", ont été développées. Le terme générique de "ligand", tandis que le terme "récepteur" est utilisé pour la cible sur laquelle le ligand va se fixer, que ce soit une enzyme ou un récepteur protéique. Afin d'obtenir le minimum global d'énergie d'interaction entre le ligand et le récepteur.

1. Définition.

Le docking moléculaire est une méthode d'interaction d'un complexe formé de deux ou plusieurs molécules, en cherchant des orientations dans l'espace et des conformations favorables pour la fixation d'un ligand à un récepteur. [70]

2. Les étapes de docking moléculaire

Deux approches sont principalement employées pour la modélisation du système protéine ligand :

La première étape consiste au téléchargement des structures chimiques des cibles à traiter, pour cela il est nécessaire d'aller directement à la Bank PDB avec la structure

Ensuite, la PDB contient plusieurs milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie (rayons X), soit par RMN. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la Bank, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée. Après le téléchargement de la cible (PDB), nous utilisons un logiciel de visualisation pour voir avec quels ligands l'enzyme est Co-cristallisé (eau, ligands, ion...).

La deuxième étape, concerne les structures du (ou des) ligand(s) utilisé(s) lors du docking moléculaire. Il y a deux grandes bases de données de structures chimiques des ligands. La première représente ces structures par les programmes d'informatique de modélisation moléculaire, où les différentes structures sont générées par optimisation de géométrie. Dans le deuxième cas, elles sont obtenues à partir des bases de données comme Pub Chem Project ou

autres bases de données des structures. Ces dernières ont différentes extensions comme PDB (Protein Data Bank), SDF.... [71]

3. Les programmes

De nombreuses publications ont proposé des expériences parallèles menées avec un bon nombre de programmes de criblage virtuel. Les plus fréquemment [72] :

Tableau 1: Quelques exemples de logiciels de criblage virtuel

Programme	Algorithme de recherche	Fonction de score
FlexX	Fragmentation/reconstruction	Basée sur les connaissances
Glide	Monte Carlo	Empirique
Gold	Génétique	Basée sur les champs de force
Surflex-Dock	Hammerhead modifié	Empirique

*Dans notre étude nous avons utilisé le programme : **Surflex-Dock**

4. Les interaction Proteine_ligand

Les interactions entre deux molécules (Figure 17) [74] :

- L'une, la cible, est une protéine possédant un ou plusieurs sites actifs spécifiques avec une structure tridimensionnelle connue.
- L'autre, le ligand, est une petite molécule flexible d'origine exogène.

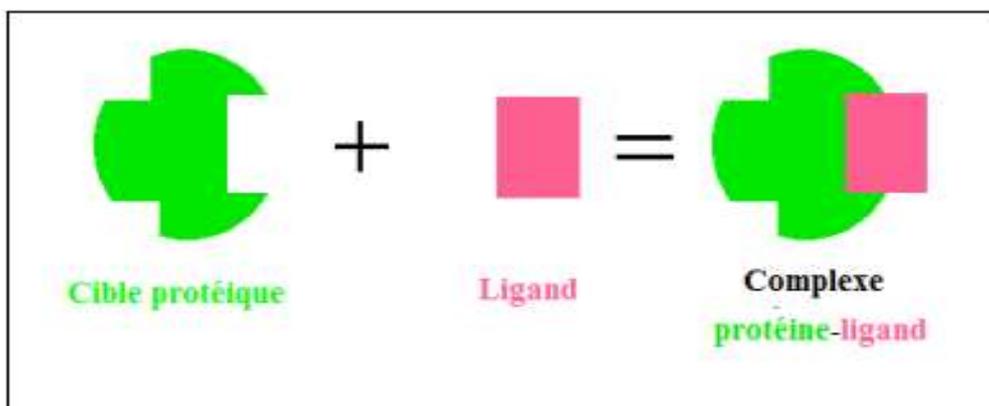


Figure17: La formation du complexe protéine-ligand

En effet, La capacité de la protéine à fixer sélectivement et avec une grande affinité son ligand repose sur la formation de différents types d'interactions non covalentes parmi lesquelles :

- Les interactions électrostatiques

Liaisons ioniques résiduelles faibles, proviennent de l'interaction entre deux atomes de charges opposées conduisant à la création d'une force attractive (Figure 18).

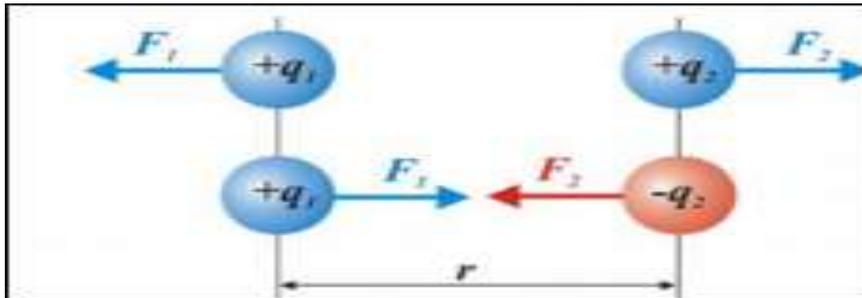


Figure 18: Les interactions électrostatiques

- Les interactions de Van der Waals

Forces électrique résiduelles faibles, résultent de l'interaction entre deux atomes, ou groupements d'atomes, adjacents neutres constituant des dipôles opposés et conduisant à la création d'une force attractive avec une distance de 3 à 4,5 Å approximativement (Figure 19).

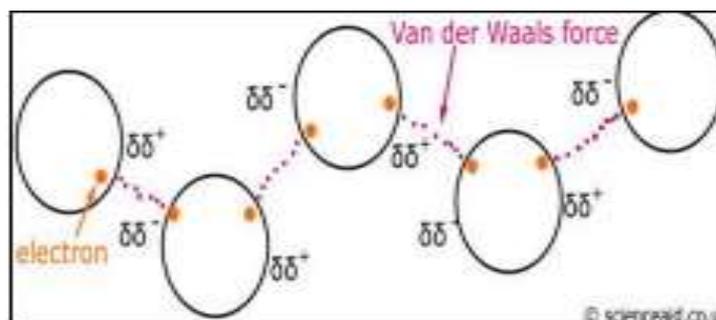


Figure 19: Les interactions de Van der Waals

- Les liaisons hydrogène

Découlent de l'interaction électrostatique entre un élément très électronégatif portant au moins un doublet non liant et un atome d'hydrogène (Figure 20). Ces interactions sont plus fortes que celles des forces de Van der Waals et elles se font sur une distance qui varie entre 2,2 et 4Å. [74]

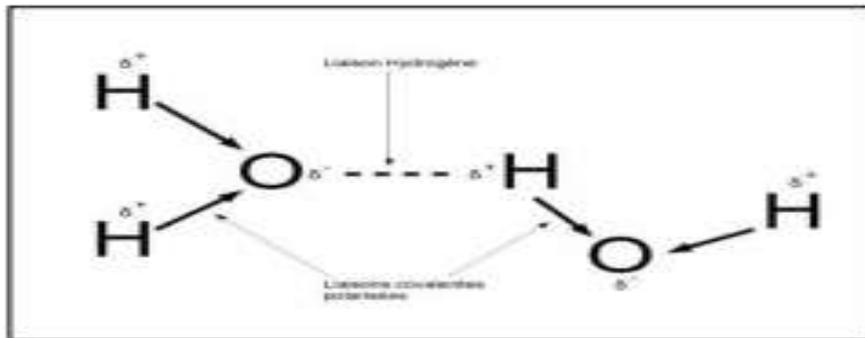


Figure 20: Les liaisons hydrogène

- Les interactions hydrophobes

Sont des chaînes organiques saturées ou aromatiques non polaires ayant très peu d'affinité pour l'eau (Figure 21). Ils ont tendance à se positionner de manière à présenter la plus faible surface de contact avec l'environnement aqueux. [75] (Figure 21).

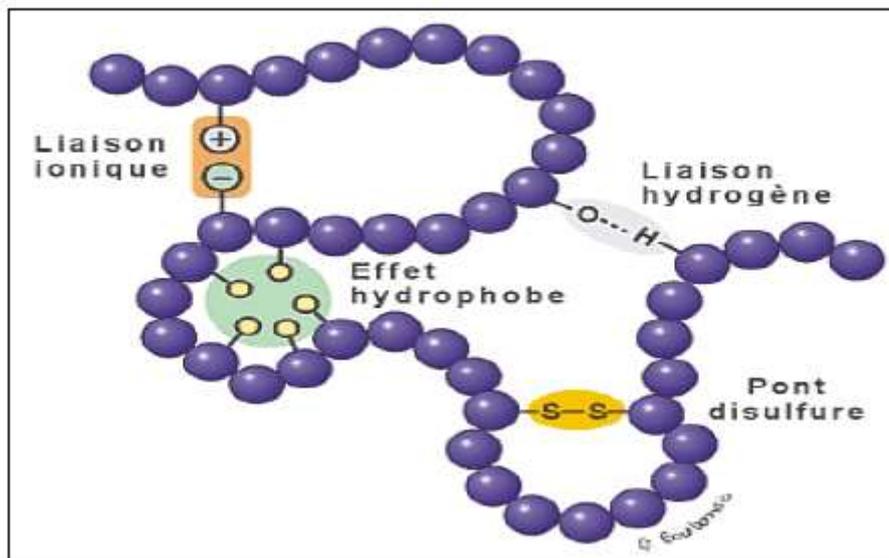


Figure 21 : Les interactions hydrophobes

II – Partie Pratique

Chapitre I
Matériel et Méthodes

I. Matériel

1.1 Microordinateur

Dans notre travail nous avons utilisé un micro-ordinateur avec une mémoire vive de 4Go, un processeur intel(R) core(TM) i3-5005U CPU@ 2.00GHz 2.00GHz, sous le système d'exploitation Windows 10 professionnel version 2017.

1.2 Les programmes

Nous avons fait appel à plusieurs programmes pour réaliser les calculs de docking moléculaire de ce travail :

- Pour étudier les interactions protéines-ligands, nous avons choisi le programme **Surflex** version 1.3 (2005) qui utilise une méthode incrémentielle pour effectuer ces calculs.
- Le logiciel **ArgusLab** version 4.0.1 a été utilisé pour séparer le complexe (protéine – ligand).
- Le programme **OpenBabel-2.4.1** nous a permis de convertir les fichiers en plusieurs formats (mol2, mol, pdb, sdf...).
- **ViewerLite4.2** permet de visualiser les interactions établies entre les inhibiteurs et le site actif de notre enzyme, la présentation des liaisons chimiques (liaison hydrogène), la mesure de distances interatomiques, l'annotation des acides aminés (nom, numéro), créations de surfaces, choix de couleur (selon les atomes, les structures...), la capacité de cacher et puis afficher à nouveau les différentes molécules.
- Le logiciel **Excel (2016)** pour tracer la courbe de corrélation entre l'activité biologique ($\log IC_{50}$) de 30 inhibiteurs testés et leurs affinités ($final-0$) calculées par Surflex.
- Le réseau internet comme outil principal pour le téléchargement des programmes, des complexes et des ligands dont on a besoin.

II. Méthodes

Le docking moléculaire est une méthode qui prédit l'orientation ou la position relative de deux molécules (un ligand et un récepteur). La structure obtenue confère les propriétés à l'ensemble pour avoir un complexe plus stable.

C'est un procédé très utile, il est utilisé pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison et permet d'évaluer les conformations par un calcul rapide d'énergie d'interaction des ligands avec un récepteur pour ne retenir que la meilleure.

2.1 Test d'évaluation de la fiabilité du programme Surflex

D'abord nous avons évalué la performance du programme d'arrimage moléculaire Surflex version 1.3 (2005) par deux tests : le **RMSD (Root-Mean-Square Deviation)** et le **coefficient de corrélation linéaire (r)**.

