



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

Université des Frères Mentouri Constantine1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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:

CARACTERISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA RIPK1, ENZYME DE LA NÉCROPTOSE

Présenté et soutenu par : - BRAHMI AMINA

Soutenu le : 08 /07 /2019

- BOUGUERN ABIR

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr BENSEGUENI A

Pr. Université des Frères Mentouri Constantine1

Rapporteur : Mr CHIKHI A

Pr. Université des Frères Mentouri Constantine1

Examinatrice : Mme TENIOU S

M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine1

Année universitaire

2018 -2019

Résumé

Le but de ce travail était de trouver un composé à meilleur effet inhibiteur que le composé « **1HX** » qui agit sur la cible **RIP1 Kinase**, enzyme impliquée dans la nécroptose.

En premier lieu, on a réalisé une comparaison de deux logiciels « **Autodock** » et « **Surflex** » en utilisant **300** complexes. Nous avons obtenu les pourcentages de valeurs positives de **RMSD** suivants : **56.67%** pour Autodock et **62.67%** pour Surflex. Et pour confirmation, ce test a été suivi d'une analyse visuelle de la superposition des ligands de référence et ceux obtenus par docking moléculaire pour les deux logiciels.

Ensuite, nous avons déterminé le coefficient de corrélation linéaire « **r** » en utilisant **30** complexes. Les valeurs obtenues sont de **0.6585** pour Autodock et de **-0.7358** pour Surflex. Ainsi, nous avons poursuivi notre étude par Surflex en raison de sa performance prouvée par le bon pourcentage de valeurs positives du RMSD (**62.67%**) et un bon coefficient de corrélation (**r = - 0.7358**).

Un criblage virtuel a été effectué sur **311** similaires téléchargés de la Pubchem de notre ligand de référence **1HX** dont l'affinité est : **5.06 M⁻¹**. Les résultats de cette opération ont permis de sélectionner les **4** meilleurs composés suivants : **A, B, C et D**. avec des affinités supérieures à **7 M⁻¹**.

Des substitutions ont été apportées à la structure de **1HX**, notre ligand de référence, dans le but d'améliorer son action inhibitrice. Nous avons effectué 2 types de substitution :

La mono substitution a concerné **10** composés et a permis une amélioration de l'affinité de sept d'entre eux : **1, 2, 3, 6, 7, 8 et 9**. Alors que la bi substitution, concernant **11** composés, a amélioré neuf d'entre eux qui sont : **11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20 et 21**.

L'analyse visuelle des interactions n'a concerné que les composés **A, B, C et D et 1, 11 et 14** ayant une affinité supérieure à **7 M⁻¹**.

Une évaluation positive des propriétés pharmacologiques par le logiciel « **DruLiTo** » a déduit que nos composés peuvent agir comme médicament administré par voie orale.

Il est cependant nécessaire de vérifier et confirmer ces résultats théoriques par des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo*.

Mots clés : Docking, surflex , autodock , nécroptose , RIPK1, DruLiTo, substitution .

Abstract

The goal of this work was to find a compound with better inhibitory effect than the compound "1HX" which acts on the target **RIP1 Kinase**, enzyme involved in necroptosis.

First, a comparison of two "Autodock" and "Surflex" software was done using **300** complexes. We obtained the following percentages of positive RMSD values: **56.67%** for Autodock and **62.67%** for Surflex. And for confirmation, this test was followed by a visual analysis of the superposition of reference ligands and those obtained by molecular docking for both software. Next, we determined the linear correlation coefficient "r" using **30** complexes. The values obtained are **0.6585** for Autodock and **-0.7358** for Surflex. Thus, we continued our study with Surflex because of its performance proved by the good percentage of positive values of the RMSD (**62.67%**) and a good coefficient of correlation (**r = - 0.7358**).

Virtual screening was performed on **311** similars downloaded from Pubchem of our **1HX** reference ligand whose affinity is: **5.06 M⁻¹**. The results of this operation made it possible to select the **4** best compounds: **A, B, C** and **D**. with affinities higher than **7 M⁻¹**.

Substitutions were made to the structure of **1HX**, our reference ligand, in order to improve its inhibitory action. We performed **2** types of substitution:

The mono substitution concerned **10** compounds and allowed an improvement of the affinity of seven of them: **1, 2, 3, 6, 7, 8** and **9**. While the bi substitution, concerning **11** compounds, improved nine of them which are: **11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20** and **21**.

The visual analysis of the interactions concerned only compounds **A, B, C** and **D** and **1, 11** and **14** having an affinity greater than **7 M⁻¹**.

A positive evaluation of the pharmacological properties by the "DruLiTo" software has deduced that our compounds can act as an orally administered drug.

However, it is necessary to verify and confirm these theoretical results by experimental studies in vitro and / or in vivo.

Key words: Docking, surflex, autodock, necroptosis, RIPK1, DruLiTo, substitution.

المخلص

الهدف من هذا العمل هو إيجاد مركب له تأثير مثبط أكثر فعالية من المركب "1HX" الذي يعمل على تثبيط الإنزيم RIPk1 ، المسؤول عن الموت الخلوي .

تم إجراء مقارنة بين برنامجي "autodock" و "surflex". باستخدام 300 مركب، حصلنا على النسب المئوية لقيم RMSD التي تقل عن أو تساوي 2Å حيث تحصلنا على النسبة: 56.67% بالنسبة لـ Autodock و على 62.67% بالنسبة لـ Surflex . و للتأكيد ، أعقب هذا الاختبار تحليل بصري لكلا البرنامجين.

بعد ذلك، تم تحديد معامل الارتباط الخطي "r" باستخدام 30 مجمعا. قيمة "r" التي حصل عليها Autodock هي: 0.6585. وبواسطة Surflex تحصلنا على $r = - 0.7358$.

تم إثبات أداء برنامج Surflex من خلال النسبة المئوية الجيدة لقيم RMSD (62.67%) ومعامل الارتباط يقترب من -1 ($r = - 0.7358$)

تم إجراء فحص افتراضي على 311 جزيئة التي تم تنزيلها من قاعدة البيانات Pubchem مشابهة للمثبط المرجعي 1HX بحصيلة تقدر بـ: $5.06 M^{-1}$. حيث سمحت نتائج هذه العملية باختيار أفضل أربع مركبات : A ، B ، C ، D بحصيلة أكبر من $7 M^{-1}$.

تم إجراء نوعين من الاستبدال للهيكل ثلاثي الأبعاد « 1HX » :

يتعلق الاستبدال الأحادي بـ 10 مركبات وسمح بتحسين حصيلة سبعة مركبات 1 ، 2 ، 3 ، 6 ، 7 ، 8 ، 9. بينما يتعلق الاستبدال الثنائي بـ 11 مركبًا ، أين تم تحسين تسعة مركبات منه و هي: 12 ، 14 ، 15 ، 17 ، 18 ، 19 ، 20 ، 21.

إن تحليل التفاعل المرئي يتعلق فقط بالمركبات A ، B ، C ، D ، 1 ، 11 و 14 التي لها ارتباطات أكبر من $7 M^{-1}$. تقييم إيجابي للخصائص الصيدلانية بواسطة البرنامج "DruLiTo" لاستنتاج ما إذا كانت مركباتنا يمكن أن تتصرف كدواء بعد تناوله.

من الضروري التحقق من هذه النتائج النظرية وتأكيدتها من خلال الدراسات التجريبية في المختبر و / أو في الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية : برامج الارساء الجزيئية ، سيرفلكس ، أوتودوك ، الموت الخلوي RIPk1 ، DruLiTo ، الاستبدال



Remerciements

A Dieu nous nous inclinons et de Dieu nous nous inspirons, Seigneur merci d'avoir veillé sur cet humble travail que seules vos bénédictions en étaient la cause.

Nous tenons à notifier que notre plus grande gratitude va à notre encadreur;

Pr. CHIKHI A

Notre mentor le long de cette expérience, merci à vous Monsieur pour votre partage du savoir-faire et de l'expertise que vous avez apportés à notre travail et surtout pour la confiance accordée, ce qui nous a permis de mener à bien ce travail.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Monsieur le président du Jury:

Pr. BENSEGUENI A

Qui nous honore en acceptant de présider le jury de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont à:

Mme TENIOU S

Pour l'intérêt qu'il a porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Mr MOKRANI E.H

Pour son aide de près comme de loin ainsi que ses précieux conseils.

DEHAMCHI K

La fraternité précèdera notre camaraderie, merci pour ton soutien, ton aide et tes conseils ; tu répondais toujours présent à nos demandes, nous te serons reconnaissantes a jamais.





DEDICACES

Je dédie ce travail :

A mon cher père ,

A ma chère mère , ma raison d'être

Qui m'ont dotée d'une éducation digne, qui m'ont soutenue et encouragée

durant ces années d'études, leur amour a fait de moi ce que je suis

aujourd'hui. Que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse leur offrir.

A mon encadreur monsieur Chikhi A qui nous a bien guidées, bien orientées.

A mon enseignant Mr Mokrani E.H qui nous a aidées lorsqu'on avait besoin.

Et spécialement à Karim, Manel et Ghada qui nous ont bien soutenues.

A mes amis Lina, Hamza, Belkis et Oussama qui ont partagé avec moi tous les

moments émotionnels durant cette période de travail.

A mes chrs sœurs, frères et mes ami(e)s qui me donnent de l'amour.

Et c'est sûr que je n'oublierai pas mon binôme B. Amina, merci énormément

pour ton grand cœur, toutes tes qualités qui seraient trop longues à

énumérer, ta patience et ton soutien qui m'ont toujours encouragée.

Merci pour votre compréhension avec mes sentiments de respect et d'amour.

Je vous remercie pour tout, en vous souhaitant que de la réussite et du

bonheur dans votre vie.

Merci !

Abir





DEDICACES

*A ma chère mère : **Saliha***

Tu m'inspires la force par un simple sourire, entre tes mains mes malheurs partent accompagnant un soupir, et en ta présence le bon Dieu ne cesse me bénir.

*A mon cher père : **Belkacem***

Comme un phare tu illumines et corriges mon cap ; qu'important mes tombées, tu m'attrapes. A toi l'ami, le frère, le maître ; t'honorer est ma raison d'être.

*A mes sœurs : **Zohour et Amel** et à ma cousine préférée : **Lamia***

Avec qui je partage la joie et la peine, vos mots d'encouragement se comptent par centaines, grâce à vous en moi j'y crois et à présent sereine.

*A ma grand-mère **Khadra** ; mon oncle **Nabil** et mes petits cousins **Assile ; Faiz et Mahdi***

*A tous mes êtres chers, membres de la famille **BRAHMI** et **TALHI***

*A une longue liste d'amies, à celles d'enfance : **Anfèl S, Injil A et Zrimèche Abir** et à celles d'extrême importance : **Ghada B, Manel B et Manel Bouabellou***

A tous ceux qui m'ont aimée, aidée et guidée

*A mon Binôme : **B. Abir***

Je ne changerai pour rien au monde notre collaboration, merci pour ta sagesse, ton soutien, ta confiance ; j'ai trouvé en toi le pilier sur lequel je m'appuyais ; l'épaule sur lequel je pleurais. Ma confidente je te remercie pour ta sincérité, ton respect et ton amour.