2.1.1 RMSD (déviation de la racine de la moyenne des carrés)

- Ce test a été réalisé sur 130 complexes protéines-ligands tirés de la PDB de façon aléatoire, ils ont été téléchargés sous format .pdb dans un répertoire spécifique.
- A l'aide du programme Arguslab, la protéine est séparée de son ligand et enregistrée au format .pdb
- Arguslab utilise le format .pdb par contre Surflex exige le format .mol2, donc les protéines et leurs ligands sont protonés, chargés et convertis dans le format .mol2 par le logiciel OpenBabel.
- Calcul du RMSD par le logiciel Surflex.
- L'évaluation des performances d'un programme de docking moléculaire est habituellement jugée au moyen du RMSD entre la meilleure conformation du ligand générée par surflex (finale-0) et la conformation expérimentale. La prédiction est acceptable si sa valeur ne dépasse pas 2 angströms.
- Les résultats des 130 complexes étudiés (protéines - ligands) sont présentés dans l'annexe 1.

2.1.2 Le coefficient de corrélation

Le coefficient de corrélation de Pearson permet d'évaluer l'intensité et le sens de la relation linéaire entre deux séries de données provenant de l'échantillonnage de deux variables métriques. Le coefficient de corrélation indique le degré de relation linéaire entre les deux séries de données, et il prend des valeurs situées entre -1 et 1 . S'il n'y a pas de relation linéaire entre les deux séries de données, le coefficient de corrélation est très proche de zéro, et on dira que les deux variables ne sont pas corrélées. [76]

Pour étudier la corrélation entre le score obtenu par le docking moléculaire par le logiciel surflex et l'activité biologique (IC_{50}), nous avons utilisé 30 complexes issus de la PDB et à l'aide d'EXCEL 2016 nous avons calculé le coefficient de régression.

2.2 Le choix du complexe (1tu6)

Parmi les structures tridimensionnelles de notre enzyme cible (la cathepsine k) qui existent dans la banque de données protéiques (pdb), nous avons choisi d'étudier celle portant le code 1TU6 (Cathepsin K complexed with a ketoamide inhibitor) (Figure 22). En effet ce complexe dispose d'une bonne résolution (1.75Å) et d'une très bonne IC_{50} (0.8nM). Son ligand, le FSP, possède de bonnes caractéristiques pharmacologiques (tableau 2)

Tableau 2 : les caractéristiques pharmacologiques du ligand de référence (FSP)

Complexe	PM	Donneurs de H	Accepteurs de H	Liaisons rotables	Log P
1tu6 (FSP)	444.51	3	8	12	5.09

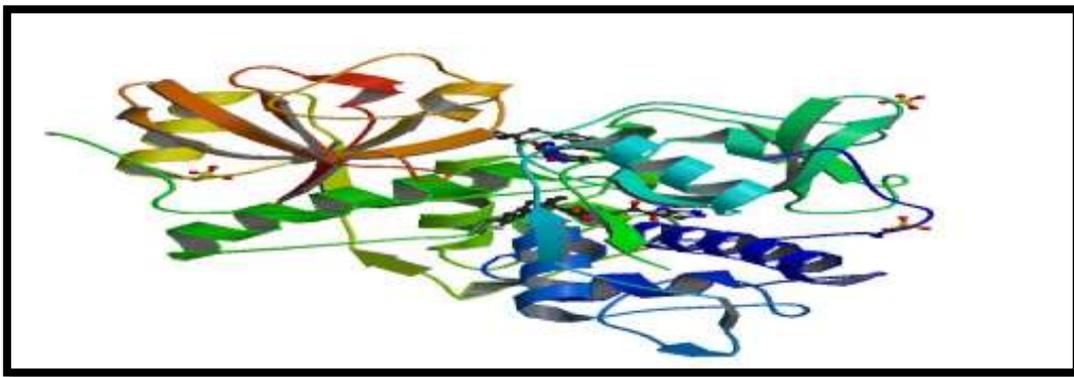


Figure 22: structure tridimensionnelle du complexe 1tu6

2.3 Préparation des molécules d'arrimage

2.3.1 Préparation de la protéine :

- L'enzyme cible que nous avons utilisée dans notre travail est la cathepsine k sa structure tridimensionnelle existe sous forme de complexe (lié à un inhibiteur) ce complexe a été téléchargé sous format .pdb .
- La cathepsine k est constituée de 2 chaînes (A et B), la chaîne B a été éliminée pour permettre une utilisation plus aisée de l'enzyme lors du docking moléculaire, et les

molécules d'eau et l'inhibiteur présents dans la chaîne A ont également été éliminés et la structure de l'enzyme est enregistrée sous le format .pdb par ArgusLab.

- Par le programme Open Babel2.0.2, ce dernier est converti au format .mol2, format le mieux adapté pour Surfex.

Tableau 3: les propriétés de la macromolécule " cathepsine k "

Molécule	Chaîne	Séquence	Organisme	Détail
Cathepsine k	A, B	215	Homme	Gene: CTSK (CTSO,CTSO2) EC: <u>3.4.22.38</u>

2.3.2 Préparation du ligand

- Par ArgusLab, nous avons sélectionné le ligand (FSP) et éliminé tout le reste (la protéine les molécules d'eau, le métal...).
- Le ligand est ensuite enregistré au format .pdb.
- Par le programme Open Babel 2.0.2, ce dernier est converti au format .mol2.

2.3.3 Les étapes de docking

Le docking moléculaire a été réalisé par le programme Surfex en suivant plusieurs étapes :

➤ Génération du protomol

Construction d'une pseudo-molécule (protomol) qui va servir de cible à laquelle se rallie le ligand dans le site actif de la protéine. Pour la création de protomol nous avons utilisé la commande :

```
surfex-dock proto ligand.mol2 protein.mol2 pl
```

➤ Le docking de la molécule

Cette étape de l'arrimage moléculaire exige un ligand au format .mol2, un protomol format .mol2 et une protéine format .mol2. Nous avons utilisé la commande :

```
surfex-dock dock ligand.mol2 pl-protomol.mol2 protéine.mol2
```

Le résultat donne les dix meilleures conformations du ligand au niveau du site actif de l'enzyme classées par affinités décroissantes représentées par des scores (final-0 à final-9), le meilleur score étant le final-0 au format .mol2.

➤ Calcul du RMSD

La valeur du RMSD est obtenue par une troisième commande :

```
Surflex-dock rms final-0.mol2 ligand.mol2
```

2.4 Recherche de nouveaux inhibiteurs de la cathepsine k

- A partir de la banque Pubchem nous avons téléchargé 162 similaires de notre ligand de référence (FSP) avec une similarité de 80%.
- A l'aide de programme Open Babel2.0.2, nous avons converti le format de ces similaires de format .sdf vers .mol2 .
- Pour déterminer l'affinité de ces différents similaires vis-à-vis de notre cible, nous avons utilisé une commande unique, celle de dock list, qui consiste à faire passer les similaires un à un et calculer leurs affinités successives (final-0 ; final-10 ; final-20 ...)

```
surflex-dock dock_list ligarchive pl-protomol.mol2 protéine.mol2 log
```

- Une préparation préliminaire est nécessaire pour appliquer cette commande :
 - Création d'un dossier contenant les 162 similaires
 - Création d'un fichier sans extension, appelé ligarchive, contenant l'adresse de chaque similaire dans son répertoire spécifique
 - Notre protéine au format .mol2
 - Le protomol au format .mol2

2.5 Filtrage ADME (La règle de cinq de Lipinski 1997)

Chaque médicament potentiel doit se conformer à plusieurs critères de base, tel son faible coût de production, être soluble, stable, mais doit aussi se conformer à des barèmes associés à ses propriétés pharmacologique d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité (filtre ADME/Tox) (Miteva et al., 2006) [77] qui est basée sur la règle de 5 formulée par (Lipinski et al., 2001). [78] Cette règle décrit un ensemble de critères, permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Selon cette règle un composé possède toutes les chances d'être disponible oralement s'il respecte au moins 3 des 5 critères suivantes :

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da).
- Le coefficient de partition octanol/eau (logP) ou une lipophile entre -2 et 5.
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène (OH et NH) doit être ≤ 5 .
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (O et N) doit être ≤ 10 .
- possède un nombre de liaisons rotatives inférieur à 15.

* **LogP** : est égal au logarithme du rapport des concentrations de la substance étudiée dans l'octanol et dans l'eau ($\text{LogP} = \text{Log Coct/Ceau}$). Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une molécule. En effet, une molécule doit, pour parvenir dans l'organisme jusqu'à son lieu d'action, se dissoudre dans des phases aqueuses, traverser des membranes lipidiques, des phases protéiques et osidiques. La solubilité dans l'eau et dans les lipides ainsi que le coefficient de partage jouent dans ce transport, un rôle fondamental. Une molécule dotée d'une action plus rapide doit avoir un coefficient de partage qui favorise le plus son transport. [79]

Tous ces paramètres ont été calculés, à partir de la structure 2D des composés étudiés, en utilisant le serveur Molinspiration. [80]

2.6 Analyse visuelle des liaisons hydrogène établies entre le ligand et les acides aminés du site actif

Parmi les liaisons hydrogène les plus courantes sont celles qui impliquent l'atome d'hydrogène lié de façon covalente à l'oxygène (O-H), à l'azote (N-H) et plus rarement au soufre (S-H).

Cette étape est réalisée par le logiciel ViewerLite 4.2 pour visualiser les interactions hydrogènes que peut établir chaque inhibiteur avec le site actif de l'enzyme.

Chapitre II

Résultats

&

Discussions

1. Test d'évaluation de la fiabilité du programme Surflex :

Le docking moléculaire est un procédé très utile utilisé pour estimer la puissance d'interaction et l'affinité de liaison et permet d'évaluer les conformations par un calcul rapide d'affinité d'interaction des ligands avec un récepteur pour ne retenir que la meilleure.

Cette méthode nous a permis de rechercher des nouveaux inhibiteurs de la cathepsine k.

Nous avons, dans un premier temps, évalué la performance du programme Surflex par deux tests : le **RMSD** et le **coefficient de corrélation linéaire**.

1.1 Le test RMSD

L'écart de la déviation quadratique moyenne est une des méthodes qui nous a permis de juger la capacité et l'efficacité du programme à prédire le positionnement exact d'un ligand dans le site actif calculé par le logiciel Surflex par rapport à celui déterminé expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB.

La prédiction est acceptable lorsque la valeur du RMSD obtenue est $\leq 2\text{\AA}$. La vérification de la performance du logiciel Surflex a été réalisée sur 130 complexes protéine-ligand. Les calculs de RMSD entre la meilleure conformation du ligand générée par surflex (finale-0) et la conformation expérimentale de référence issue de la PDB ont donné les résultats présentés dans la figure (ou graphe) dans le tableau 11 dans les annexes.

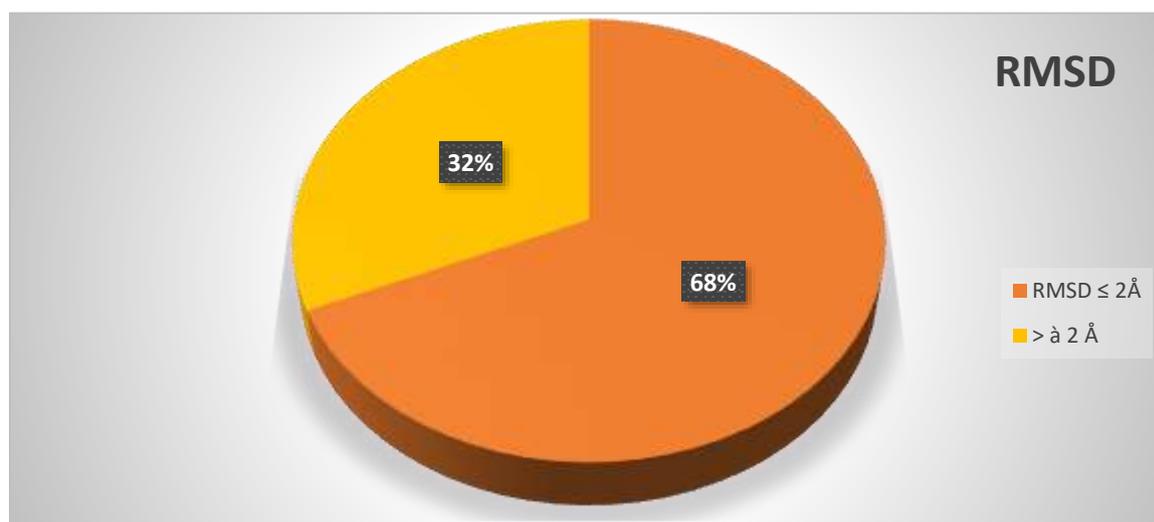


Figure 23: Résultats en % des RMSD(Å) obtenus par Surflex.

Toutes les valeurs de RMSD $\leq 2\text{\AA}$ sont considérées comme positives.

Les résultats du graphe sont donnés en pourcent (%). Ils montrent que 68% des valeurs RMSD sont $\leq 2\text{\AA}$ alors que 32% sont $> 2\text{\AA}$. Ces valeurs positives (68%) apportent la preuve que le

logiciel Surflex reproduit assez bien les données expérimentales et qu'il peut être utilisé pour la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

D'après notre résultat et les travaux CHIKHI A. et BENSEGUENI A. (2008) (avec 63% des $\text{RMSD} \leq 2\text{\AA}$) on peut conclure que Surflex est un programme de docking moléculaire performant. [81]

1.2 Analyse visuelle des molécules superposées

L'analyse visuelle par MSViewerlite est une étape faisant suite au test RMSD pour une meilleure appréciation des résultats obtenus avec Surflex.

Pour cela, nous avons choisi de comparer 3 complexes par simple superposition des structures de leurs final-0 à celles obtenues expérimentalement que l'on télécharge de la PDB (1 complexe dont le RMSD est $\leq 2\text{\AA}$, 1 complexe dont le RMSD est au voisinage de 2 et 1 complexe dont le RMSD est largement $> 2\text{\AA}$).

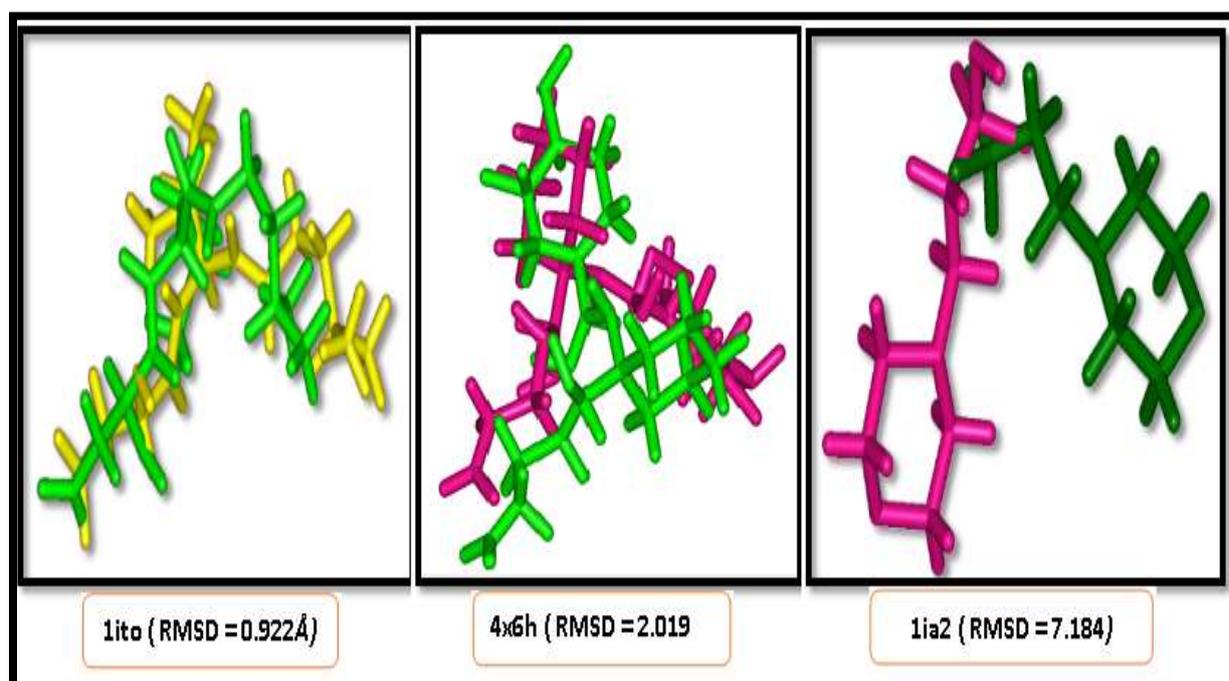


Figure 24 : Superposition des trois ligands des complexes (1ITO, 4X6Het 1IA2) et celles calculées par docking moléculaire avec Surflex

- Le 1^{er} complexe 1ito : son RMSD est le meilleur = 0.922 (final-0 en vert figure 24).
- Le 2^{ème} complexe 4x6h : son RMSD est intermédiaire = 2.019 (final-0 en vert figure 24).
- Le 3^{ème} complexe 1ia2 : son RMSD est mauvais = 7.184 (final-0 en vert figure 24).

1.3 Test du coefficient de corrélation linéaire

Il s'agit du deuxième moyen permettant de tester la fiabilité du programme Surflex.

- $L'IC_{50}$: est la concentration d'inhibiteur nécessaire pour atteindre 50% d'inhibition de l'enzyme. Cette grandeur peut également être exprimée en $\log IC_{50}$ ou en $p IC_{50} = -\log IC_{50}$.

Ce test consiste à déterminer le degré de corrélation entre le $\log IC_{50}$ déterminées expérimentalement, issues de la PDB, et les affinités correspondantes pour l'enzyme calculées par Surflex.

La détermination du coefficient de corrélation entre l'activité biologique et le score de docking moléculaire semble être un bon moyen pour tester la performance du programme surflex utilisé dans notre travail.

Le coefficient de corrélation est calculé en traçant la courbe de régression linéaire entre les scores (affinités) obtenus par docking moléculaire (surflex) et les $\log IC_{50}$ de 30 inhibiteurs tirés de la PDB de façon aléatoire. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4 suivant :

Tableau 4: résultats de l'analyse par la régression linéaire d'affinité obtenus par docking moléculaire (surflex) et les $\log IC_{50}$

N°	Complexe	IC_{50} (nM)	$\log IC_{50}$	Final-0 (M^{-1})
01	1au4	7,7	0,88	1,68
02	1bp4	2	0,30	2,61
03	1ia2	23	1,36	4,57
04	1ia3	8	0,90	2,7
05	1kyn	4100	3,61	6,45
06	1ms6	19	1,27	3,97
07	1oir	32	1,50	5,44
08	1vsn	0,2	-0,69	3,04
09	1u9v	6	0,77	5,31
10	1u9w	3,5	0,54	4,24
11	1u9x	7	0,84	4,02
12	1yk7	19	1,27	3,43
13	3ovx	31	1,49	2,26
14	3ow3	742	2,87	3,44
15	3owx	17600	4,24	9,96
16	2aux	0,5	-0,30	3,52
17	2bd1	15	1,17	3,3

18	2dc6	9100	3,95	7,79
19	2dca	23	1,36	6,3
20	2dcc	46000	4,66	5,65
21	2yj8	6,5	0,81	2,55
22	3hha	12,6	1,10	2,36
23	3kwz	4	0,60	2,33
24	3o0u	12	1,07	4,27
25	3ox1	4,9	0,69	1,9
26	3ox3	11	1,04	3,21
27	4bsq	0,7	-0,15	2,18
28	4l1a	5,39	0,73	4,06
29	4p6e	1290	3,11	4,76
30	4ge5	270	2,43	6,89

L'analyse par régression linéaire de ces 2 variables (logIC₅₀ et l'affinité) a permis d'obtenir la représentation graphique suivante avec un coefficient de corrélation de 0.71 (figure 25).

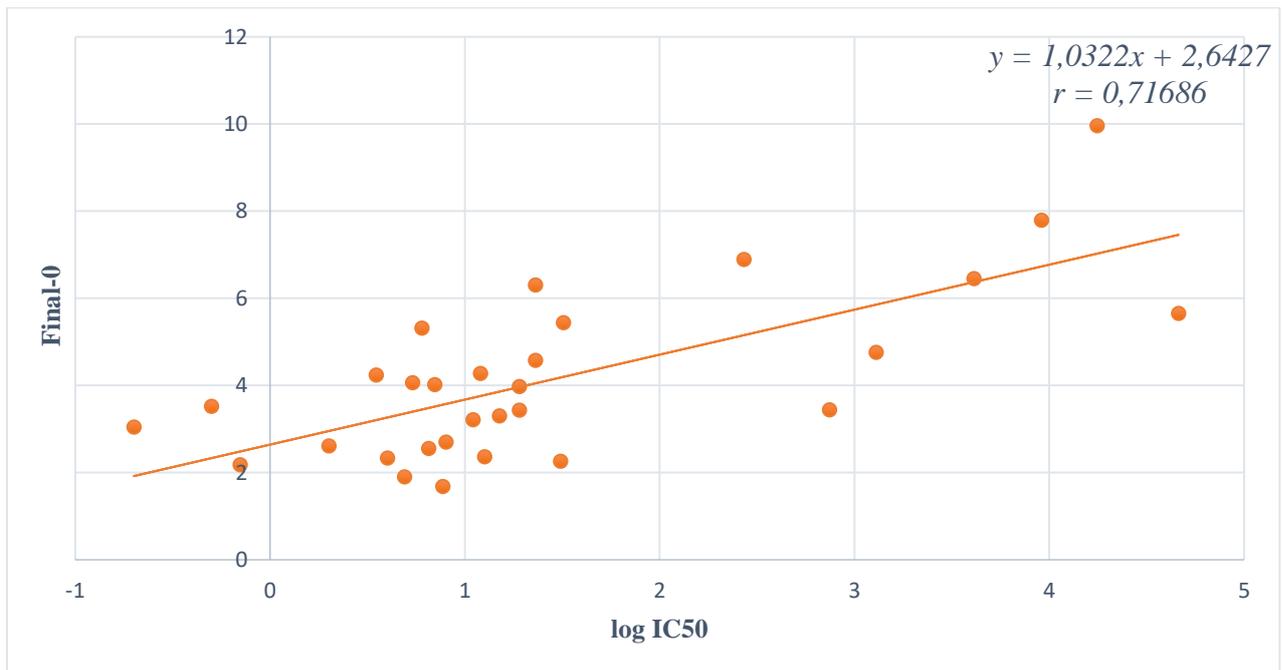


Figure 25 : Courbe de corrélation entre l'activité biologique (logIC₅₀) de 30 ligands et leurs scores obtenus par Surflex

Avec une valeur de 0.71 pour le coefficient de corrélation (r) nous pouvons dire qu'il existe une **forte** relation linéaire **positive** entre logIC₅₀ et l'affinité et que les deux variables évoluent dans le même sens.

Ce résultat est comparable à ceux obtenus par Chikhi A et Bensegueni A pour divers coefficients de corrélation $r = 0.83$, $r = 0.90$, $r = 0.84$ [81]

Conclusion

Les résultats de cette étude théorique de détermination des RMSD (68 %) et du coefficient de corrélation (0.71) confirment les résultats expérimentaux et montrent que le logiciel Surflex accomplit un travail raisonnable dans l'arrimage pour rechercher des inhibiteurs plus puissants de la cathepsine k, aidant amplement au processus de découverte de nouveaux médicaments potentiels.