Ma gratitude à vous tous

Amina

Table des matières



Résumé.....	I
Liste des figures	IV
Liste des tableaux.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

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

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA NECROPTOSE

I. Le vocabulaire de la mort cellulaire.....	3
1. Mourir discrètement : apoptose et <i>anoikis</i>.....	3
1.1. Apoptose.....	3
1.2. <i>Anoikis</i>	5
2. Mourir brutalement : nécrose régulée et nécroptose.....	5
2.1. Nécrose régulée.....	5
2.2. Nécroptose.....	6
3. Mourir finalement : autophagie, catastrophe mitotique et <i>entosis</i>.....	7
3.1. Autophagie.....	7
3.2. Catastrophe mitotique.....	8
3.3. <i>Entosis</i>	8
4. Mourir singulièrement : <i>netosis</i>, cornification et pyroptosis.....	8
4.1. <i>Netosis</i>	9
4.2. Cornification.....	9
4.3. Pyroptosis.....	9
II. Nécroptose.....	11
1. Les effecteurs conduisant à la necroptose.....	11
1.1 Récepteurs de mort	11
1.2 Protéines effectrices de la nécroptose.....	11
1.3 Régulation de la nécroptose.....	11
2. Induction et signalisation de la nécroptose.....	12
III. Les maladies induites par la nécroptose.....	13
1. Nécroptose et Inflammation.....	13
2. Nécroptose dans les lésions organiques.....	14

2.1 Cerveau.....	15
2.2 Poumon.....	16
2.3 Rein	16
2.4 Cœur.....	16
2.5 Tube digestif.....	17
2.6 Foie.....	18
2.7 Pancréas.....	18

CHAPITRE 2 : LA RIP1 KINASE ET SES INHIBITEURS

1. La Structure de la RIPK.....	19
2. Le gène RIPK1.....	20
3. Le mécanisme responsable de la mort cellulaire	21
4. Les inhibiteurs de la RIPK.....	23
4.1 La sibiriline.....	23
4.2 Le 6E11	25
4.3 Le 4itj	26

CHAPITRE 3 : LE DOCKING MOLECULAIRE

1. Principe théorique.....	30
2. Algorithmes de recherche	31
2.1 Recherche systématique.....	31
2.1.1 Les méthodes de recherche exhaustive	31
2.1.2 Les méthodes de reconstruction incrémentale.....	31
2.2 Recherche aléatoire ou stochastique.....	32
2.2.1 Les méthodes de Monte-Carlo.....	32
2.2.2 Les algorithmes génétiques	32
2.2.3 Les algorithmes de recherche tabou	33
2.2.4 Les algorithmes d'optimisation par essais particuliers	34
2.3 Recherche déterministe ou de simulation.....	35
2.3.1 Les méthodes de dynamique moléculaire.....	35
2.3.2 Les méthodes de minimisation d'énergie.....	36
3. Principaux logiciels de docking.....	36
3.1 Autodock.....	37
3.2 Surflex.....	37
4. Problématique liée aux méthodes de docking.....	38

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES

I. Matériel	40
1. Micro-ordinateur	40
2. Les banques (bases) de données et sites Internet	40
3. Les programmes	41
II. Méthodes	42
1. Docking moléculaire	42
2. Tests d'évaluation de la fiabilité du docking	42
2.1 Coefficient de corrélation linéaire (r)	43
2.2 Le RMSD ou l'écart quadratique moyen.....	43
3. Le choix du complexe 4ITJ	43
4. Préparation des molécules au docking moléculaire	44
4.1 Préparation de la protéine.....	44
4.2 Préparation du ligand.....	45
4.3 Les étapes du docking.....	45
4.3.1 Protocole de docking par Autodock.....	45
4.3.2 Protocole de docking par Surflex.....	45
5. Recherche de nouveaux inhibiteurs théoriques de la RIP1 Kinase	46
5.1 Le criblage virtuel	46
5.2 La modélisation moléculaire par substitution « in silico »	46
6. Filtrage ADME/Tox (la règle de cinq de Lipinski 1997)	47
7. Analyse visuelle des interactions établies entre le ligand et les acides aminés du site actif	48

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

I. Test d'évaluation de la fiabilité des programmes de docking	49
1. Le test RMSD	49
1.1 Le test RMSD pour le programme Autodock.....	49
1.2 Le test RMSD pour le programme Surflex	50

1.3 L'analyse visuelle des résultats du RMSD.....	51
1.3.1 Analyse visuelle des RMSD résultants du logiciel Autodock.....	52
1.3.2 Analyse visuelle des RMSD résultants du logiciel Surflex.....	52
2. Le test du coefficient de corrélation linéaire.....	53
2.1 L'analyse de corrélation des énergies obtenues par Autodock.....	54
2.2 L'analyse de corrélation des affinités obtenues par Surflex.....	55
3. Le choix de l'outil d'arrimage moléculaire.....	56
II . Recherche de nouveaux inhibiteurs théoriques de la RIP1 Kinase	56
1. Le criblage virtuel des similaires.....	56
1.1 La règle de cinq de Lipinski	60
1.2 L'analyse visuelle et discussion des interactions.....	61
2. Essais de modélisation moléculaire	70
2.1 Evaluation pharmacologique « Drug-Likeness »	72
2.2 L'analyse visuelle et discussion des interactions	74
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	81
LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	83
ANNEXES	93

Liste de figures

Figure 1	Apoptose(lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html ; consulté le :20/06/2019).....	3
Figure 2	Nécrose(lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html ; consulté le :20/06/2019).....	6
Figure 3	Mécanisme de la nécroptose, nécrose régulée (Cabon. L et al., 2013).....	7
Figure 4	Les voies de signalisation régulées par le TNF-R1 (Zhou. W. et Yuan J., 2014)...	12
Figure 5	Voies de signalisation conduisant à l'activation de la nécroptose.....	13
Figure 6	La nécroptose dans les lésions organiques (Zhao. H., 2015)	14
Figure 7	La famille des kinases RIP (Duanwu Zhang et al., 2010).....	19
Figure 8	Le domaine structurel de la RIPK1 (https://www.revolvy.com/page/RIPK1?cr=1 ; consulté le : 10/06/2019).....	20
Figure 9	Idéogramme chromosome humain (https://www.revolvy.com/page/RIPK1?cr=1	21
Figure 10	Le mécanisme responsable de la mort cellulaire (Diana García García et al., 2016)	21
Figure 11	Les clés de la signalisation de nécrose (https://picswe.net/pics/rip3-kinase-75.html ; consulté le : 01/07/2019).....	22
Figure 12	La sibiriline interagit à proximité de la poche de liaison RIPK1 ATP (Fabienne Le Cann. F et al., 2017)	24
Figure 13	Caractérisation du composé 6E11 en tant que nouvel inhibiteur de nécroptose.(Claire Delehouzé. C et al., 2017)	25
Figure 14	Site de liaison de 6E11(Claire Delehouzé. C et al., 2017)	26
Figure 15	La structure moléculaire de 1HX(http://www.rcsb.org/ligand/1HX consulté le: 10/05/2019).....	27
Figure 16	Exemple de la mésomérie du Formamide (Stephane.humbel. S., 2008).....	28
Figure 17	Structures de RIP1 lié à Nec-4 (Tian Xie et al., 2013).....	29
Figure 18	Docking protéine – ligand. (Mahdjoub Youcef ; Développement d'une application distribuée en utilisant la plateforme Jini « Application docking moléculaire»)	30
Figure 19	Docking par la méthode à base des fragments. (Mahdjoub Youcef).....	32
Figure 20	Principe général d'un algorithme génétique (Bayo, NoJhan., 2005 ; Ihsen Saad. I et al., 2009)	33
Figure 21	Principe général de la recherche tabou. (Hervé Rivano., 2010).....	34
Figure 22	Algorithme d'optimisation par essais particuliers (BOUZID. A., 2008-2009)...	35

Figure 23 Utilisation des différents logiciels de docking en 2010-2011 (Yuriev. E et al., 2013)	37
Figure 24 Protomol généré par Surfex (Lagarde. N., 2014)	38
Figure 25 Structure tridimensionnelle du complexe 4ITJ	44
Figure 26 Un secteur qui représente le pourcentage des RMSD inférieurs à 2Å obtenus par autodock	50
Figure 27 Un secteur qui représente le pourcentage des RMSD inférieurs à 2Å obtenus par surflex	50
Figure 28 Les pourcentages des RMSD fournis par Autodock et Surfex	51
Figure 29 Superposition des trois ligands des complexes (1gs4, lig1 et 2aim) et ceux calculés par docking moléculaire avec autodock	52
Figure 30 Superposition des trois ligands des complexes (1tng, 4j0y et 1gfw) et ceux calculés par docking moléculaire avec surflex	52
Figure 31 Courbe de corrélation entre log IC50 et énergies, obtenues par autodock	54
Figure 32 Courbe de corrélation entre Log IC50 et final-0 obtenus par surflex	55
Figure 33 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé A avec le site actif de la RIPK1	62
Figure 34 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé A en schéma 2D	63
Figure 35 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé B avec le site actif de la RIPK1	64
Figure 36 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé B en schéma 2D	65
Figure 37 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé C avec le site actif de la RIPK1	66
Figure 38 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé C en schéma 2D	66
Figure 39 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé D avec le site actif de la RIPK1	68
Figure 40 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé D en schéma 2D	68
Figure 41 Les meilleurs résultats de la substitution évalués par le logiciel DruLiTo	72
Figure 42 Dix molécules toxiques évaluées par le logiciel DruLito	73
Figure 43 Mode d'interactions du composé 1 avec le site actif de la RIPK1	74
Figure 44 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé 1 en schéma 2D	75
Figure 45 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interactions du composé 11 avec le site actif de la RIPK1	76
Figure 46 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé 11 en schéma 2D	77

Figure 47 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé 14 avec le site actif de la RIPK1	
Figure 48 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé 11 en schéma 2D.....	77
Figure 49 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé 14 avec le site actif de la RIPK1	78
Figure 50 Les liaisons hydrogène établies par le composé 14 avec le site actif.....	79

Liste des tableaux

Tableau 1 La différence entre apoptose, nécroptose et nécrose (Zhao. H et al., 2015).....	10
Tableau 2 Quelques exemples de logiciels de docking (Lagarde. N., 2014)	36
Tableau 3 Principales sources d'erreur lors d'un docking (Rognan. D., 2007).....	39
Tableau 4 Les micro-ordinateurs utilisés et leurs caractéristiques	40
Tableau 5 Les caractéristiques pharmacologiques du ligand de référence	44
Tableau 6 Données de l'analyse par la corrélation linéaire entre les scores obtenus par docking moléculaire (Autodock et Surflex) et les log IC50	53
Tableau 7 Les 20 meilleurs similaires, leurs affinités et leurs structures	57
Tableau 8 Les paramètres de la règle de cinq de Lipinski des 20 meilleurs similaires	61
Tableau 9 Les liaisons hydrogène établies par le composé A avec le site actif	63
Tableau 10 Les liaisons hydrogène établies par le composé B avec le site actif.....	65
Tableau 11 Les liaisons hydrogène établies par le composé C avec le site actif.....	67
Tableau 12 Les liaisons hydrogène établies par le composé D avec le site actif	69
Tableau 13 Les mono et bi substitutions de 1HX.....	71
Tableau 14 Propriétés physico-chimiques des meilleurs composés de la substitution.....	72
Tableau 15 Les liaisons hydrogène établies par le composé 1 avec le site actif	75
Tableau 16 Les liaisons hydrogène établies par le composé 11 avec le site actif	77
Tableau 17 Les liaisons hydrogène établies par le composé 14 avec le site actif	79
Tableau 18 Les résultats des calculs des 300 complexes utilisés pour comparer les RMSD des deux programmes Surflex et Autodock	93
Tableau 19 Les résultats du criblage par Surflex des similaires du ligand 1HX.....	99

Liste des abréviations

- ADN:** Acide DésoxyriboNucléotide.
- AIF:** apoptosis-inducing factor.
- AIM2:** absent in melanoma 2.
- AKI:** ischemic Acute Kidney Injury.
- AGL:** Algorithme Génétique Lamarkien.
- APAF-1:** apoptotic peptide activating factor-1.
- APAP :** Acetyl-Para-Aminophenol.
- ASC:** apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD.
- ATP:** adenosine triphosphate.
- AVC:** Accident Vasculaire Cérébral.
- Bax:** Bcl-2 associated X protein.
- Bak:** Bcl-2 homologous antagonist killer.
- BBB:** Blood Brain Barrier.
- Bcl-2:** B-cell leukemia protein-2.
- BIM:** Bcl-2-interacting mediator of cell death.
- CD:** cluster of differentiation.
- cIAP1:** cellular inhibitor of Apoptosis Protein 1.
- CIP:** la Céruléine.
- CMC:** Comprehensive Medicinal Chemistry (une base de données).
- CMV:** cytomegalovirus.
- CYLD:** Cylindromatosis.
- DAMPs:** damage associated molecular patterns.
- DD:** death domain.
- DI:** intermediate domain.
- EGFR:** Epithelial Growth factor Receptor.
- ERK:** Extracellular Signal-Regulated Kinase.
- FADD:** FAS Associated Death Domain.
- Fas:** fatty acid synthase.
- FLIP:** FLICE-like inhibitory proteins.
- HMGB1:** High Mobility Group protein B1.
- IAP:** inhibitor of apoptosis protein.
- IC50:** inhibitory concentration 50%.

IL: interleukine.

IRI: ischemia-reperfusion injury.

KD: kinase domain.

LUBAC: linear ubiquitin assembly complex.

MDDR: Blood Brain Barrier.

MLKL: mixed lineage kinase domain-like protein.

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NEMO: NF- κ B Essential Modulator.

NMDA: N-Methyl-D-aspartate.

Nec: necrostatin.

NETs: Neutrophil Extracellular Traps.

NF- κ B: Nuclear factor-Kappa B.

NOD: nucleotide-binding oligomerization domain.

NOX: NADPH-oxidase.

OG: Oxygène Gamma.

p53: protéine 53.

Pdb: protein data bank.

RHIM: respective homotypic interaction motif.

RIP: receptor interacting protein.

RIPK1: receptor interacting protein kinase 1.

RIPK3: receptor interacting protein kinase 3.

RMSD:Root Mean Square Deviation.

ROCK1: Rho-associated kinase 1.

ROS: reactive oxygen species.

Smac: Second mitochondrial activator of caspases.

TRADD: TNFR1-associated death domain.

TRAF: TNF receptor-associated factor.

TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand.

TRAILR: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand receptor.

TLR: Toll-like receptor.

TNF α : tumor necrosis factor α .

TNFR: tumor necrosis factor receptor.

XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis.

ZBP1: Z-DNA binding protein 1.

I - Partie
bibliographique

Introduction

La physiologie humaine n'est pas épargnée des dysfonctionnements quelconques engendrant des maladies auxquelles une correction et un rétablissement sont indispensables.

L'utilisation des méthodes de docking dans la conception de médicaments a débuté il y a plus de 30 ans [1] pour améliorer ce processus dit : long et coûteux et qui s'initie par l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique.

Beaucoup de gens sont atteints d'hépatite, d'infarctus du myocarde ou d'un accident vasculaire cérébral. Ces maladies se présentent à différents taux de mortalités ou morbidités, avec en commun leur induction par la nécroptose.

La nécroptose, une mort cellulaire qui se produit quand l'apoptose ne peut pas être effectuée. L'activation et les étapes de cette voie ont été caractérisées pendant la décennie passée, prouvant que c'est une forme de mort cellulaire programmée, qui partage des caractéristiques très similaires à l'apoptose et à la nécrose.

Son importance a pu être démontrée dans de nombreuses conditions physiopathologiques, telles que l'inflammation de l'intestin, la perte des photorécepteurs, la pancréatite aiguë et les infections virales. Par ailleurs, son activation pourrait représenter une piste thérapeutique intéressante dans le domaine de la cancérologie. [2]

Une fois la maladie définie, il est nécessaire d'investiguer sur l'échelle moléculaire son inducteur qui constitue une cible thérapeutique de nature protéique. Il s'agit de la RIP1 Kinase. Notre thème traite la recherche de nouveaux inhibiteurs de la « RIPK1 » plus efficaces que le ligand « 1HX » retrouvé dans le complexe 4ITJ issu de la PDB à l'aide du docking moléculaire, une approche *in silico* qui détermine le mode d'interactions et calcule la force de liaison entre protéine et ligand.

Notre mémoire comprend deux grandes parties :

1- une partie bibliographique : qui contient trois chapitres

- Le premier chapitre : traite la nécroptose et les maladies qu'elle induit.
- Le deuxième chapitre : se consacre à notre cible « RIPK1 » et ses différents inhibiteurs.
- Le dernier chapitre : porte sur le docking, ses algorithmes et ses logiciels.

2 - une partie pratique : formée de deux chapitres

- Le premier chapitre : regroupe tout le matériel et les méthodes utilisés dans cette étude.
- Un deuxième chapitre : qui décrit et discute les résultats obtenus, suivi d'une conclusion qui résume le travail effectué avec une note sur les perspectives à atteindre.

Chapitre I
Généralités
Sur la
nécroptose

I. Le vocabulaire de la mort cellulaire

Le terme apoptose est aujourd'hui le premier mot qui vient à l'esprit d'un scientifique à qui l'on parle de suicide programmé des cellules. Pourtant, l'apoptose dite classique ne constitue pas le seul programme de mort cellulaire, et de nombreuses voies dites alternatives ou même atypiques sont désormais connues. Plus qu'alternatives, ce sont parfois des voies de signalisation préférées à l'apoptose en raison du type cellulaire et/ou du contexte environnemental dans lequel se trouve la cellule (tissu, stade de développement, etc.) Entre *anoïkis*, *pyroptosis*, *necroptosis* ou *ferroptosis*, vous allez découvrir que la mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire ![3]

Elles sont aussi probablement le résultat de la redondance de ce système d'autodestruction cellulaire si nécessaire à la réparation et au maintien de l'homéostasie tissulaire, ainsi qu'à l'élimination des pathogènes et à la destruction des cellules à potentiel tumoral. [4]

La classification de ces différents types de mort implique de les aborder selon le déterminisme cellulaire associé : mourir discrètement, mourir brutalement, mourir finalement et mourir singulièrement. Ces notions renvoient inévitablement au concept d'immunogénicité de la mort cellulaire.

1. Mourir discrètement : apoptose et anoïkis

1.1 Apoptose

L'apoptose est la voie de mort par excellence qui intervient lors du développement, de la morphogénèse et de l'homéostasie tissulaire. Parce qu'elle peut concerner des millions de cellules chaque jour dans un corps humain, elle doit être majoritairement tolérogène et discrète. L'élimination des cellules apoptotiques est nécessairement rapide et efficace pour remplir ces conditions. [5]

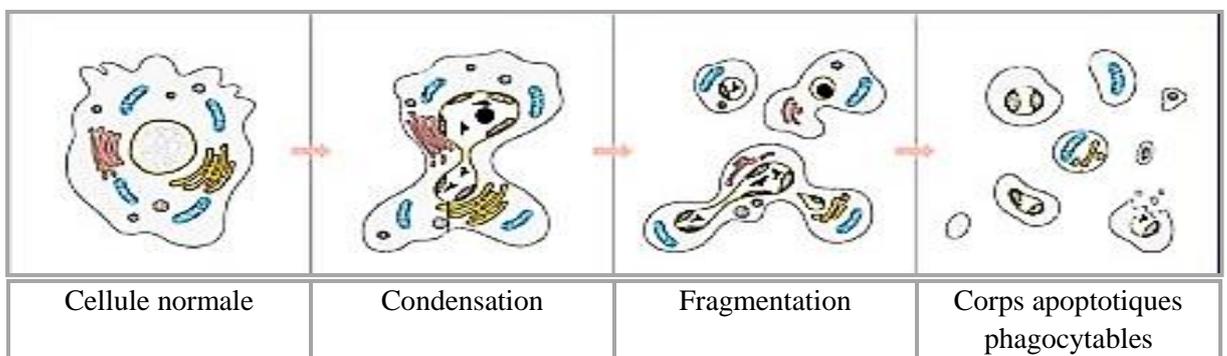


Figure 1 Apoptose(lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html ; consulté le :20/06/2019)

L'apoptose peut être commandée par des signaux internes à la cellule (voie intrinsèque) ou par des signaux externes (voie extrinsèque).

- ❖ **La voie intrinsèque** repose sur la perte d'intégrité membranaire des mitochondries. Ces organites renferment de nombreuses protéines capables d'induire la mort de la cellule [6]. Les membres de la famille Bcl-2 régulent la perméabilité mitochondriale, et leur expression et leur activité sont régulées par les divers stress cellulaires, tels que les dommages à l'ADN, le stress métabolique, etc [6,7]. La voie intrinsèque est induite par caspase-9 formant l'apoptosome avec APAF-1 et le cytochrome c.
- ❖ **La voie extrinsèque** quant à elle, implique l'engagement de récepteurs membranaires de mort, les plus courants étant Fas/CD95, TNF α Receptor 1(TNFR1) et TRAIL Receptor (TRAILR) 1-2.[8] La liaison de ces récepteurs à leurs ligands déclenche la signalisation apoptotique, une induction qui passe par des caspases initiatrices, la caspase-8 ou -10 pour la voie extrinsèque

Ces caspases initiatrices activent les caspases exécutrices -3, -6 et -7 qui vont cliver des milliers de substrats différents. Cela conduit à :

- La fragmentation de l'ADN,
- Le bourgeonnement de la membrane plasmique
- La condensation de la chromatine.

Il existe des points de convergence entre les deux voies, comme la protéine Bid, membre de la famille Bcl-2, qui active la voie mitochondriale après clivage par la caspase-8. Ce mécanisme peut être un moyen d'amplifier le signal apoptotique.[9] L'aspect de la cellule est ainsi modifié [10] :

- le volume cellulaire est réduit (*pyknosis*).
- la membrane plasmique bourgeonne.
- la chromatine se condense.
- l'ADN est fragmenté (*karyorrhexis*).
- des corps apoptotiques se forment.

Protéines effectrices de l'apoptose (les caspases) :

La famille des caspases est composée de protéases cystéines conservées qui interagissent spécifiquement avec l'acide aspartique de leurs substrats. Les caspases sont essentielles dans le processus apoptotique. Il existe 14 caspases différentes classées en 3 sous catégories [11] :

- Les caspases initiatrices 2 ; 8 ; 9 ; 10.

- Les caspases effectrices 3; 6 ; 7 ; 14.
- Les caspases activatrices des cytokines 1 ; 4 ; 5 ; 11 ; 12 ; 13 (non-apoptotiques, régulent l'inflammation).

Contrairement à la nécrose, la formation des corps apoptotiques empêche le déversement du contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire et évite, en théorie, une inflammation massive du tissu. La cellule va exposer des signaux « *find me* » ou « *eat me* », par exemple par l'externalisation de la phosphatidyl-sérine, sur les corps apoptotiques qui vont permettre leur reconnaissance et leur élimination par les cellules voisines (**Canbay et al., 2003**). [12]

L'apoptose, définie comme dépendante de la voie des caspases, peut donc être étudiée par l'utilisation d'inhibiteurs pan-caspases, tel que le Z-VAD-fmk ou le QVD-OPh ou par une délétion des gènes codant pour la caspase 8 ou la caspase 3, les deux caspases effectrices conduisant à l'apoptose. [13]

1.2 *Anoikis*

Parmi les cas particuliers d'apoptose, nous pouvons citer l'*anoikis* qui ne concerne que les cellules adhérentes, car c'est une apoptose induite par le détachement cellulaire de la matrice extracellulaire. Elle implique une perte de l'attachement des intégrines $\beta 1$, la diminution de l'expression de l'EGFR, l'inhibition de la signalisation ERK1 et la surexpression de BIm, un membre de la famille Bcl-2 [14, 15]. L'étude moléculaire de l'*anoikis* présente un intérêt en raison de la propriété des cellules cancéreuses épithéliales invasives et métastatiques à résister à ce type de mort.