2. Recherche de nouveaux inhibiteurs de la cathepsine k

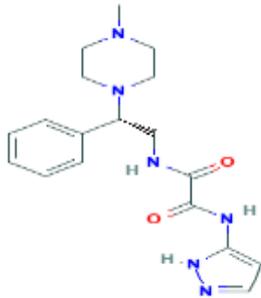
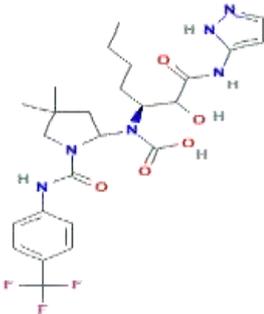
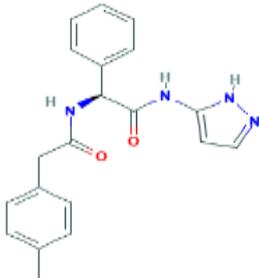
Cette étape cruciale de notre travail consiste à tester l'affinité d'un grand nombre de molécules vis-à-vis de notre cible et de la comparer à celle de notre ligand de référence (FSP) dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la cathepsine k.

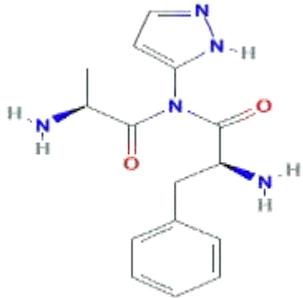
2.1 Le docking moléculaire des similaires

Nous avons réalisé le docking moléculaire avec Surflex de plusieurs composés similaires au FSP (162), téléchargés à partir de la banque PUBCHEM qui nous propose le nombre de 491 avec une similarité de 80%.

Les résultats montrent que seuls 4 similaires, parmi les 162, présentent une meilleure affinité (final-0) par rapport au ligand de référence (final-0 = 5.76). Ils sont présentés dans le tableau 5 suivant :

Tableau 5: Les scores des meilleurs similaires

	Nom du composé	N°CID	Affinité M-1	Structures des composés
A	N-[(2S)-2-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-phenylethyl]-N'-(1H-pyrazol-5-yl) oxamide	52897549	6.43	
B	[4,4-dimethyl-1-[[4-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoyl]pyrrolidin-2-yl]-[(3S)-2-hydroxy-1-oxo-1-(1H-pyrazol-5-ylamino)heptan-3-yl]carbamic acid	69707681	6.39	
C	(2S)-2-[[2-(4-methylphenyl)acetyl]amino]-2-phenyl-N-(1H-pyrazol-5-yl)acetamide	52910183	6.06	

D	(2S)-2-amino-N-[(2S)-2-aminopropanoyl]-3-phenyl-N-(1H-pyrazol-5-yl)propanamide	70360201	5.87	
----------	--	----------	------	---

3. La règle de cinq de Lipinski

Avant d'entamer l'étude des interactions entre l'enzyme (cathepsine k) et les 4 inhibiteurs, il est nécessaire d'évaluer les paramètres permettant leur validation comme inhibiteurs de la cathepsine k. Ces indices ont été calculés dans le cadre du code « Molinspiration » [80] qui permet de calculer les propriétés moléculaires importantes (logP, la surface polaire, le nombre de donneurs et accepteurs de liaison hydrogène...etc.) directement sur une page internet. Nous retrouvons les résultats dans le tableau 6 suivant :

Tableau 6: propriété pharmacocinétique de la règle de Lipinski pour des 4 inhibiteurs

	PM	Donneur de H	Accepteur de H	Liaison rotatable	Log P
52897549 (A)	356.43	3	8	6	0.23
52910183 (B)	348.41	3	6	6	2.56
69707681 (C)	554.57	5	11	10	3.71
7036201 (D)	301.35	5	7	5	-0.94

D'après le tableau, il ressort que les 4 similaires étudiés sont en conformité avec la règle de Lipinski. Cette règle dévoile que les composés ne validant pas au moins trois de ces critères ont de très fortes chances d'avoir des problèmes d'absorption ou de perméabilité.

Le PM des 3 composés (A, B et D) est en dessous de 500, par contre le

- Composé (C) a un PM légèrement supérieur à 500 (554.57) ; il a également un nombre d'accepteurs d'hydrogène (11) légèrement supérieur à 10.

- Le coefficient de partage de ces 4 composés est parfaitement dans les normes.
Donc les 4 composés peuvent avoir une activité biologique et une biodisponibilité orale conformément aux travaux de Lipinski et al (1997).

4. Les interactions

4.1 Les liaisons hydrogènes

- **Etude des interactions du composé A**

L'analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction de ce composé montre qu'il est bien placé dans le site actif de la protéine où il établit 4 liaisons hydrogène (figure 26). Ces liaisons sont regroupées dans le tableau 7.

Tableau 7: Les liaisons hydrogène établies par le composé A avec le site actif

Les liaisons Hydrogènes	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Distance en Å
01	C=O(N°2) - - - - - HNE2 du résidu GLN133	D = 1.98 Å
02	C=O(N°2) - - - - - H du groupement α amine (HN)) du résidu CYS139 .	D = 1.90 Å
03	C=O(N°1) - - - - - HNE1 de noyau indole du TRP298	D = 2.14 Å
04	NH(N°27) - - - - - O du groupement α carbonyle du résidu GLY134 .	D = 1.94 Å

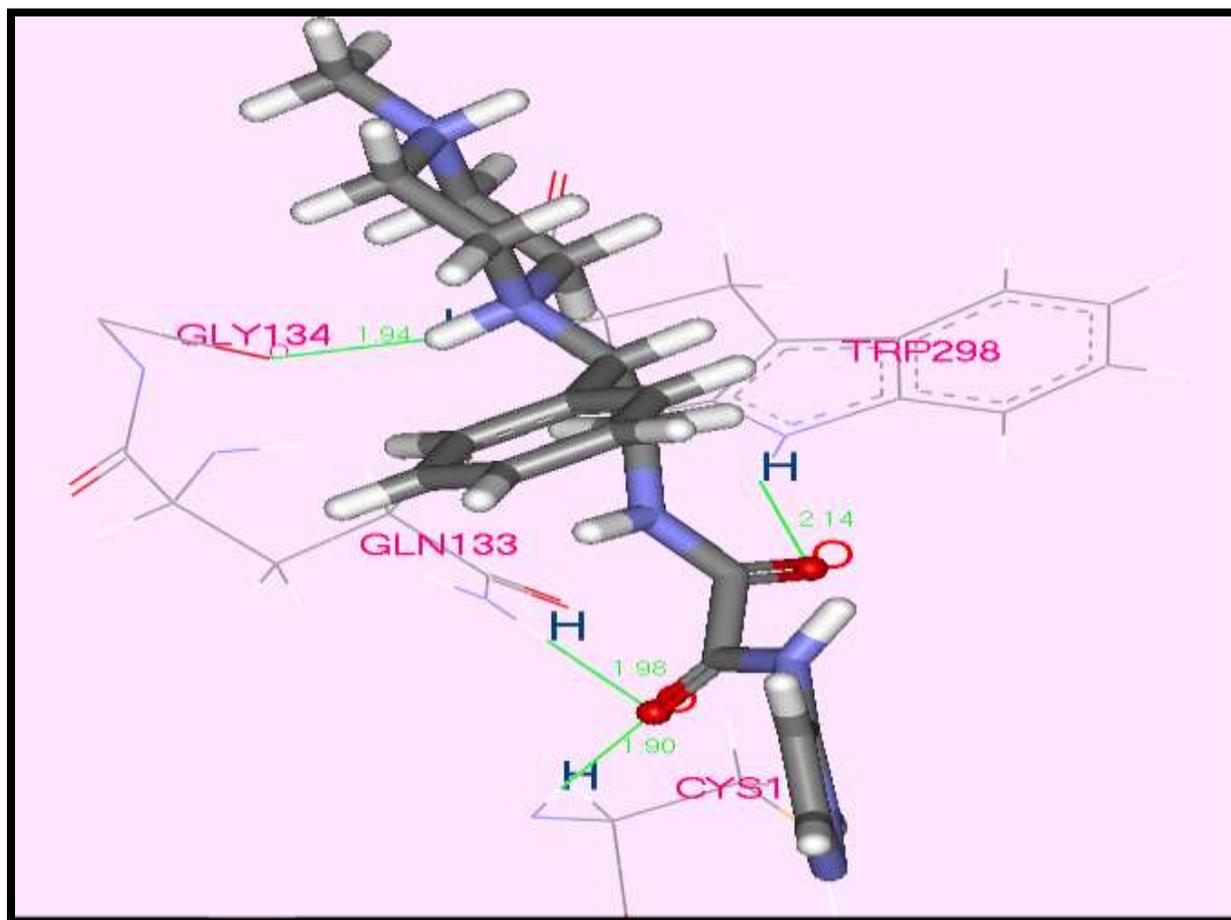


Figure 26 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé A avec le site actif de la cathepsine k

- **Etude des interactions du composé B**

L'analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction de ce composé montre qu'il est bien placé dans le site actif de la protéine où il établit 6 liaisons hydrogène (figure 27). Ces liaisons sont regroupées dans le tableau 8.

Tableau 8: Les liaisons hydrogène établies par le composé B avec le site actif.

Les liaisons Hydrogènes	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus di site actif	Distance en Å
01	C=O(N°7) - - - - NE2H du résidu de GLN133	D=2.88 Å
02	C=O(N°7) - - - - OH du groupement D carbonyle du résidu GLN133 .	D=3.19 Å
03	C=O(N°6) - - - - HNE2 du résidu de GLN133	D=2.13 Å

04	C=O(N°6) - - - - H du groupement α amine (HN)) du résidu de CYS139	D=2.41 Å
05	OH(N°40) - - - - SG du résidu de CYS139	D=2.45 Å
06	NH(N°42) - - - - O du groupement α carbonyle du résidu ASN275.	D=2.09 Å

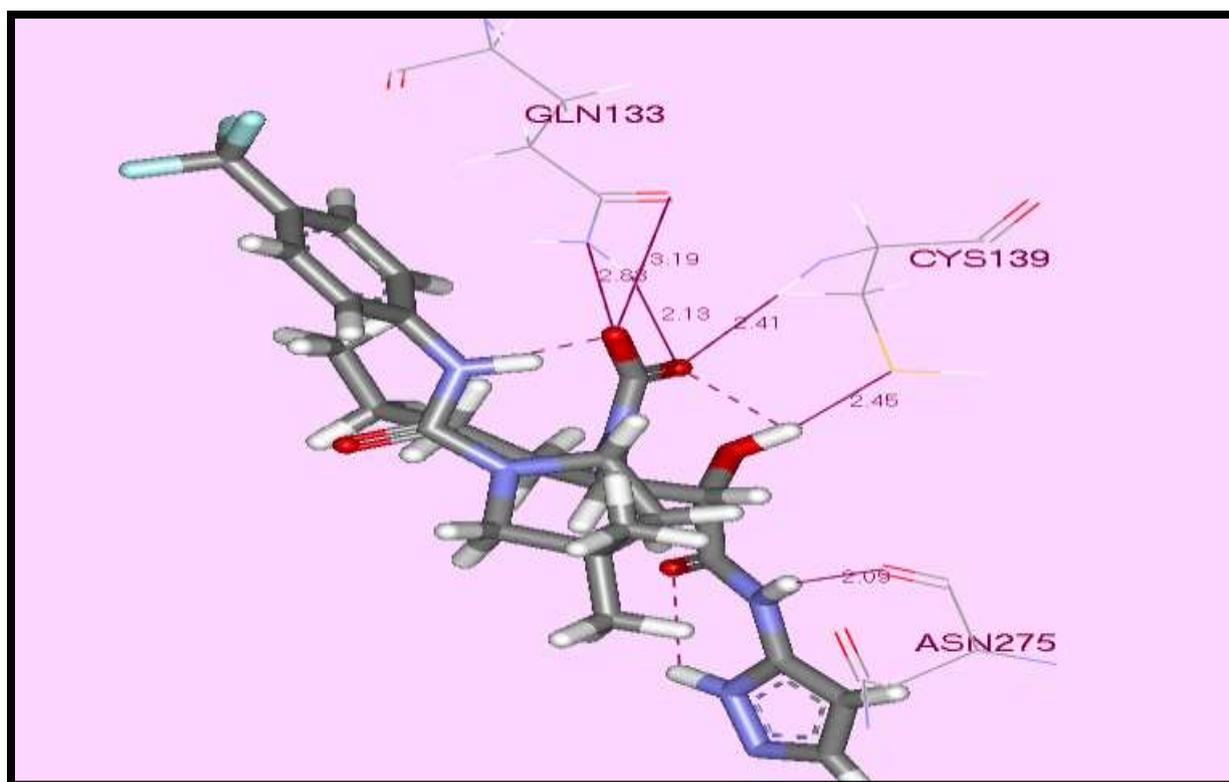


Figure 27: Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé B avec le site actif de la cathepsine k

- **Etude des interactions du composé C**

L'analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction de ce composé montre qu'il est placé dans le site actif de la protéine où il établit 3 liaisons hydrogène (figure 28). Ces liaisons sont regroupées dans le tableau 9.