2. Mourir brutalement : nécrose régulée et nécroptose

2.1 Nécrose régulée

La nécrose a récemment vu son statut de mort incontrôlée reconsidéré. En effet, plusieurs études ont pu démontrer l'existence de voies biochimiques complexes régulant l'exécution d'une nécrose programmée en réponse à toute une variété de signaux :

- Les dommages à l'ADN.
- Les excitotoxines.
- Les ligands des récepteurs de mort.

La nécrose n'en reste pas moins aussi une voie passive de mort cellulaire, comme lors d'une perte d'énergie considérable ou lors de dommages drastiques irréparables. [16]

Elle se caractérise par :

- Le gonflement de la cellule.

- La rupture des membranes plasmiques, des organelles sans la condensation de la chromatine (**Green. D-R. et Lambi. F., 2015**). [17]
- La fragmentation irrégulière de l'ADN.
- La morphologie du noyau différente de celle lorsque les cellules entrent en apoptose (**Nugues. A-L. et al., 2014**). [18]
- La rupture des membranes et la libération de nombreuses cytokines et de médiateurs de l'inflammation : IL8, IL10, TNF α et HMGB1.

La nécrose est dans tous les cas indépendante des caspases, contrairement à l'apoptose qui peut être liée ou non à l'activation de ces protéases. Les raisons de l'absence d'activation des caspases peuvent être directes (mutation, inhibition ou suppression d'un des composants de la voie) ou indirectes (manque d'énergie pour assurer l'activation d'une voie dépendante des caspases). [16]

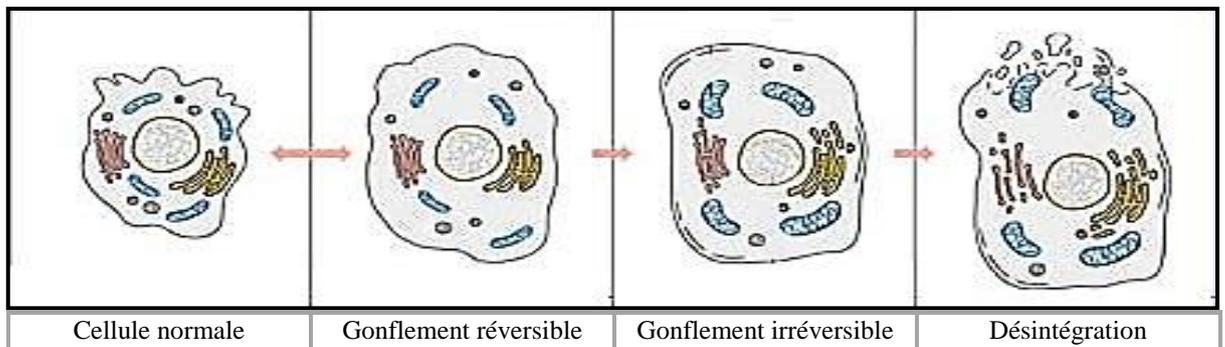


Figure 2 Nécrose(lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html ; consulté le :20/06/2019)

2.2 Nécroptose

L'une des formes connues et bien décrites de nécrose programmée, par conséquent elle présente des caractéristiques similaires de celles de la nécrose telles que le gonflement de la cellule et des organites, la rupture des membranes plasmiques, la fragmentation irrégulière de l'ADN (**Nugues. A-L. et al., 2014**). [18]

Cette voie est enclenchée par l'activation des récepteurs de mort et des récepteurs TLR3 et TLR4. L'activation des kinases RIP1 et RIP3 est primordiale dans l'initiation de cette voie et peut être inhibée par les caspases, notamment la caspase-8, la machinerie de dégradation par ubiquitination de RIP1 et RIP3, ou par les agents pharmacologiques de type nécrostatines. Il est important de noter que RIP3 peut induire la mort en l'absence de RIP1, comme lors d'infections par le CMV (cytomégalovirus) par exemple.

Parmi les possibles voies en aval, on trouve, entre autres, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par l'activation de la NADPH-oxydase 1 (NOX1), l'activation d'enzymes métaboliques de la glycogénolyse et de la glutaminolyse, et l'inhibition de la translocase

mitochondriale de nucléotide adénine (ANT). [16]

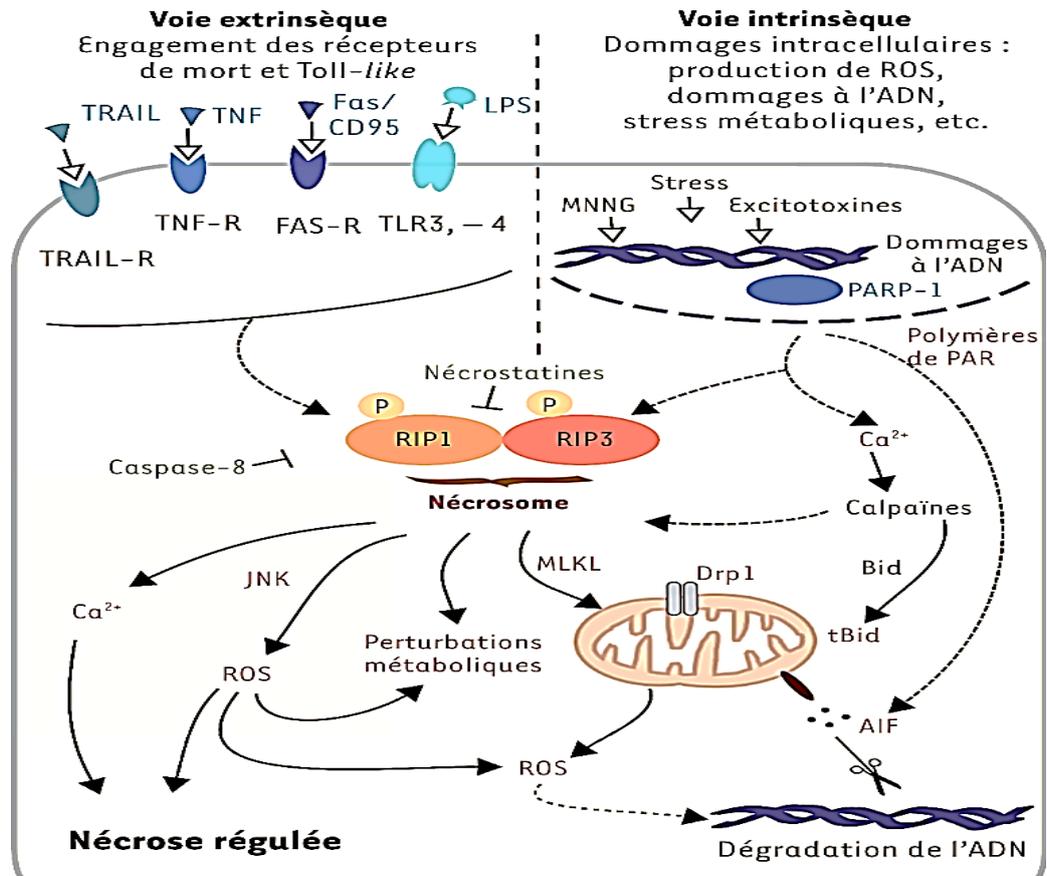


Figure 3 Mécanisme de la nécroptose, nécrose régulée (Cabon. L et al., 2013)

3. Mourir finalement : autophagie, catastrophe mitotique et *entosis*

Certains mécanismes s'apparentent en premier lieu davantage à un système de survie et de protection cellulaire qu'à un type de mort, mais ils peuvent néanmoins se solder par une mort programmée. C'est le cas de l'autophagie, la catastrophe mitotique et l'*entosis*. Leur immunogénicité est relativement peu caractérisée ; elle dépend probablement du type de mort impliqué. Par exemple, l'autophagie a été décrite comme nécessaire à la fois à la tolérogénicité de l'apoptose en favorisant l'exposition de signaux « *eat me* », et à l'induction d'une réponse immune *via* la libération d'HGMB1. [19]

3.1 Autophagie

Ce processus correspond à un phénomène intracellulaire d'autodigestion lysosomale des composants cytoplasmiques (organites ou cytosol), induit par des conditions de stress, telles que le manque de nutriments. L'autophagie permet à la cellule de survivre durant une période critique en recyclant les acides aminés et les acides gras de ses propres composants pour pallier les besoins énergétiques. C'est aussi un mécanisme d'élimination de certains organites, tels que

les mitochondries. Il existe plusieurs sous-types d'autophagie, mais seule la macro-autophagie, caractérisée par la formation d'autophagosomes à double membrane, pourrait mener à la mort cellulaire. [20]

3.2 Catastrophe mitotique

La catastrophe mitotique est liée à un mauvais déroulement de la mitose. Elle est observable lors de dysfonctionnements de la machinerie mitotique conduisant à une ségrégation incorrecte des chromosomes. La cellule arrête alors son cycle cellulaire et induit sa propre mort par nécrose ou apoptose, ou sa sénescence. Certaines cellules peuvent échapper à cette mort cellulaire, notamment en cas de mutations de la protéine p53, et continuent de proliférer avec les modifications chromosomiques acquises, soit par [21] :

- Micronucléation (chromosomes ou fragments de chromosomes surnuméraires).
- Multinucléation (noyaux entiers supplémentaires).

La catastrophe mitotique représente davantage un mécanisme oncosuppressif qui prévient l'apparition de cellules au contenu génomique aberrant, plutôt qu'une véritable mort cellulaire [22]. Son étude est toutefois primordiale, car plusieurs agents pharmacologiques utilisés en chimiothérapie agissent justement sur la mitose : c'est le cas du paclitaxel (Taxol[®]) et de la vinblastine (Velbé[®]) qui empêchent, respectivement, la dépolymérisation et la polymérisation des microtubules.

3.3 Entosis

L'*entosis* (ou cannibalisme cellulaire) est observée fréquemment dans les biopsies de tumeurs, mais aussi dans d'autres conditions. Elle correspond à l'internalisation d'une cellule par une autre cellule du même type et non phagocytaire. Ce programme serait initié par une perte d'interaction avec la matrice extracellulaire [23]. Il requiert l'activation des protéines Rho et ROCK1 et n'est pas perturbé par l'inhibition des caspases ou la surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. La cellule ingérée étant dégradée par les hydrolases lysosomales, ce programme peut être bloqué par des inhibiteurs de protéases lysosomales. Parfois, la cellule ingérée continue à se diviser et peut échapper à la mort cellulaire [24]. Seule une *entosis* aboutissant à la disparition définitive de la cellule peut être considérée comme une mort cellulaire programmée.

4. Mourir singulièrement : *netosis*, *cornification* et *pyroptosis*

Plusieurs types de mort cellulaire programmée décrits sont en fait des cas particuliers restreints à un type cellulaire. Ils représentent cependant des modèles d'étude intéressants,

pouvant permettre d'identifier des protéines ou des mécanismes cellulaires non définis.

4.1 *Netosis*

La *Netosis* ne concerne que les granulocytes neutrophiles et éosinophiles. Elle a été nommée ainsi car elle a été initialement observée dans des cellules sécrétant des pièges extracellulaires neutrophiles (NET), constitués de protéines antimicrobiennes, de chromatine nucléaire et d'histones [25]. Cette sécrétion se produit physiologiquement en présence de micro-organismes, mais aussi de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL8), de plaquettes ou encore d'auto-anticorps. Cette mort ne peut pas être enrayée par les inhibiteurs de caspases ni par la nécrostatine-1, mais elle est sensible à l'inhibition de la NADPH oxydase ou de l'autophagie. La *netosis* partage des caractéristiques avec la nécrose et l'autophagie, et elle pourrait être rattachée à l'un ou l'autre de ces types de mort. Comme source potentielle d'auto-antigènes, elle pourrait participer à l'installation de maladies auto-immunes. [26]

4.2 *Cornification*

La cornification, qui touche uniquement les kératinocytes, est un processus de mort cellulaire physiologique requis pour la formation de la couche cornée de l'épiderme [27]. Composée de kératinocytes morts ainsi que de protéines et de lipides spécifiques, cette couche cornée confère à la peau ses fonctions de barrière. Cette mort programmée des kératinocytes, apparentée à un processus de différenciation terminale, est associée à l'activation de la caspase-14 et des transglutaminases 1, 3 et 5. [28]

4.3 *Pyroptosis*

La pyroptose est restreinte aux macrophages infectés par des pathogènes bactériens. Elle a pu être observée en présence de plusieurs pathogènes comme *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ou *Bacillus antracis*. La pyroptose nécessite l'activation de la caspase-1 par une plateforme multiprotéique composée, soit de récepteurs NOD-like (NLR) ou de la protéine censeur de l'ADN cytosolique AIM2 associée à la protéine adaptatrice ASC, soit de dimères d'ASC correspondant au pyroptosome. Les caractéristiques morphologiques de la *pyroptosis* peuvent rappeler à la fois l'apoptose et la nécrose, et il a été suggéré aussi que la pyroptose soit plus un cas particulier d'apoptose intrinsèque qu'un type de mort à part entière.

De nouveaux types de mort continuent d'être découverts chaque année. Le dernier, en 2012, est :

- *Ferroptosis*

Une mort cellulaire dépendante du fer. En traitant par un nouveau composé des cellules tumorales porteuses d'une mutation de la voie oncogénique Ras, les auteurs ont induit la

production d'espèces réactives de l'oxygène, la peroxydation des lipides, l'apparition de mitochondries rétrécies, puis la mort cellulaire [29]. Cette mort ne partage aucune caractéristique des autres types de mort référencés (activation des caspases, activation de Bax/Bak, augmentation du calcium intracellulaire, etc.).

Tableau 1 La différence entre apoptose, nécroptose et nécrose (Zhao. H et al., 2015)

	Apoptose	Nécrose	Nécroptose
Type de mort cellulaire	Contrôlée	Incontrôlée	contrôlée
Déclencheur	Traumatisme, stress toxique, auto-renouvellement, vieillissement, développement	Traumatisme, stress toxique, infection.	Traumatisme, stress toxique, infection
Morphologie	Vésicules membranaires étendues, condensation et fragmentation du noyau.	Gonflement important des organites et des cellules, perte de l'intégrité de la membrane, libération du contenu extracellulaire.	Gonflement cytoplasmique, rupture de la membrane plasmique et renversement du contenu intracellulaire
Voie de signalisation	Voies spécifiques, intrinsèques ou extrinsèques.	Non spécifique	Voies spécifiques, par exemple celle du TNFR1
Effecteurs	Caspase, (caspase-3, -6, -7, -8 et -9)	/	RIP kinase (RIPK1 et RIPK3)
Rôle des mitochondries	_Libération du cytochrome c, interaction avec la famille de protéines Bcl-2 _Dysfonctionnement mitochondrial.	_Dysfonctionnement mitochondrial, effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale. _Échec de la production d'ATP.	_Dysfonctionnement mitochondrial, production de ROS. _Libération AIF.
Complexe formé	Apoptosome	/	Nécroptosome
Réaction inflammatoire	Réponse anti-inflammatoire ou pro-inflammatoire	Réponse pro-inflammatoire	Réponse pro-inflammatoire
Libération des DAMP	OUI	OUI	OUI
Inhibiteur	Z-VAD fmk	/	Les nécrostatines
Condition humaine	État physiologique ou pathologique	État pathologique	État pathologique

II . Nécroptose

1. Les effecteurs conduisant à la necroptose

1.1 Récepteurs de mort

Le récepteur le plus étudié dans la signalisation de la nécroptose est le récepteur du TNF- α qui est à la fois impliqué dans la signalisation de l'apoptose, de la survie via NF κ B et de la nécroptose. Il peut donc induire la mort comme la survie cellulaire. (Nugues. A-L. et al., 2014).[18] Il est issu de la superfamille TNF qui comprend des ligands tels que le TNF, Fas, TRAIL et leurs récepteurs. Ainsi, cette superfamille est composée de 19 ligands et de 29 récepteurs intervenant dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, l'invasion, l'inflammation et bien sûr l'apoptose. Chaque récepteur possède un domaine de mort du côté cytoplasmique pour transmettre le message et activer les voies intracellulaires à l'aide des molécules adaptatrices telles que FADD, TRADD (Dempsey. PW. et al, 2003). [30]

1.2 Protéines effectrices de la nécroptose

Parmi les protéines effectrices, on retrouve les protéines RIP1 et RIP3 appartenant à la famille des kinases RIP. Ces protéines possèdent un domaine sérine/thréonine kinase (KD) et un domaine RHIM. Elles peuvent s'autophosphoryler sur leur domaine kinase afin de les activer. Leur domaine RHIM leur permet d'interagir entre elles (Vandenabeele. P. et al., 2010). [31]

1.3 Régulation de la nécroptose

L'assemblage et l'activation de la plateforme de signalisation nécroptique sont contrôlés par une série de modifications post traductionnelles des constituants du complexe. La formation du RIPoptosome est régulée négativement par l'ubiquitylation de RIP1. Les traitements avec les inhibiteurs cIAP1/2 ou l'expression de la deubiquitylase CYLD induisent une nécrose TNF-R1 dépendant. L'activation de RIP3 dépend de l'activité kinasique de RIP1 qui peut être inhibée par la nécrostatine. L'induction de la nécrose par le RIPoptosome est inhibée aussi par l'activité catalytique de l'hétérodimère caspase 8/FLIP. Si un stimulus de RIP1 et du RIPoptosome active la caspase 8 et FLIP, l'activité catalytique de l'hétérodimère caspase 8/FLIP inhibe l'activation de RIP3 et donc l'induction de la nécrose RIP dépendant. Les cellules ont tendance à survivre. Mais en l'absence de FLIP, la caspase 8 est incapable d'inhiber RIP3. [13]

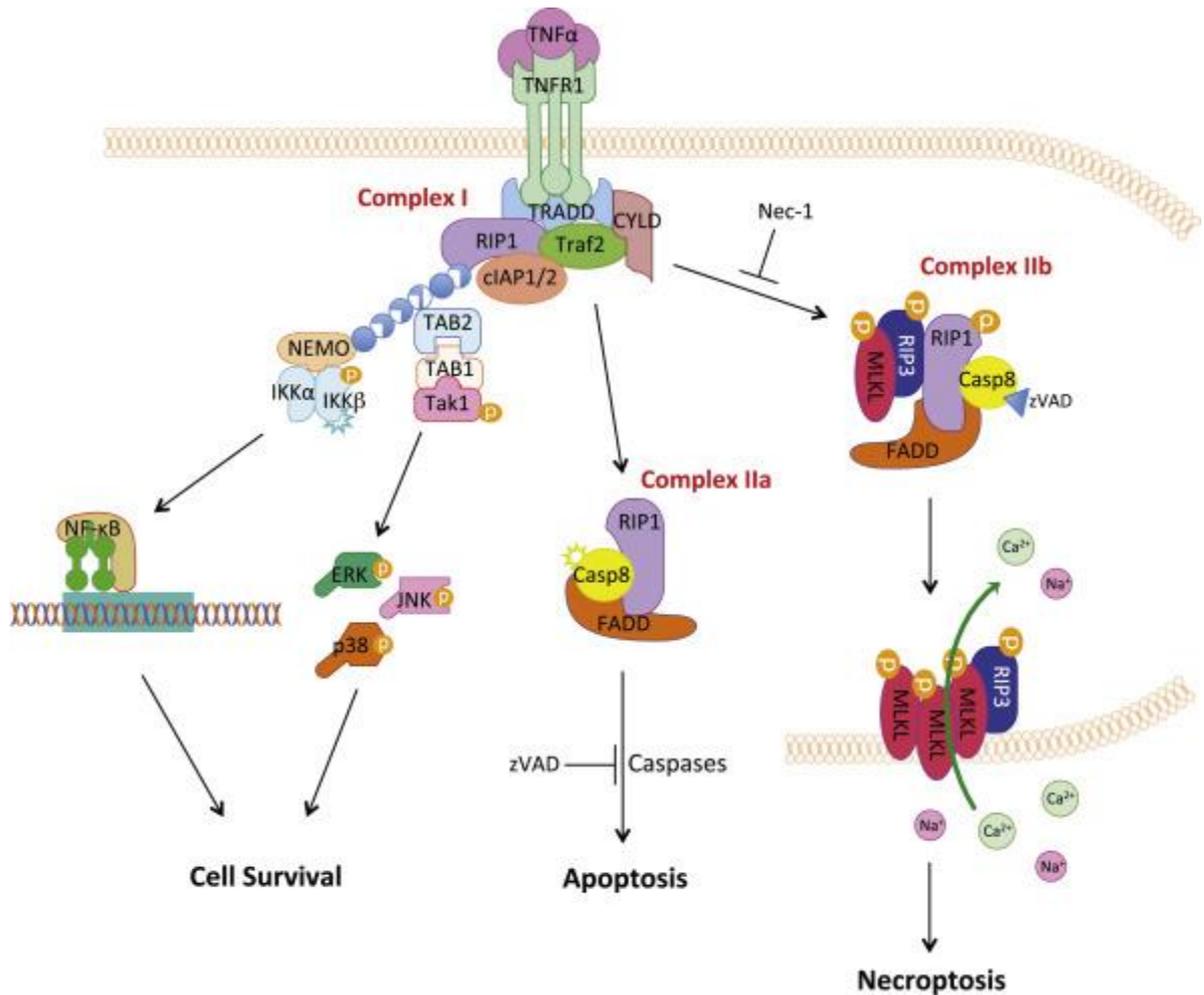


Figure 4 Les voies de signalisation régulées par le TNF-R1 (Zhou. W. et Yuan J., 2014).

2. Induction et signalisation de la nécroptose

Suite à une infection virale, les cellules sont capables d'induire leur apoptose afin de diminuer la réplication et la dissémination du virus. Cependant certains de ces virus ont pu développer des stratégies d'évasion via la production de protéines inhibant l'activation des caspases. L'évolution a conduit l'hôte à s'adapter à ce mécanisme par le développement d'un autre mode de mort cellulaire, la nécroptose (Humphries et al., 2015; Silke et al., 2015). [32,33]

La nécroptose peut également être induite par le TNF- α , lorsque les caspases, et plus particulièrement la caspase 8 sont inhibées et en présence de molécules appelées Second mitochondrial activator of caspases (Smac) mimétiques qui ont la capacité de bloquer les protéines "cellular inhibitor of apoptosis" (cIAP) 1 et 2 et "X-linked Inhibitor of Apoptosis" (XIAP). Depuis, l'utilisation d'inhibiteurs chimiques et de souris knockout a permis d'associer la nécroptose à diverses pathologies. [17]