Tableau 9: Les liaisons hydrogène établies par le composé C avec le site actif.

Les liaisons Hydrogènes	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus di site actif	Distance en Å
01	C=O(N°2) - - - - HNE1 de noyau indole du TRP298	D = 2.00Å

02	NH (N°28) - - - -O du groupement α carbonyle du résidu ASN275.	D = 1.79 Å
03	HN(N°6) - - - - H du groupement α amide du résidu GLY180.	D = 2.2 Å

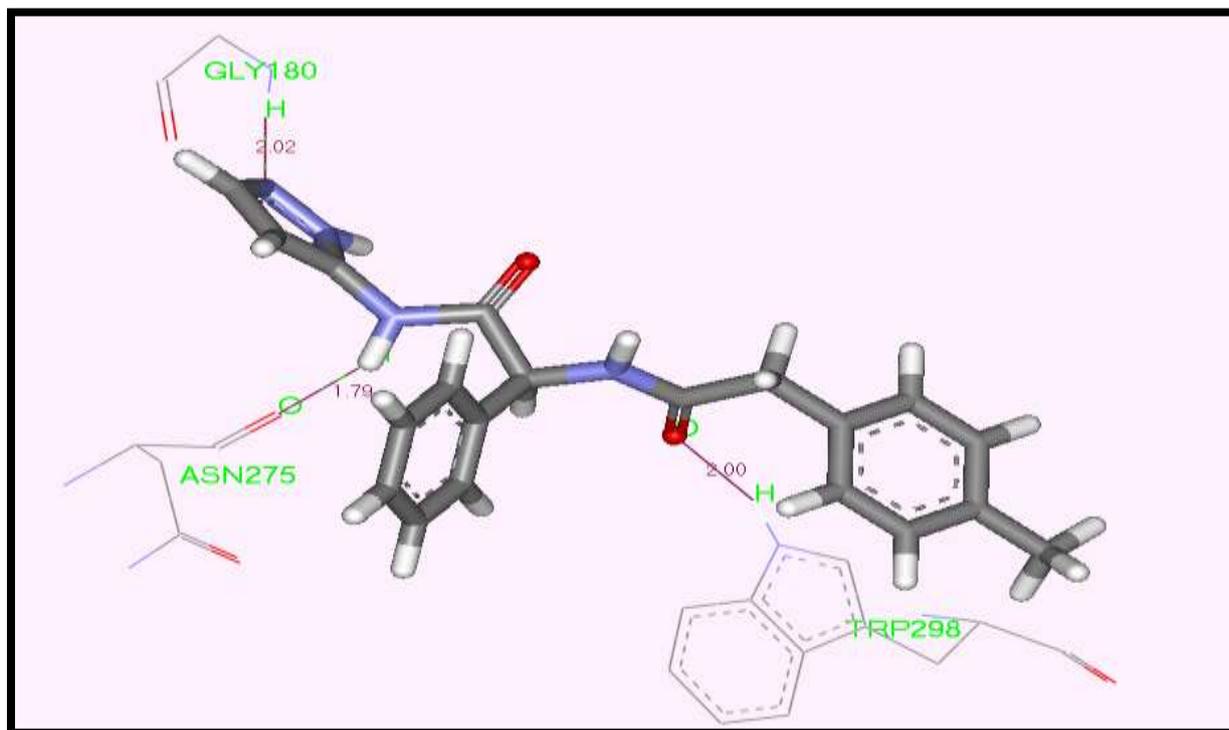


Figure 28: Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé L144 avec le site actif de la cathepsine k

- **Etude des interactions du composé D :**

L'analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction de ce composé montre qu'il est bien placé dans le site actif de la protéine où il établit 6 liaisons hydrogène (figure 29). Ces liaisons sont regroupées dans le tableau 10.

Tableau 10: Les liaisons hydrogène établies par le composé D avec le site actif.

Les liaisons Hydrogènes	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus di site actif	Distance en Å
01	NH(N°29) - - - - SG du résidu de CYS139	D = 2.46 Å
02	NH(N°27) - - - - O du groupement α carbonyle du résidu GLY137.	D = 2.34 Å
03	C=O(N°2) - - - - HNE2 du résidu de GLN133	D = 2.10Å

04	C=O(N°2) - - - - -H du groupement α amide du résidu CYS139 .	D = 2.02Å
05	C=O(N°1) - - - - -HNE1 de noyau indole du TRP298 .	D = 1.90 Å

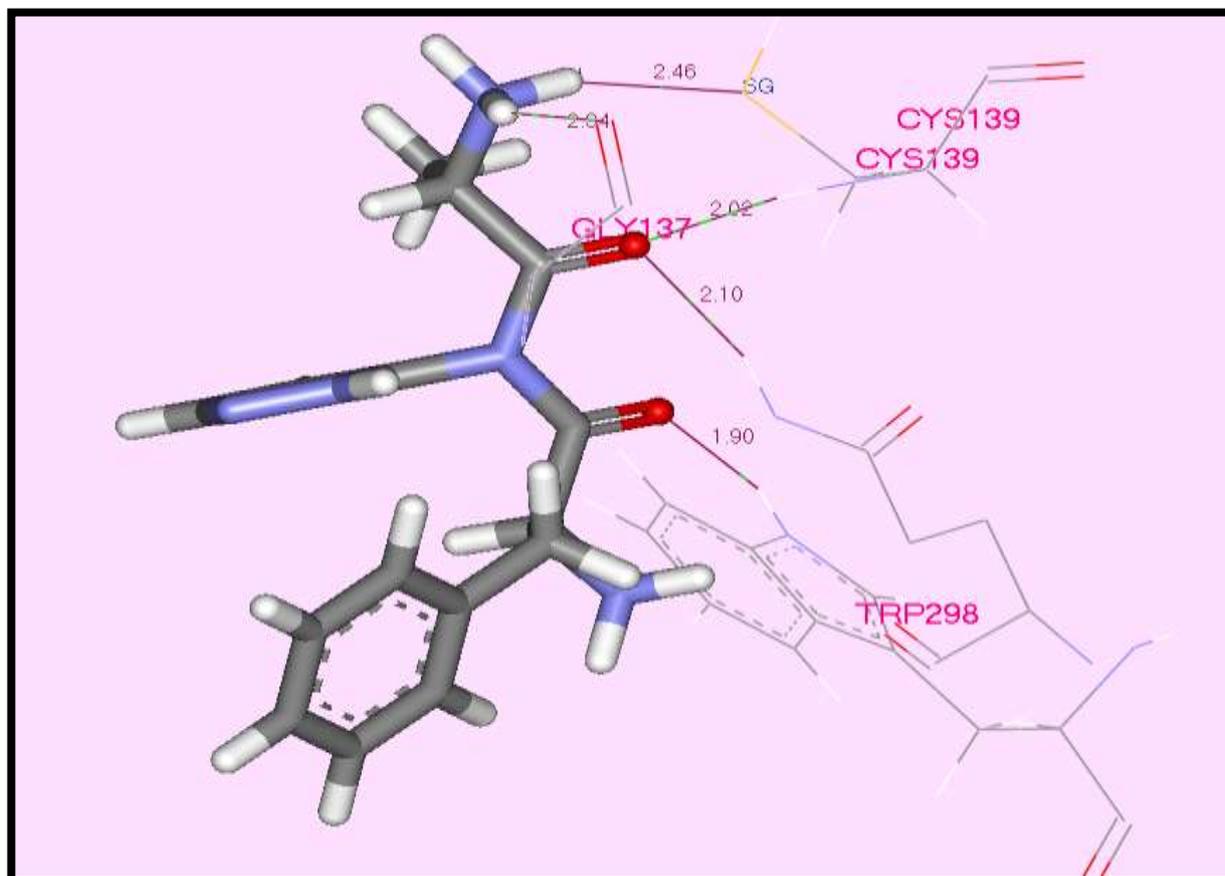


Figure 29 : Analyse visuelle par Viewerlite du mode d'interaction du composé D avec le site actif de la cathepsine k

Conclusion :

Les 4 composés étudiés ont donné des scores d'affinités légèrement meilleurs que le ligand de référence, et de ce fait, peuvent être considérés comme de nouveaux inhibiteurs potentiels de la cathepsine K. Il s'agit des composés A, B, C et D, sachant que le premier constitue le complexe protéine-ligand le plus stable ($\text{final-0} = 6.43$). Les 4 molécules possèdent des propriétés pharmacocinétiques intéressantes. Les liaisons hydrogène ne sont pas seules responsables dans l'interaction de la cathepsine k avec le ligand. Le rôle des interactions apolaires est aussi important dans l'explication du mode d'interaction

Conclusion

CONCLUSION

L'objectif primordial de notre travail est de rechercher et proposer par une méthode *in silico* de nouveaux inhibiteurs potentiels plus puissants de la cathepsine k, enzyme considérée comme une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'ostéoporose.

Pour cela, nous avons utilisé Surfex, un programme de docking moléculaire procédant par une méthode incrémentielle qui a été développé pour mettre au point des molécules à activité thérapeutique.

Nous avons d'abord testé la performance de ce programme selon deux critères :

- Le calcul des valeurs du RMSD entre la meilleure conformation du ligand prédit par Surfex et celle obtenue par cristallographie au niveau de la PDB, appliqué sur 130 complexes protéine-ligand téléchargés aléatoirement de la PDB. Ce test a été accompagné par une analyse visuelle des complexes formés.
- La détermination du coefficient de corrélation linéaire entre l'activité biologique expérimentale (IC_{50}) et les scores d'affinités de 30 ligands obtenus par docking moléculaire.

Les résultats du RMSD ont donné 68% des valeurs inférieures à 2Å. L'analyse visuelle par *viwerlite* montre qu'il existe une bonne superposition entre la géométrie des ligands calculée par Surfex et celle obtenue expérimentalement. Une valeur de r égale à 0.71 montre qu'il y a une bonne corrélation entre les IC_{50} expérimentales et les affinités calculées par le logiciel. Ces résultats positifs font preuve de la fiabilité et de la performance du programme Surfex.

La recherche de nouveaux agents thérapeutiques (inhibiteurs) potentiels plus puissants et plus sélectifs de la cathepsine k a été réalisée par docking moléculaire avec Surfex en utilisant 162 composés similaires au ligand de référence (le FSP) téléchargés à partir de la banque de données chimiques « PubChem ».

Parmi ces similaires, quatre composés A (CID 52897549), B (CID 69707681), C (CID 52910183) et D (CID 70360201) ont donné des scores d'affinités successifs de 6.43, 6.39, 6.06 et 5.87 M^{-1} légèrement supérieurs à celui du composé de départ (FSP) qui est de 5.76 M^{-1} et de ce fait, peuvent être considérés comme des nouveaux inhibiteurs potentiels de la cathepsine K. L'analyse visuelle et l'étude des différentes interactions de ces inhibiteurs avec la cathepsine K ont montré que ces derniers s'incrument bien dans le site actif de l'enzyme.

L'application de la règle de Lipinski a permis d'évaluer positivement leurs propriétés pharmacodynamiques ADME et d'affirmer que leur biodisponibilité par voie orale ne pose aucun problème.

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

*Les références
bibliographiques*

Les références bibliographiques

[1].**Corr.P.W .**,National Academy Press(US).,2009,Institute of Medicine(US)Committee on Conflict of Interest in Medical Research.