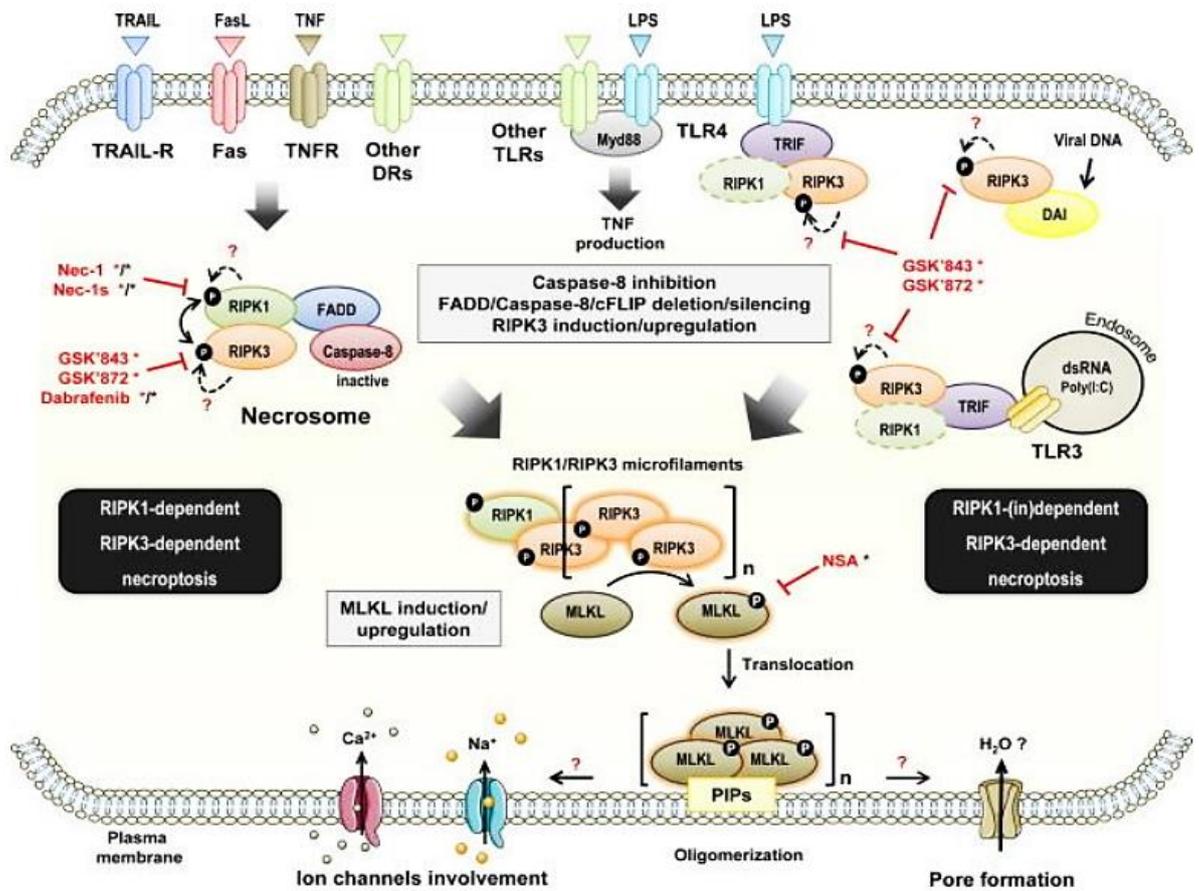


Figure 5 Voies de signalisation conduisant à l'activation de la nécroptose.
(Jouan-Lanhouet *et al.*, 2014)

III. Les maladies induites par la nécroptose

La découverte révolutionnaire que la nécroptose est un processus génétiquement contrôlé a conduit à l'hypothèse que cette mort cellulaire programmée est « pharmacopotentielle », une percée émergente qui pourrait permettre des avancées significatives dans la médecine clinique quotidienne. [34] En effet, les cibles moléculaires, y compris RIPK1, RIPK3 et MLKL, se sont révélées impliquées dans de multiples modèles de maladies où la nécroptose présente un intérêt physiopathologique central. [35,36]

1. Nécroptose et Inflammation

La nécroptose est considérée comme étant pro-inflammatoire [37]. Les études animales ont révélé une implication critique de la nécroptose dans la pathogenèse des maladies inflammatoires. Il a également été démontré que la nécroptose conduisait à la libération de structures moléculaires associées à des dommages (DAMP). [38]

Les DAMP dans le milieu extracellulaire déclenchent l'activation du système immunitaire et initient l'inflammation. La protéine de groupe à mobilité élevée B1 (HMGB-1) est une molécule

typique de DAMP qui initie l'inflammation par l'intermédiaire de récepteurs toll-like, TLR-2 et TLR-4. [39]

Lau et al. ont démontré que la nécroptose à médiation RIPK1 / RIPK3 régule la libération de HMGB-1. [40] Des études plus approfondies doivent être menées pour identifier les DAMP spécifiques de la nécroptose, qui permettraient de mieux interpréter le rôle de la nécroptose dans l'inflammation des tissus et fourniraient de nouvelles cibles thérapeutiques pour les maladies inflammatoires. [41]

2. Nécroptose dans les lésions organiques

De nombreuses études de laboratoire démontrent qu'une lésion organique aiguë ou chronique peut entraîner une nécroptose. [42]

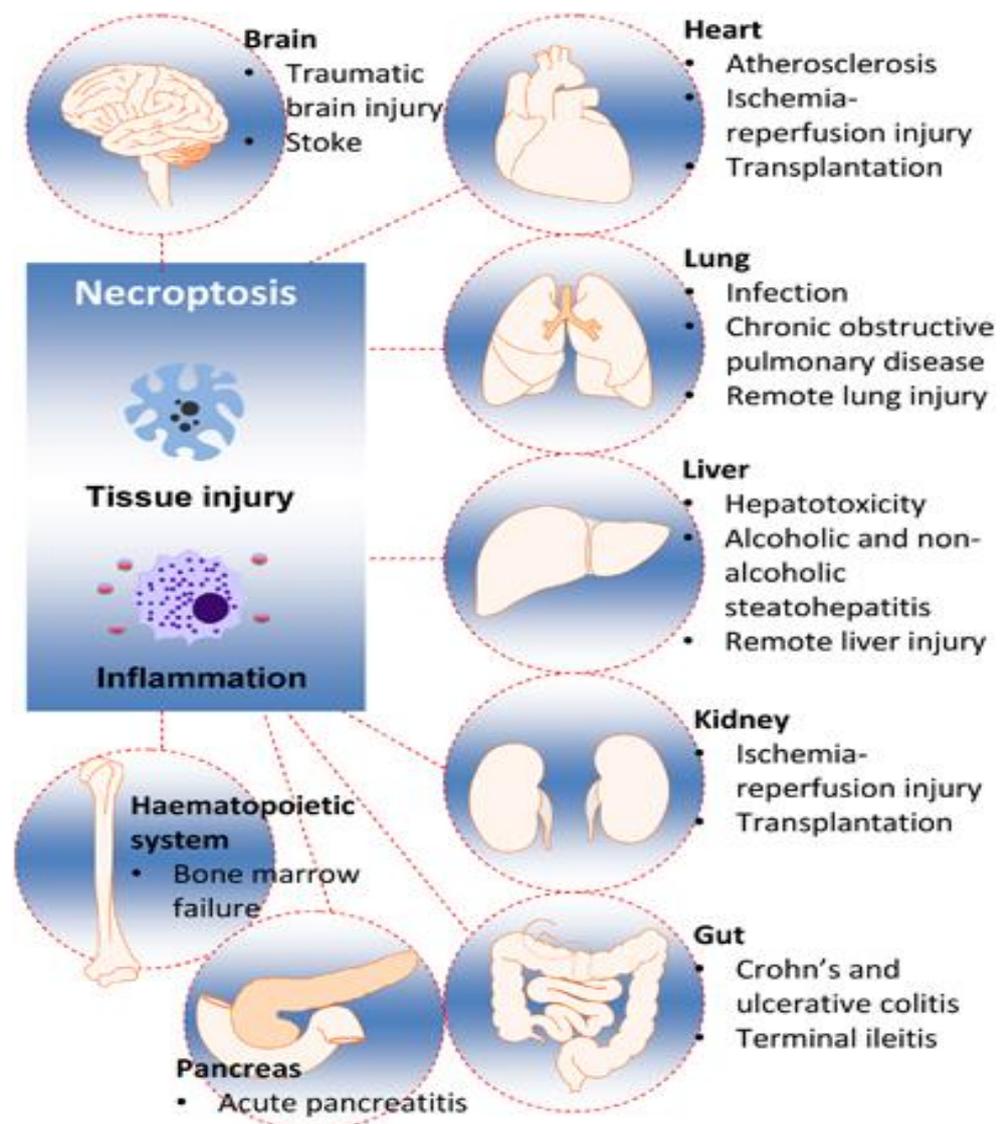


Figure 6 La nécroptose dans les lésions organiques (Zhao. H., 2015)

2.1 Cerveau

➤ Accident Vasculaire Cérébral ischémique

La pertinence pathologique de la nécroptose dans le contexte d'un AVC ischémique a été établie dans une étude de **Degterev et al.** [34] Dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale transitoire, il a été démontré que la nécroptose contribuait au retard de la lésion cérébrale ischémique. De plus, l'administration intracérébroventriculaire de Necrostatin-1 a nettement diminué le volume de l'infarctus, ce qui indique un potentiel thérapeutique d'accident vasculaire cérébral.

➤ Accident Vasculaire Cérébral hémorragique

Bien que le rôle de la mort cellulaire nécroptotique après un AVC hémorragique reste inexploré [43], l'effet protecteur potentiel de la nécrostatine-1 sur cet AVC a récemment été étudié. Dans un modèle murin d'hémorragie intracérébrale [44], l'administration de nécrostatine-1 réduisit considérablement le volume d'hématome, la mort des cellules neuronales, l'*astrogliosis* réactive et les lésions neurovasculaires. Les résultats neurologiques ont été significativement améliorés après le traitement par la nécrostatine-1.

➤ Maladie neurodégénérative

La nécroptose a été impliquée dans la médiation de l'excitotoxicité neuronale, associée à la neuro-dégénérescence chronique, telle que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. [45]

Le traitement par la nécrostatine-1 protège de l'*oxytosis* induite par le glutamate dans les cellules HT-22 de l'hippocampe.[46] En outre, l'excitotoxicité induite par N-méthyl-D aspartate (NMDA) a été réduite dans les neurones corticaux du rat par l'utilisation de la nécrostatine-1. [47]

Ils ont découvert que la molécule 24 (S) -hydroxycholestérol (24S-OHC) induisait la mort des cellules neuronales via la nécroptose dans une lignée de cellules de neuroblastome. [48] On trouve généralement le 24S-OHC comme éliminateur de cholestérol dans le cerveau, avec des niveaux accrus chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.[49] Le traitement des cellules avec la nécrostatine-1 a supprimé de manière significative la mort cellulaire induite par le 24S-OHC. Cela indique que des niveaux élevés de 24S-OHC pourraient conduire à une nécroptose de neurones et contribuer au développement de maladies neurodégénératives. [50,51]

2.2 Poumon

➤ Maladie pulmonaire obstructive chronique

La nécroptose a été décrite comme étant impliquée dans la maladie pulmonaire obstructive chronique. Le dysfonctionnement mitochondrial induit par la fumée de cigarette dans les cellules épithéliales ; et les cellules épithéliales du poumon ont présenté une expression accrue de RIPK3. [52]

Ces résultats impliquent que la nécroptose se produit dans les modifications emphysémateuses du poumon en réponse à l'exposition à la fumée de cigarette. Le rôle des mitochondries dans la nécroptose a été discuté plus en détail par **Tait et al.** qui ont démontré que la nécroptose est exécutée indépendamment de la transition de perméabilité mitochondriale. [53]

2.3 Rein

➤ Ischémie rénale - lésion de reperfusion

Des travaux récents ont également mis en évidence la pertinence de la nécroptose dans les lésions rénales aiguës ischémiques (AKI), en particulier la lésion d'ischémie-reperfusion rénale (IRI rénale). [54]

Il a été démontré que la nécrostatine-1 protège de l'IRI rénale, ce qui suggère que la nécroptose dépendante de RIPK1 est présente et dévoile un intérêt fonctionnel dans l'évolution physiopathologique de l'atteinte rénale ischémique. [55]

Cette étude a indiqué l'absence de contribution apoptotique à la détérioration de l'insuffisance rénale ischémique aiguë. Pour exclure les effets potentiellement indésirables de la nécrostatine-1 et des fonctions non nécroptotiques de RIPK3, l'inhibition potentielle de la nécroptose induite par RIPK1 par la nécrostatine-1, un composé stable et hautement spécifique de la kinase RIPK1, reste à étudier. Les études préliminaires n'indiquent pas d'effet protecteur des nécrostatines 1 dans ce même modèle. L'investigation des souris knock-in RIPK1-kd (kinase morte) devrait actuellement clarifier cette question.