[2].**Guadalupe.grau A,Fuentes T,Guerra B,et al .**Exercise and bon mass in adults.Sports Med.2009 ;**39** :439-468.

[3].**Leslie, W.D., S. O'Donnell, C. Lagacé, P. Walsh, C. Bancej, S. Jean, K. Siminoski, S. Kaiser, D.L. Kendler, S. Jaglal.** « Osteoporosis Surveillance Expert Working Group. Population-based Canadian Hip Fracture Rates with International Comparisons » (en anglais seulement), Osteoporosis Int. 2010;**21**: p1317-1322.

[4].**La société Française d'ostéodensitométrie clinique** [En ligne] <http://www.sofoc.org>. Consultè le : [20-05-2018].

[5].**Richard D,Dejean C.** Prophylaxie de l'ostéoporose. Le moniteu hospitalier.2011;**234** : 17-27.

[6].**Hang .Korng .Ea .** 2018, Ronéotypeur : Laura Lebreton Roneolecteur : Céline Rabel, UE11 : Appareil Locomoteur (Biocell).

[7]. **Lafforgue**, 2013, AUPHAN Magali L3 Appareil : Physiologie du tissu osseux, 10p

[8]. **Agathe , Alison.** 2013. Remodelage osseux et signalisation intracellulaire.UE Physio

[9]. **Stavros .C, Manolagas, BIRTH et death** of bone celles : basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocrine reviews. 2000;**21**(2):115-137.

[10].**Heino T.J et al.** Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen. J Cell Biochem. 2002;**85**(1):185-97.

[11].**Swarthoutj.T et al.** Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. Gene. 2002;**282**(1-2):1-17.

[12].**KULAR.J et al.** An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. Clinical Biochemistry. **45**:863–873,2012.

[13].**ROBEY P., BOSKEY A.** Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 7th Ed., pp. 32–38, American Society of Bone and Mineral Research : s.n., 2008.

[14].**JILKA R.L et al.** Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH. 2007 ;**22** (10):1492-501.

[15]. **Clément.L,** Actualisation des traitements sur l'ostéoporose. Mise en place d'un programme d'éducation thérapeutique sur l'ostéoporose au CHR de Metz et de son suivi en milieu ambulatoire auprès des médecins traitants et des pharmaciens d'officine (projet SIOUX sous la direction de l'ARS Lorraine), UNIVERSITE DE LORRAINE, 2013,P25

[16].**Lobstein .JF.** Traité d'anatomie pathologique. F.G. Levrault; 1829, 590 p.

[17].**Herlund, E., Svedbom, A., Ivergard, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., & Kanis, J. A.** (2013). Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA).Arch Osteoporos, 8, 136.

[18].Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;**843** :1-129,

[19].**Barraud. P, Allain. F. H. T.** Solution structure of the two RNA recognition motifs of hnRNP A1 using segmental isotope labeling: how the relative orientation between RRM's influences the nucleic acid binding topology. Journal of biomolecular NMR .2013 ;**55**(1),119-138.

[20].[En ligne]. Consulté le :[22-03-2018],http://www.laboratoiredefrance.com/laboratoire_analyse/documentation/9c53a670e04aaaf04c314f682cc6615.pdf.

[21].**Differding . J, C, Stamper. B. P.** A Flexible Control Center Architecture for Support of Diverse Spaceflight Missions. In 2018 SpaceOps Conference .p2406

[22].**Cofer,** Collège Français des Enseignants en Rhumatologie 2010-2011, Item 282 : Spondylarthrite ankylosante, Support de Cours (Version PDF), Université Médicale Virtuelle Francophone.

[23]. **DENTANT .B**, L'ostéoporose masculine, un mal sous estimé : physiopathologie, diagnostic, suivi, recommandations thérapeutiques et place du pharmacien d'officine, Université Joseph Fourier Faculté de Pharmacie de Grenoble, 2010, P35.

[24]. **N. Vilayphiou**, Évaluation de la micro-architecture trabéculaire et des propriétés mécaniques osseuses in vivo chez l'humain par scanner périphérique à haute résolution : application clinique à l'ostéoporose.. Thèse présentée devant l'université de Lyon. 2010.

[25]. **Lawrence G Raisz**, Pathogenesis of osteoporosis : concepts, conflicts, and prospects. The Journal of Clinical Investigation. 2005;12(115):3318-3325.

[26]. **InteliHealth (Ed)**. Diseases et Conditions - Osteoporosis, Aetna Intellihealth. [En ligne] www.intelihealth.com. Consulté le : [27 février 2009].

[27]. **Saag, K. G., Agnusdei, D., Hans, D., Kohlmeier, L. A., Krohn, K. D., Leib, E. S., ... & Marcus, R.** Trabecular Bone Score in Patients With Chronic Glucocorticoid Therapy–Induced Osteoporosis Treated With Alendronate or Teriparatide. Arthritis & Rheumatology. 2016;68(9):2122-2128.

[28]. **Matthias Guillemot**, 2012, Ostéoporose, cours(pdf).

[29]. **Sumapa Chaiamnuay, Kenneth G Saag**. Postmenopausal osteoporosis. What have we learned since the introduction of bisphosphonates? Rev Endocr Metab Disord. 2006;7:101-112.

[30]. **Thierry Thomas, Véronique Breuil, Karine Briot**. Oral bisphosphonates in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Revue du Rhumatisme*. 2006; 73: 817-827.

[31]. **European Medicines Agency**. CHMP ASSESSMENT REPORT FOR PROLIA. Evaluation of Medicines for Human Use. 18 03 2010.

[32]. **Karine Briot, Florence Trémollières, Thierry Thomas, Christian Roux, GRIO**. How long should patients take medications for postmenopausal osteoporosis? *Revue du Rhumatisme*. 2007 ; 74 ;27-34.

[33]. **Rachel B. Wagman, Paul D. Miller**. The Use of Teriparatide and PTH(1-84) for the Treatment of Osteoporosis. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*. 4, 2006 ;4 : 277-290

[34]. Monographie du ranelate de strontium. Thériaque. [En ligne], consulté : [22 03 2018]. <http://www.theriaque.org/apps/monographie/index.php?type=SP&id=19499>.

- [35]. **Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A.** Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of botany*, 2014 ;**114**(6), 1375-1383.
- [36]. *Lopez-Otin C, Bond JS* Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* ,2008;**283**:30433–30437.
- [37]. **Denboba, A. D., Sayre, R. K., Wodon, Q. T., Elder, L. K., Rawlings, L. B., Lombardi, J.** 2014. Intensifier le développement de la petite enfance.
- [38]. **Chapman, J.** 2013. Fragmentation in archaeology: people, places and broken objects in the prehistory of south eastern Europe. Routledge.
- [39]. **COSTA A.G. et al.** Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2011 ; **7** :447–456.
- [40]. **Guncar G, Pungercic G, Klemencic I, Turk V, Turk D.** Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *The EMBO journal.* 1999;**18**(4):793-803.
- [41]. **Turk D, Turk B, Turk V.** Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochemical Society symposium.* 2003(**70**):15-30.
- [42]. **McQueney MS, Amegadzie BY, D'Alessio K, Hanning CR, McLaughlin MM, McNulty D, Carr SA, Ijames C, Kurdyla J, Jones CS.** Autocatalytic activation of humancathepsin K. *J Biol Chem* 1997;**272** (21): 13955-13960.
- [43]. **Voet.D et Voet.JG.** Biochimie, seconde édition. Édition De Boeck Université, Paris,France. 1995 ; 156 -268.
- [44]. **Stevens A, Lowe J.** Histologie humaine: De Boeck Supérieur; 1997.
- [45]. **Garnero P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al.** The Collagenolytic Activity of Cathepsin K Is Unique among Mammalian Proteinases. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;**273**(48):32347-52.
- [46]. **Atley LM, Mort JS, Lalumiere M, Eyre DR.** Proteolysis of human bone collagen by cathepsin K: characterization of the cleavage sites generating by cross-linked N-telopeptide neoepitope. *Bone.* 2000;**26**(3):241-7.

- [47]. **Kafienah W, Bromme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP.** Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *The Biochemical journal.* 1998;**331** (3):727-32.
- [48]. **Mort JS, Beaudry F, Theroux K, Emmott AA, Richard H, Fisher WD, et al.** Early cathepsin K degradation of type II collagen in vitro and in vivo in articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016;**24**(8):1461-9.
- [49]. **Li Z, Hou WS, Escalante-Torres CR, Gelb BD, Bromme D.** Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate. *The Journal of biological chemistry.* 2002;**277**(32):28669-76.
- [50]. **Hou WS, Li Z, Buttner FH, Bartnik E, Bromme D.** Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biological chemistry.* 2003;**384**(6):891-7.
- [51]. **Tepel C, Bromme D, Herzog V et Brix K.** Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *J Cell Sci* 2000 ; **113** (24): 4487-4498.
- [52]. **Haeckel C, Krueger S, Buehling F, Broemme D, Franke K, Schuetze A, et al.** Expression of cathepsin K in the human embryo and fetus. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 1999;**216**(2):89-95.
- [53]. **Kamiya T, Kobayashi Y, Kanaoka K, Nakashima T, Kato Y, Mizuno A, et al.** Fluorescence microscopic demonstration of cathepsin K activity as the major lysosomal cysteine proteinase in osteoclasts. *Journal of biochemistry.* 1998;**123**(4):752-9.
- [54]. **Bernstein HG, Bukowska A, Dobrowolny H, Bogerts B, Lendeckel U.** Cathepsin K and schizophrenia. *Synapse (New York, NY).* 2007;**61**(4):252-3.
- [56]. **Bromme D, Okamoto K, Wang BB et Biroc S.** Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem.* 1996 Jan 26;**271**(4):2126-32.
- [57]. **Lecaille F, Bromme D et Lalmanach G.** Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 2008 ; **90** (2): 208-226.

- [58]. **Rapa I, Volante M, Cappia S, Rosas R, Scagliotti GV, Papotti M.** Cathepsin K is selectively expressed in the stroma of lung adenocarcinoma but not in bronchioloalveolar carcinoma. A useful marker of invasive growth. *American journal of clinical pathology.* 2006;125(6):847-54.
- [59]. **Zhao Q, Jia Y, Xiao Y.** Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. *Biochemical and biophysical research communications.* 2009;380(4):721-3.
- [60]. **Troen BR.** The regulation of cathepsin K gene expression. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1068:165-72.
- [61]. **Corisdeo S, Gyda M, Zaidi M, Moonga BS, Troen BR.** New insights into the regulation of cathepsin K gene expression by osteoprotegerin ligand. *Biochemical and biophysical research communications.* 2001;285(2):335-9.
- [62]. **Romas E, Gillespie MT, Martin TJ.** Involvement of receptor activator of NFkappaB ligand and tumor necrosis factor-alpha in bone destruction in rheumatoid arthritis. *Bone.* 2002;30(2):340-6.
- [63]. **Komine M, Kukita A, Kukita T, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O.** Tumor necrosis factor-alpha cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone.* 2001;28(5):474-83.
- [64]. **Saneshige S, Mano H, Tezuka K, Kakudo S, Mori Y, Honda Y, et al.** Retinoic acid directly stimulates osteoclastic bone resorption and gene expression of cathepsin K/OC-2. *The Biochemical journal.* 1995;309(3):721-4.
- [65]. **Paul WE.** *Fundamental Immunology: Wolters Kluwer Health; 2012.*
- [66]. **Lecaille F, Bromme D, Lalmanach G.** Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie.* 2008;90(2):208-26)(rf : Troen BR. The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug news & perspectives.* 2004;17(1):19-28.
- [67]. Association Suisse contre l' OstéoporoseSchweizerische Vereinigung gegen die Osteoporose[En ligne]
<http://www.www.svgo.ch> consulté le : [1-04-2018].
- [68]. **RACHNER T, KHOSLA S, HOFBAUER L.** Osteoporosis : Now and the future. *Lancet* 2011 ; 377 : 1276-87

[69]. **RODAN SB, DUONG LT.** Cathepsine K : a new molecular target for osteoporosis. *IMBS BoneKEY*. 2008 ; 5 : 16-24

[70]. **Lee, C. K., Brown, C., Gralla, R. J., Hirsh, V., Thongprasert, S., Tsai, C. M., ... Osorio Sanchez, J. A.** (). Impact of EGFR inhibitor in non–small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2013 ;**105**(9):595-605.