2.4 Cœur

➤ Athérosclérose

La nécroptose dépendante de RIPK3 dans des modèles murins d'athérosclérose a fait l'objet de recherches approfondies. [56]

Il a été démontré que RIPK3 avait une implication limitée dans le développement précoce de l'athérosclérose, mais avait un effet promoteur sur l'athérosclérose avancée. Le déficit en

RIPK3 réduit l'inflammation et l'infiltration des macrophages dans les lésions athéroscléreuses avancées.

➤ Ischémie cardiaque et infarctus

Il a été signalé que les nécrostatines inhibaient la mort cellulaire myocardique et réduisaient la taille de l'infarctus dans le cœur perfusé isolé. [57]

Dans une étude réalisée sur des cœurs de cobayes, **Koshinuma et al.** ont examiné l'effet de l'inhibition de la mort cellulaire nécroptotique et apoptotique sur la protection contre les lésions d'ischémie. Le traitement combiné de la nécrostatine-1, inhibiteur de la nécroptose, et de l'inhibiteur de l'apoptose, zVAD, a permis de réduire la taille de l'infarctus et une plus grande implication de la voie de la nécroptose médiée par RIPK1 a été démontrée. [58]

De plus, les souris déficientes en RIPK3 étaient fortement protégées dans un modèle d'infarctus du myocarde. [59]

Dans un modèle murin de lésion d'ischémie-reperfusion cardiaque (IRI cardiaque), l'administration de nécrostatine-1 a réduit la taille de l'infarctus, inhibé la phosphorylation de RIPK1 / RIPK3 et réduit significativement la mort cellulaire. Par conséquent, la nécrostatine-1 en tant que composé et RIPK3 en tant que cible thérapeutique suscitent actuellement un intérêt considérable de la part des sociétés pharmaceutiques. [60]

2.5 Tube digestif

➤ Colite ulcéreuse et maladie de Crohn

Il a été signalé que RIPK1 régularise l'homéostasie et supprime l'inflammation dans les tissus de la barrière en inhibant l'apoptose et la nécroptose des cellules épithéliales. [61]

Une étude chez des enfants atteints de maladie intestinale inflammatoire a montré que la nécroptose pouvait contribuer à son évolution en augmentant l'inflammation intestinale. [62]

L'étude de **Pierdomenico et al.** a révélé un résultat statistiquement significatif chez les enfants atteints de deux maladies intestinales principales, à savoir la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse. Les taux de RIPK3 ont augmenté tandis que ceux de la caspase-8 ont diminué, ce qui était un indicateur fort de la présence de nécroptose. Il est actuellement très suggestif de penser que la nécroptose est une cause d'inflammation chronique de l'intestin, qui pourrait dépendre de RIPK3 et de MLKL, ce qui pourrait expliquer le succès thérapeutique remarquable de l'infliximab (IgG1), un médicament interférant directement avec le TNF- α . [63,64]

2.6 Foie

➤ Hépatotoxicité

Le rôle de la nécrostatine-1 dans la protection des lésions des cellules du foie a récemment été étudié dans le modèle d'hépatotoxicité induite par l'acétaminophène (APAP). L'APAP induisait la phosphorylation de RIPK1 et donc la formation de nécrosomes, et la nécrostatine-1 bloquait efficacement la formation de nécrosomes au cours de l'hépatotoxicité induite par l'APAP via l'inhibition de RIPK1. [65]

2.7 Pancréas

➤ Pancréatite aiguë

Le déficit en RIPK3 a été publié dans deux rapports initiaux dans lesquels le rôle de RIPK3 était mis en évidence, [66] comme protection partielle contre la pancréatite induite par la céruléine (CIP), ce qui suggère que la pancréatite nécrosante pourrait être atténuée par une interférence pharmacologique de cette voie. [67]

Cependant, d'autres groupes, qui avaient l'intention de reproduire ce résultat, ne l'ont pas fait et ont en fait observé des lésions plus graves aux organes en présence de nécrostatine-1. [68] Récemment, le même groupe a également décrit le fait que les souris déficientes en RIPK3 ne sont pas protégées contre la CIP.[69] Cependant, une déficience en MLKL chez une souris knock-out nouvellement générée s'est de nouveau avérée responsable de la protection du modèle CIP. [70]

Chapitre II

La RIPK1

&

ses inhibiteurs

La nécroptose est induite par l'activation des récepteurs cellulaires T, [71] des récepteurs de l'interféron, [72] des stress métaboliques et génotoxiques cellulaires, ou de divers agents anticancéreux. [73] Notamment, par la liaison d'un ligand sur les récepteurs membranaires de mort TNF α « facteur de nécrose tumorale » elle peut également être induite par d'autres membres de la famille des ligands de la mort du TNF α (Fas et TRAIL / Apo2L), ou TLR .

La liaison du TNF α au TNFR1 (récepteur du TNF α) provoque une trimérisation du TNFR1 et la formation d'un complexe intracellulaire « le Complexe-I ».

Le complexe-I est ensuite modifié par les IAP (inhibiteurs de protéines de l'apoptose) et le LUBAC (complexe d'assemblage d'ubiquitination linéaire), qui génèrent des liaisons linéaires d'ubiquitine. Ce qui conduit à l'activation de NF-KB, qui à son tour active l'expression de la protéine inhibitrice FLIP-like qui inhibe la protéine FLIP pour se lier ensuite à la caspase-8. [74] L'inhibition de la caspase permet à RIPK1 et à RIPK3 de s'autotransphosphoryler mutuellement, formant un autre complexe appelé le nécrosome.

Le nécrosome commence à recruter la protéine MLKL (protéine de type domaine mixte), L'une des cibles importantes de RIPK3 qui s'oligomérisent et forme des pores dans les membranes intracellulaires et la membrane plasmique, compromettant ainsi l'intégrité membranaire et conduisant à la mort cellulaire. [75]

1. La Structure de la RIPK

Cette protéine appartient à la famille des kinases RIP (Receptor Interacting Protein), composée de 7 membres, RIPK1 étant le premier membre de la famille. [76]

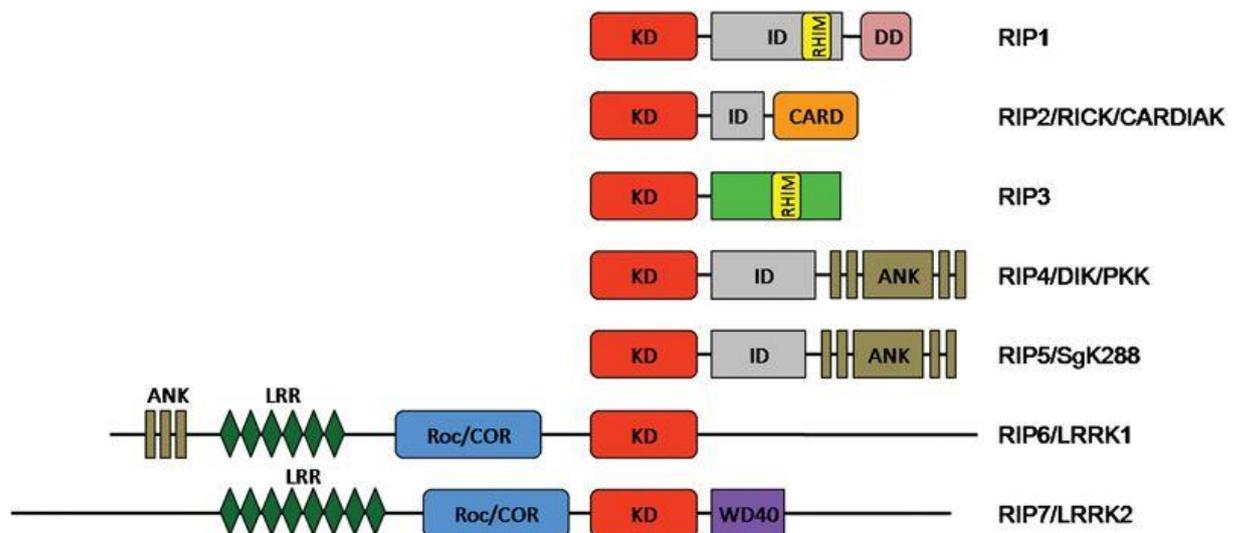


Figure 7 La famille des kinases RIP (Duanwu Zhang *et al.*, 2010)

La protéine RIPK1 est composée de 671 acides aminés et a un poids moléculaire d'environ 76 kDa. Elle contient un domaine sérine / thréonine kinase (KD) dans le N-Terminal (300 AA) ;

un domaine de mort (DD) dans le C-Terminal (112 AA) et une région centrale entre le KD et le DD appelée domaine intermédiaire (ID). [77]

- **Le domaine kinase** joue différents rôles dans la survie cellulaire et est important dans l'induction de la nécroptose. La RIP interagit avec TRAF2 via le domaine kinase. Le KD peut également interagir avec la nécrostatine-1. [78] La surexpression de l'activité kinase manquante de la RIP peut activer le NF- κ B.

- **Le domaine de la mort** est homologue au DD d'autres récepteurs tels que Fas, TRAILR2 (DR5), TNFR1 et TRAILR1 (DR4), de sorte qu'il peut se lier à ces récepteurs, ainsi qu'à TRADD et FADD dans le complexe de signalisation TNFR1. la surexpression du domaine de mort RIP peut bloquer l'activation de NF- κ B par TNF-R1. [79]

- **Le domaine intermédiaire** est important pour l'activation de NF- κ B et la signalisation dépendante de (RHIM). Par l'intermédiaire du domaine intermédiaire, la RIP peut interagir avec TRAF2, NEMO, RIPK3, ZBP1. [80]

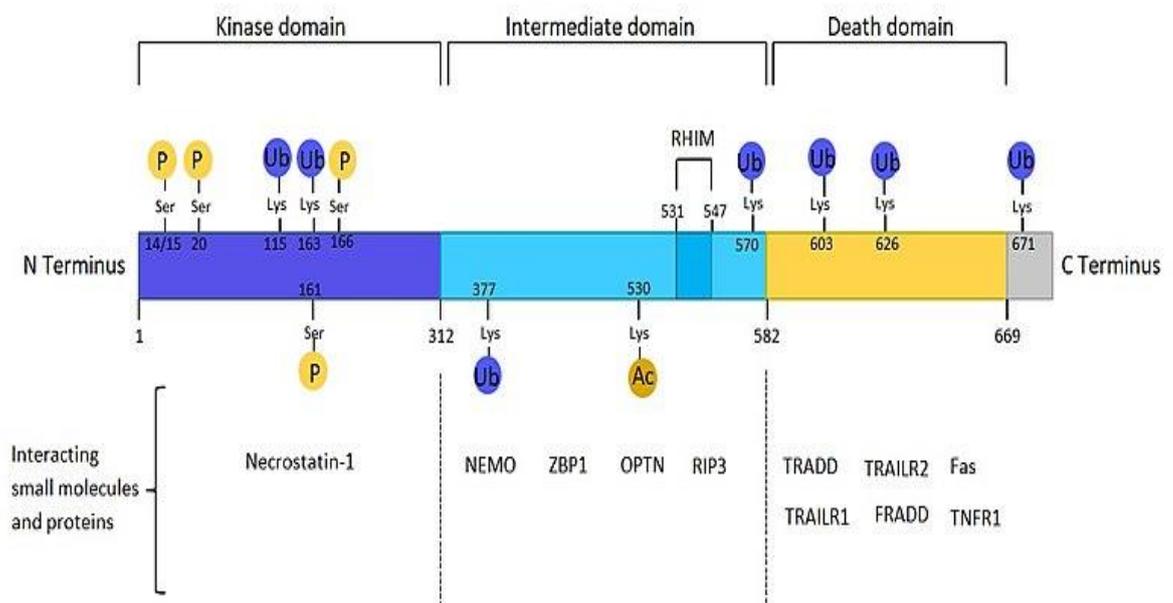


Figure 8 Le domaine structurel de la RIPK1 (<https://www.revolvy.com/page/RIPK1?cr=1>; consulté le : 10/06/2019)

2. Le gène RIPK1

La protéine kinase 1 "RIPk1" interagissant avec les récepteurs est une sérine / thréonine protéine kinase. C'est un régulateur de la signalisation cellulaire qui intervient, entre autres, dans la médiation des voies de mort cellulaire programmée, par exemple la nécroptose.