[71]. **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 magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.

[72]. **C.R. Corbeil, P. Englebienne, N. Moitessier.** Docking Ligands Into Flexible And Solvated Macromolecules-1. Development And Validation Of Fitted 1.0. *Journal Of Chemical Informatic Modelling*, 2007 ; **47** : 435-449.

[73]. **YU J., ZHOU Y., TANAKA I., YAO M.** Un nouvel algorithme pour la détection des poches de protéines et des cavités avec une sonde sphère de roulement. *Bioinformatics*. 2010 ;**26** (1): 46 -52. ZANDI K., TEOH.

[74]. **DEMACHY I., PIQUEMAL J.P.** La surface d'énergie potentielle vue par les champs de forces. *Actualité Chimique*, 2014 ;**388**(389): 37-42.

[75]. **VESELOVSKY A.V., IVANOV Y.D., IVANOV A.S., ARCHAKOV A.I., LEWI P., JANSSEN P.** "Protein-protein interactions: mechanisms and modification by drugs". *Pub. Med*. 2002 ;**15**(6): 405-22.

[76]. **Fox W.** *Statistiques Sociales*. 3^{ème} édition. France: De Boeck. 1999. 374 p.

[77]. **Miteva M. A., Violas S., Montes M., Gomez D.,and. Villoutreix B. O.** FAF-Drugs: free ADME/tox filtering of compound collections. *Nucleic Acids Research*. 2006 ;**34** : 738–744.

[78]. **Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J.** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001 ; **46**: 3-26.

[79]. **Bensegueni A.** Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire

sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de doctorat en Biochimie Appliquée. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2007. 76p.

[80]. Calculation of Molecular Properties and Prediction of Bioactivity. [En ligne] <http://www.molinspiration.com>. Consulté le : [05/05/2018].

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

Annexes

Annexes 1

Tableau 11: Liste des résultats des 130 complexes utilisés pour tester le programme Surfex par RMSD et leur IC₅₀

N°	MOLECULE	OPTRMSD	RMSD heavy atom	Final-0 M ⁻¹
01	1atk	1.561	2.410	3.09
02	1au0	1.208	2.114	4.37
03	1au2		4.575	5.25
04	1au4	1.641	2.942	1.68
05	1ayu		1.648	4.86
06	1ayv	1.025	3.035	3.56
07	1ayw	1.811	3.035	2.47
08	1bgo		1.379	5.04
09	1bp4	0.520	2.104	2.61
10	1bqi	0.945	3.447	4.82
11	1ia1	1.256	2.847	9.97
12	1ia2		7.184	4.57
13	1ia3		1.263	2.70
14	1ia4		1.140	3.33
15	1ito		0.922	7.06
16	1kyn	0.962	3.350	6.45
17	1mem		4.469	1.39
18	1ms6	1.772	2.812	3.97
19	1nb3	1.006	2.989	0.98
20	1nb5		6.879	1.87
21	1tu6		1.107	5.76
22	1oir		4.537	5.44
23	1oit		0.661	6.36
24	1q6k		0.638	5.30
25	1qdq		1.652	5.77
26	1snk		1.495	6.35
27	1vsn		5.660	3.04
28	1u9v	1.027	2.554	5.31
29	1u9w		1.818	4.24
30	1u9x		1.844	4.02
31	1yk7		4.220	3.43
32	1yk8	0.894	3.051	2.67

33	1yt7		1.928	2.73
34	2ato	0.186	3.296	1.99
35	2aux		1.495	3.52
36	2auz	0.825	2.032	3.14
37	2bdl	1.751	3.807	3.30
38	2dc6	1.650	2.910	7.79
39	2dc7		1.440	6.34
40	2dc8	1.280	3.215	5.07
41	2dc9		1.972	6.20
42	2dca	0.260	2.154	6.30
43	2dcb	0.672	2.550	5.06
44	2dcc	1.479	2.794	5.65
45	2dcd	0.497	2.709	8.53
46	2djg		8.911	1.58
47	2f1g	0.993	2.216	4.45
48	2f7d	0.281	2.911	2.85
49	2ftd		1.850	6.85
50	2hhn		9.579	1.76
51	2r6n		1.206	4.76
52	1lz5		8.482	2.51
53	1lz6		10.238	2.41
54	2xu3		1.878	0.01
55	2xu4		0.889	4.33
56	2xu5	1.097	2.712	1.41
57	2yj2	1.377	2.643	2.00
58	2yj8		1.786	2.55
59	2yj9		1.913	2.43
60	2yjc		5.511	-1.05
61	3c9e	1.779	3.184	2.74
62	3h7d		7.580	1.90
63	3hha		4.371	2.36
64	3kw9	1.878	3.654	4.43
65	3kwb	0.808	3.537	4.00
66	3kwz	1.515	3.551	2.33
67	3kx1	1.111	2.729	5.01
68	3o0u		1.650	4.27
69	3o1g	1.107	3.875	3.12
70	3ovm	1.223	3.273	4.18
71	3ovx	0.619	2.032	2.26
72	3ovz		6.081	4.54
73	3ow3		4.832	3.44

74	3owh	0.088	2.739	2.15
75	3owx	0.834	2.515	9.96
76	3ox1	1.626	3.376	1.90
77	3ox2		4.490	3.64
78	3ox3		4.470	3.21
79	4cdc		9.512	1.01
80	5tdi		1.443	5.64
81	4bs5		1.572	4.11
82	4bsq	1.919	3.599	2.18
83	4ci9		1.229	1.18
84	4cia	1.568	3.033	5.94
85	4cib		1.904	4.78
86	4dmx		0.999	5.04
87	4dmy		4.275	3.34
88	4l1a	1.787	3.883	4.06
89	4n79		8.509	1.74
90	4obz		4.249	2.17
91	4oc6		5.598	1.83
92	4od9	1.446	3.535	2.24
93	4p6e	0.059	2.164	4.76
94	4x6h	0.098	2.019	3.80
95	4x6i	0.568	3.480	3.69
96	4x6j		1.175	3.31
97	4yv8		7.549	3.87
98	5j94	1.274	3.094	5.46
99	5jh3		6.429	2.37
100	5t6u		5.372	0.59
101	2yjb		1.825	1.95
102	4ge2		4.302	2.23
103	4ge5		4.513	6.89
104	3qch		0.895	4.19
105	3qci		4.175	2.16
106	4cdd		8.782	2.08
107	1au8	1.584	3.391	3.44
108	1cgh		0.770	4.37
109	2fq9	1.731	3.057	4.09
110	2qtb	0.918	2.658	2.50
111	2fjp	1.580	2.619	1.69
112	2hha		1.076	6.46
113	1qab		10.459	-3.73
114	2yig		1.408	8.30
115	3kec		1.582	6.73

116	3kwf		3.896	3.56
117	3ljz	1.076	2.563	5.94
118	3lnk		0.654	10.13
119	3vjl	1.515	2.650	3.43
120	3wv1		5.777	4.19
121	3wv3		3.182	5.27
122	4bp9		4.272	2.36
123	4ge2		4.302	2.23
124	4lgq		11.439	1.96
125	4mpw		4.425	8.17
126	4pnz		0.916	4.90
127	4y2j		1.479	6.08
128	5cuh		0.416	6.04
129	5f37		1.982	5.47
130	5jh3		6.429	2.37

Annexes 2

Liste des similaires

```

C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sin2\L107: 86 atoms, 17 rot: [Time 31: srch 1 aIn 10 m+c 13 pol 7] [Ncn 112: 3 63 3243 2813]
[log-0: -66.36 crash -68.78 polar 0.69 ]
[log-1: -66.36 crash -68.78 polar 0.69 ]
[log-2: -66.36 crash -68.78 polar 0.69 ]
[log-3: -66.48 crash -68.20 polar 1.39 ]
[log-4: -66.54 crash -68.03 polar 1.21 ]
[log-5: -66.56 crash -67.95 polar 1.35 ]
[log-6: -66.65 crash -67.98 polar 1.21 ]
[log-7: -66.66 crash -68.71 polar 0.51 ]
[log-8: -66.78 crash -68.29 polar 1.30 ]
[log-9: -66.80 crash -68.09 polar 1.28 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sin2\L108: 60 atoms, 12 rot: [Time 17: srch 0 aIn 7 m+c 5 pol 5] [Ncn 112: 3 63 3243 2813]
[log-10: 3.26 crash -3.25 polar 2.18 ]
[log-11: 2.02 crash -3.08 polar 2.00 ]
[log-12: 1.52 crash -1.72 polar 3.24 ]
[log-13: 1.45 crash -3.04 polar 2.48 ]
[log-14: 1.33 crash -1.99 polar 1.15 ]
[log-15: 1.28 crash -1.72 polar 3.30 ]
[log-16: 1.12 crash -1.83 polar 3.12 ]
[log-17: 1.03 crash -2.94 polar 2.18 ]
[log-18: 0.98 crash -1.96 polar 1.99 ]
[log-19: 0.96 crash -1.20 polar 1.41 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sin2\L109: 60 atoms, 12 rot: [Time 18: srch 0 aIn 7 m+c 5 pol 6] [Ncn 113: 3 64 3264 2814]
[log-20: 3.29 crash -2.05 polar 1.65 ]
[log-21: 2.40 crash -1.50 polar 0.73 ]
[log-22: 2.35 crash -3.63 polar 2.31 ]
[log-23: 2.32 crash -2.33 polar 1.83 ]
[log-24: 2.30 crash -1.94 polar 1.11 ]
[log-25: 2.19 crash -1.47 polar 1.75 ]
[log-26: 2.10 crash -3.67 polar 1.55 ]
[log-27: 1.82 crash -1.72 polar 0.01 ]
[log-28: 1.50 crash -3.66 polar 1.40 ]
[log-29: 1.47 crash -1.25 polar 0.92 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sin2\L110: 64 atoms, 12 rot: [Time 18: srch 1 aIn 4 m+c 7 pol 6] [Ncn 94: 3 45 2865 2795]
[log-30: 3.68 crash -2.89 polar 1.12 ]
[log-31: 2.94 crash -1.78 polar 2.06 ]
[log-32: 2.72 crash -3.02 polar 2.30 ]

```

```

C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L110: 64 atoms, 12 rot: [Time 18: srch 1 aIn 4 m+c 7 pol 6] [Ncn 94: 3 45 2865 2795]
[log-30: 3.68 crash -2.89 polar 1.12 ]
[log-31: 2.94 crash -1.78 polar 2.06 ]
[log-32: 2.72 crash -3.02 polar 2.30 ]
[log-33: 2.71 crash -1.58 polar 1.87 ]
[log-34: 2.56 crash -3.99 polar 1.86 ]
[log-35: 2.30 crash -3.00 polar 1.91 ]
[log-36: 1.99 crash -2.94 polar 2.33 ]
[log-37: 1.98 crash -1.44 polar 0.00 ]
[log-38: 1.92 crash -3.03 polar 0.84 ]
[log-39: 1.88 crash -2.88 polar 0.99 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L111: 31 atoms, 4 rot: [Time 3: srch 0 aIn 2 m+c 0 pol 1] [Ncn 73: 3 24 2424 2074]
[log-40: 2.43 crash -1.02 polar 2.65 ]
[log-41: 2.40 crash -1.04 polar 2.67 ]
[log-42: 1.99 crash -0.55 polar 1.17 ]
[log-43: 1.89 crash -1.41 polar 1.35 ]
[log-44: 1.88 crash -1.12 polar 2.24 ]
[log-45: 1.47 crash -0.57 polar 1.13 ]
[log-46: 1.36 crash -1.15 polar 1.25 ]
[log-47: 1.32 crash -0.84 polar 2.04 ]
[log-48: 1.03 crash -0.57 polar 0.70 ]
[log-49: 0.92 crash -1.20 polar 0.89 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L112: 43 atoms, 6 rot: [Time 7: srch 0 aIn 3 m+c 1 pol 3] [Ncn 93: 3 44 2844 2594]
[log-50: 1.86 crash -1.62 polar 1.41 ]
[log-51: 1.73 crash -1.51 polar 1.29 ]
[log-52: 1.72 crash -2.60 polar 2.43 ]
[log-53: 1.62 crash -1.50 polar 2.46 ]
[log-54: 1.57 crash -1.51 polar 2.61 ]
[log-55: 1.56 crash -1.51 polar 2.61 ]
[log-56: 1.14 crash -2.07 polar 0.00 ]
[log-57: 1.04 crash -2.45 polar 0.00 ]
[log-58: 1.03 crash -1.35 polar 2.28 ]
[log-59: 1.03 crash -1.35 polar 2.28 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L113: 50 atoms, 10 rot: [Time 12: srch 0 aIn 4 m+c 3 pol 5] [Ncn 93: 3 44 2844 2594]
[log-60: 5.52 crash -1.61 polar 2.48 ]
[log-61: 5.08 crash -3.37 polar 2.07 ]
[log-62: 4.92 crash -1.18 polar 2.51 ]

[log-469: 2.86 crash -2.60 polar 3.28 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L154: 71 atoms, 14 rot: [Time 28: srch 0 aIn 7 m+c 13 pol 8] [Ncn 105: 3 56 3096 3006]
[log-470: 6.39 crash -3.52 polar 5.66 ]
[log-471: 5.89 crash -3.26 polar 5.90 ]
[log-472: 5.23 crash -3.29 polar 5.73 ]
[log-473: 5.12 crash -3.65 polar 5.32 ]
[log-474: 5.07 crash -2.87 polar 5.61 ]
[log-475: 4.31 crash -2.60 polar 5.44 ]
[log-476: 4.02 crash -3.57 polar 5.50 ]
[log-477: 4.01 crash -2.40 polar 2.25 ]
[log-478: 3.36 crash -2.53 polar 5.47 ]
[log-479: 2.84 crash -3.21 polar 4.95 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L155: 67 atoms, 14 rot: [Time 30: srch 0 aIn 9 m+c 10 pol 11] [Ncn 122: 3 73 3453 2823]
[log-480: 4.33 crash -3.78 polar 4.47 ]
[log-481: 4.33 crash -2.87 polar 3.32 ]
[log-482: 3.59 crash -3.97 polar 5.89 ]
[log-483: 3.59 crash -3.33 polar 4.80 ]
[log-484: 3.50 crash -4.45 polar 5.02 ]
[log-485: 3.28 crash -4.33 polar 4.79 ]
[log-486: 3.23 crash -4.46 polar 3.20 ]
[log-487: 3.10 crash -3.46 polar 4.96 ]
[log-488: 3.02 crash -4.31 polar 5.86 ]
[log-489: 2.79 crash -3.57 polar 4.97 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L156: 72 atoms, 14 rot: [Time 29: srch 0 aIn 9 m+c 12 pol 8] [Ncn 123: 3 74 3474 3024]
[log-490: 1.00 crash -4.14 polar 4.12 ]
[log-491: 0.83 crash -4.43 polar 4.19 ]
[log-492: 0.03 crash -5.22 polar 3.56 ]
[log-493: 0.00 crash -4.61 polar 3.82 ]
[log-494: -0.05 crash -4.26 polar 3.75 ]
[log-495: -0.06 crash -4.41 polar 3.75 ]
[log-496: -0.23 crash -4.12 polar 0.92 ]
[log-497: -0.24 crash -4.06 polar 0.92 ]
[log-498: -0.48 crash -3.14 polar 1.52 ]
[log-499: -0.55 crash -5.01 polar 2.81 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L157: 72 atoms, 14 rot: [Time 32: srch 1 aIn 8 m+c 12 pol 11] [Ncn 123: 3 74 3474 3024]
[log-500: 2.37 crash -4.02 polar 2.62 ]
[log-501: 2.18 crash -1.99 polar 2.54 ]

```

```

[log-771: 1.39 crash -1.71 polar 2.14 ]
[log-772: 1.35 crash -1.63 polar 3.25 ]
[log-773: 1.24 crash -1.63 polar 2.10 ]
[log-774: 1.13 crash -1.48 polar 2.97 ]
[log-775: 1.06 crash -1.79 polar 2.13 ]
[log-776: 1.01 crash -1.42 polar 2.97 ]
[log-777: 0.97 crash -1.32 polar 2.66 ]
[log-778: 0.92 crash -1.71 polar 1.00 ]
[log-779: 0.75 crash -2.62 polar 2.85 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L185: 43 atoms, 7 rot: [Time 7: srch 0 aln 3 m+c 2 pol 2] [Ncn 88: 3 39 2739 2589]
[log-780: 5.87 crash -1.44 polar 4.95 ]
[log-781: 5.79 crash -1.48 polar 4.99 ]
[log-782: 5.78 crash -1.51 polar 4.99 ]
[log-783: 4.79 crash -2.16 polar 4.95 ]
[log-784: 4.79 crash -2.19 polar 4.95 ]
[log-785: 3.82 crash -1.59 polar 3.07 ]
[log-786: 3.76 crash -1.68 polar 2.86 ]
[log-787: 2.99 crash -2.90 polar 4.94 ]
[log-788: 2.65 crash -2.87 polar 3.95 ]
[log-789: 1.75 crash -1.23 polar 2.11 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L186: 55 atoms, 7 rot: [Time 9: srch 0 aln 2 m+c 4 pol 3] [Ncn 77: 3 28 2508 2778]
[log-790: 2.34 crash -1.81 polar 2.22 ]
[log-791: 2.32 crash -2.48 polar 2.34 ]
[log-792: 2.16 crash -3.12 polar 2.47 ]
[log-793: 2.14 crash -2.55 polar 2.33 ]
[log-794: 1.70 crash -2.99 polar 1.62 ]
[log-795: 1.69 crash -2.89 polar 2.31 ]
[log-796: 1.68 crash -2.14 polar 2.75 ]
[log-797: 1.63 crash -1.82 polar 2.13 ]
[log-798: 1.12 crash -2.01 polar 0.07 ]
[log-799: 1.04 crash -2.21 polar 2.15 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L187: 57 atoms, 9 rot: [Time 11: srch 0 aln 3 m+c 4 pol 4] [Ncn 80: 3 31 2571 2781]
[log-800: 3.07 crash -1.13 polar 1.02 ]
[log-801: 2.97 crash -1.63 polar 1.00 ]
[log-802: 2.53 crash -2.25 polar 1.46 ]
[log-803: 2.48 crash -1.53 polar 1.64 ]
[log-804: 2.29 crash -1.54 polar 1.13 ]

```

```

[log-731: 3.24 crash -1.18 polar 4.65 ]
[log-732: 2.89 crash -1.28 polar 3.58 ]
[log-733: 2.42 crash -1.40 polar 2.27 ]
[log-734: 2.34 crash -2.45 polar 3.35 ]
[log-735: 2.20 crash -2.09 polar 3.62 ]
[log-736: 2.09 crash -1.32 polar 1.29 ]
[log-737: 1.99 crash -2.26 polar 2.73 ]
[log-738: 0.90 crash -1.40 polar 0.02 ]
[log-739: 0.88 crash -3.84 polar 2.75 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L181: 62 atoms, 10 rot: [Time 16: srch 0 aln 5 m+c 8 pol 3] [Ncn 92: 3 43 2823 2793]
[log-740: 1.41 crash -1.33 polar 3.37 ]
[log-741: 0.68 crash -1.84 polar 3.32 ]
[log-742: 0.21 crash -1.36 polar 3.25 ]
[log-743: 0.15 crash -1.42 polar 3.26 ]
[log-744: 0.01 crash -2.05 polar 3.11 ]
[log-745: -0.02 crash -1.85 polar 3.24 ]
[log-746: -0.19 crash -1.71 polar 3.16 ]
[log-747: -0.53 crash -1.61 polar 0.00 ]
[log-748: -1.01 crash -1.49 polar 1.70 ]
[log-749: -1.11 crash -1.56 polar 1.87 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L182: 57 atoms, 10 rot: [Time 15: srch 0 aln 4 m+c 7 pol 4] [Ncn 92: 3 43 2823 2793]
[log-750: 1.73 crash -3.50 polar 2.26 ]
[log-751: 1.55 crash -1.78 polar 0.07 ]
[log-752: 1.16 crash -2.52 polar 0.00 ]
[log-753: 1.11 crash -2.03 polar 1.53 ]
[log-754: 0.97 crash -2.10 polar 1.43 ]
[log-755: 0.76 crash -2.48 polar 0.01 ]
[log-756: 0.69 crash -2.16 polar 1.14 ]
[log-757: 0.27 crash -2.76 polar 2.26 ]
[log-758: 0.27 crash -3.61 polar 1.40 ]
[log-759: 0.25 crash -1.75 polar 0.00 ]
C:\Users\LINDA\Desktop\similaire 2\sim2\L183: 57 atoms, 10 rot: [Time 14: srch 0 aln 4 m+c 7 pol 3] [Ncn 92: 3 43 2823 2793]
[log-760: 2.82 crash -1.25 polar 1.68 ]
[log-761: 1.28 crash -1.39 polar 1.21 ]
[log-762: 1.08 crash -1.56 polar 1.29 ]
[log-763: 0.92 crash -2.74 polar 1.23 ]
[log-764: 0.87 crash -2.88 polar 1.25 ]

```

Thème : ETUDE THEORIQUE DU MECANISME D'ACTION DES INHIBITEURS DE LA CATHEPSINE K, ENZYME INTERVENANT DANS L'OSTEOPOROSEMémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en **Biochimie Appliquée**.**Résumé :**

Avec le développement des outils informatiques pendant ces 20 dernières années, la modélisation moléculaire et plus précisément le docking moléculaire représentent des techniques performantes très utiles qui étudient l'interaction potentielle entre un ligand et sa cible protéique pour améliorer le processus de découverte d'un nouveau médicament et réduire les essais expérimentaux.

Le programme Surflex nous a permis d'atteindre l'objectif de ce modeste travail : la recherche *in silico* de nouveaux inhibiteurs plus puissants de la cathepsine k, une enzyme cible pour le traitement de l'ostéoporose.

La performance de ce programme a été prouvée par le bon pourcentage des valeurs du RMSD ($68\% \leq 2\text{Å}$) et du coefficient de corrélation se rapprochant de 1 (0.71).

Le docking a été réalisé sur 162 similaires proposés par la banque de données PubChem de l'inhibiteur de référence (le FSP) dont l'affinité est : 5.76 M^{-1} .

L'évaluation de leurs affinités vis-à-vis de notre cible a permis de sélectionner les 4 meilleurs composés **A** (CID 52897549), **B** (CID 69707681), **C** (CID 52910183) et **D** (CID 70360201). Leurs affinités respectives sont : 6.43, 6.39, 6.06 et 5.87 M^{-1} .

L'application de la règle de Lipinski a permis d'évaluer positivement leurs propriétés pharmacodynamiques ADME et l'analyse visuelle des interactions responsables de la stabilité de ces composés dans le site actif de l'enzyme nous permettent de les proposer comme de nouveaux inhibiteurs potentiels plus puissants de la cathepsine k.

Ces résultats théoriques doivent être cependant confirmés par des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo*.

Mots clés : docking moléculaire, Surflex, ostéoporose, cathépsine k, Lipinski.**Laboratoire de recherche : Biochimie Appliquée**

Jury d'évaluation :

Président du jury : BENSEGUENI A

Pr. Université Frères Mentouri Constantine

Rapporteur : CHIKHI A.

Pr. Université des Frères Mentouri-Constantine.

Examineur : MOKRANI E.H.

M.A.A Université des Frères Mentouri-Constantine

Date de soutenance : 03/07/2018