Elle est codée par le gène RIPK1, situé sur le chromosome 6. [81]

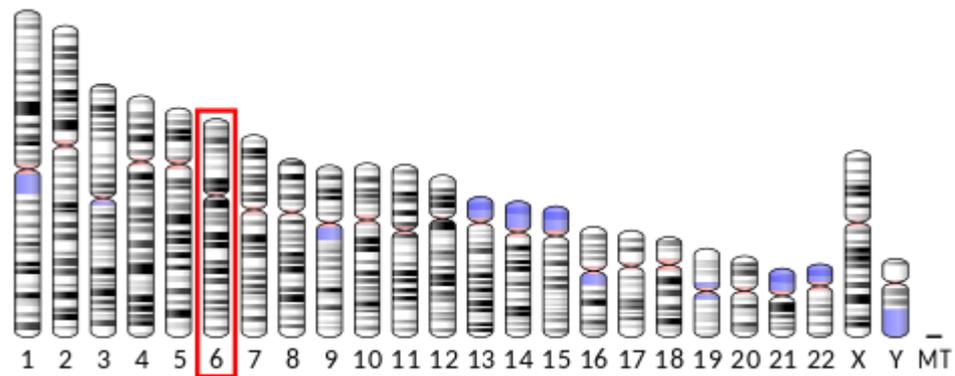


Figure 9 Idéogramme chromosome humain (<https://www.revolvy.com/page/RIPK1?cr=1>
Consulté le : 10/60/2019)

3. Le mécanisme responsable de la mort cellulaire

La voie de signalisation classique impliquant des protéines commence par l'activation de la kinase RIPK1 qui va favoriser l'oligomérisation et l'autoactivation de RIPK3. RIPK3 activée conduit à la phosphorylation de MLKL, une protéine capable de s'attacher à la membrane plasmique et de favoriser la libération du contenu intracellulaire. [82] La nécroptose est inhibée par la nécrostatine, un inhibiteur de la kinase RIPK1.

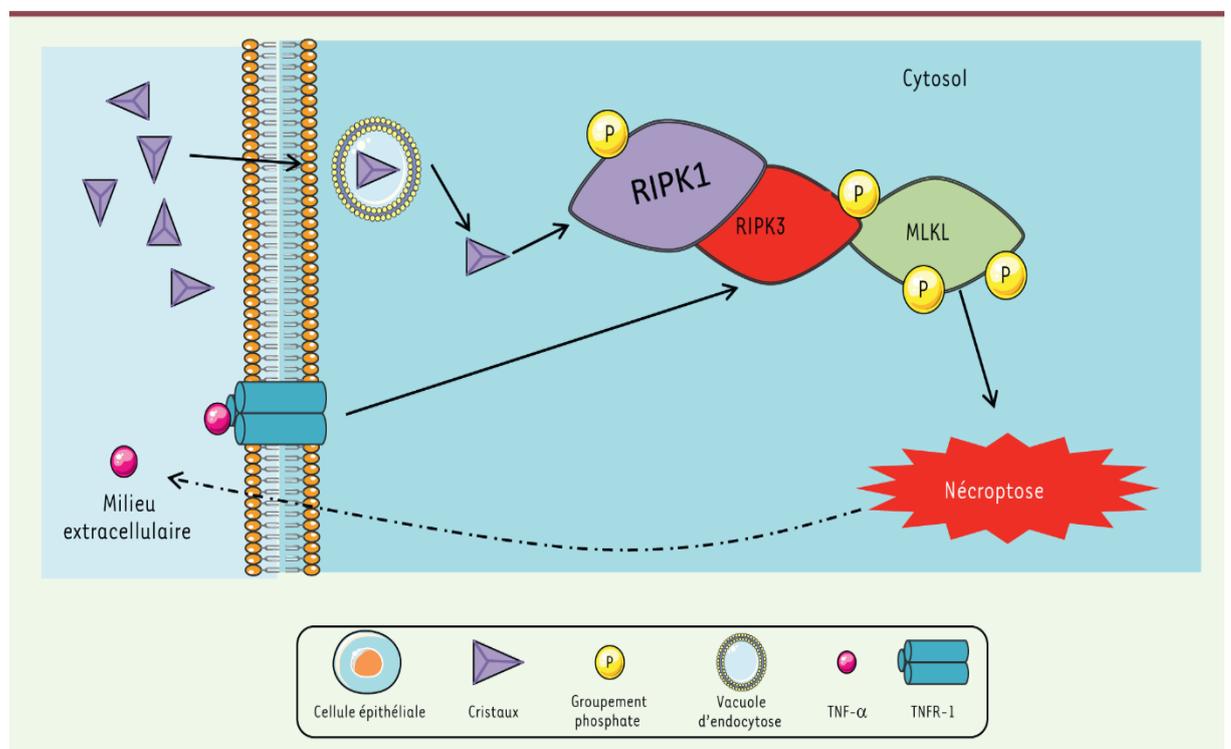


Figure 10 Le mécanisme responsable de la mort cellulaire (Diana García García *et al.*, 2016)

- **Mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL)**

C'est une protéine qui est codée par le gène MLKL. Ce gène appartient à la superfamille des protéines kinases.

Cette protéine joue un rôle essentiel dans la nécroptose induite par le facteur de nécrose tumorale (TNF), un processus de mort cellulaire programmée, via une interaction avec la protéine 3 à interaction de récepteur (RIP3), molécule clé de signalisation dans la voie de la nécroptose. Les études sur les inhibiteurs et l'inactivation de ce gène ont inhibé la nécrose induite par le TNF. [83]

Les MLKL ont été phosphorylés par RIP3 au niveau des résidus thréonine 357 et sérine 358, et ces événements de phosphorylation étaient critiques pour la nécroptose.

- **La sérine-thréonine kinase 3 (RIP3)**

La RIPK3 interagissant avec les récepteurs est une molécule clé de signalisation dans la voie de la nécrose programmée (nécroptose). Cette voie joue un rôle important dans diverses conditions physiologiques et pathologiques, notamment le développement, la réponse aux dommages tissulaires et l'immunité antivirale. Nous rapportons ici l'identification d'une petite molécule appelée (E)-N-(4-(N-(3-méthoxy-pyrazin-2-yl) sulfamoyl) phényl)-3-(5-nitrothiophène-2-yl) acrylamide — ci-après dénommée nécosulfonamide, qui bloque spécifiquement la nécroptose en aval de l'activation de RIP3. Une sonde d'affinité dérivée du nécosulfonamide et de la co-immunoprécipitation utilisant des anticorps anti-RIP3 a identifié

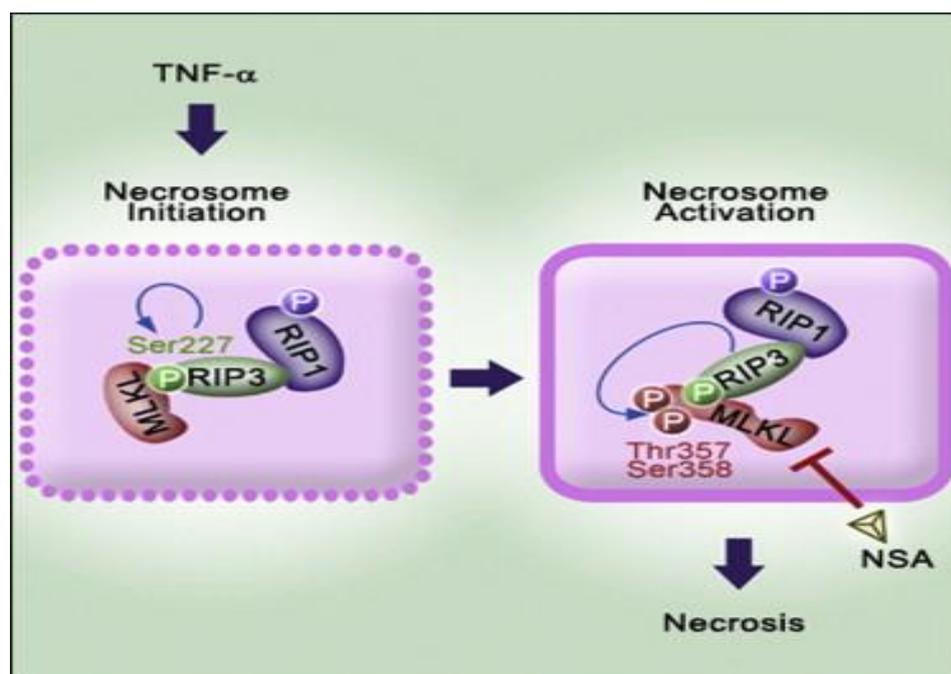


Figure 11 Les clés de la signalisation de nécrose (<https://picswe.net/pics/rip3-kinase-75.html>; consulté le : 01/07/2019)

la protéine de type domaine de kinase de lignée mélangée (MLKL) en tant que cible en interaction. Le traitement de cellules avec du nécrosulfonamide ou l'élimination de l'expression de MLKL a arrêté la nécroptose à une étape spécifique à laquelle RIP3 a formé des ponctions discrètes dans les cellules. Ces résultats impliquent MLKL en tant que médiateur clé de la signalisation de nécroptose en aval de la kinase RIP3. [84]

4. Les inhibiteurs de la RIPK

Les nécrostatines, une série d'inhibiteurs à petites molécules, suppriment la nécroptose en inhibant spécifiquement l'activité de la RIP1 kinase. La structure de RIP1 et les mécanismes par lesquels les nécrostatines inhibent RIP1 restent inconnus. Les structures cristallines du domaine de la kinase RIP1 liées individuellement à l'analogue de la nécrostatine-1, à l'analogue de la nécrostatine-3 et à la nécrostatine-4 ont été identifiées.

La nécrostatine, mise en cage dans une poche hydrophobe entre les lobes N et C du domaine kinase, stabilise RIP1 dans une conformation inactive par le biais d'interactions avec des acides aminés hautement conservés dans la boucle d'activation et les éléments structuraux environnants. Cette étude fournit une base structurelle à l'inhibition de la RIP1 par les nécrostatines et offre des perspectives sur la conception potentielle de médicaments basés sur la structure. [85]

4.1 La sibiriline

La Sibiriline, une nouvelle molécule synthétique inhibant la mort cellulaire par nécrose régulée Ce travail a été mené à partir de sa collection qui compte plus de 18 000 molécules. Les applications en thérapie humaine sont nombreuses et concernent notamment les conséquences de chocs ischémiques.

La molécule a été testée *in vivo* et a protégé significativement la souris d'une forme d'hépatite auto-immune. Sibiriline se réfère au nom de la commune Sibiril (côte nord du Finistère).

De plus, Sib inhibe la mort cellulaire nécroptotique induite par divers ligands de mort dans des cellules humaines ou de souris tout en ne protégeant pas de l'apoptose dépendante de la caspase.

En utilisant des tests de liaison par compétition et des tests de kinase recombinante, il a été démontré que Sib est un inhibiteur compétitif de RIPK1 plutôt spécifique.

L'analyse de l'amarrage moléculaire montre que Sib est piégé près du site de liaison à l'ATP de RIPK1 humain dans une poche relativement hydrophobe bloquant RIPK1 dans une conformation inactive.

Ces résultats révèlent que la petite molécule Sib est un nouvel inhibiteur de RIPK1 potentiellement intéressant pour le traitement de l'hépatite immuno-dépendante. [86]

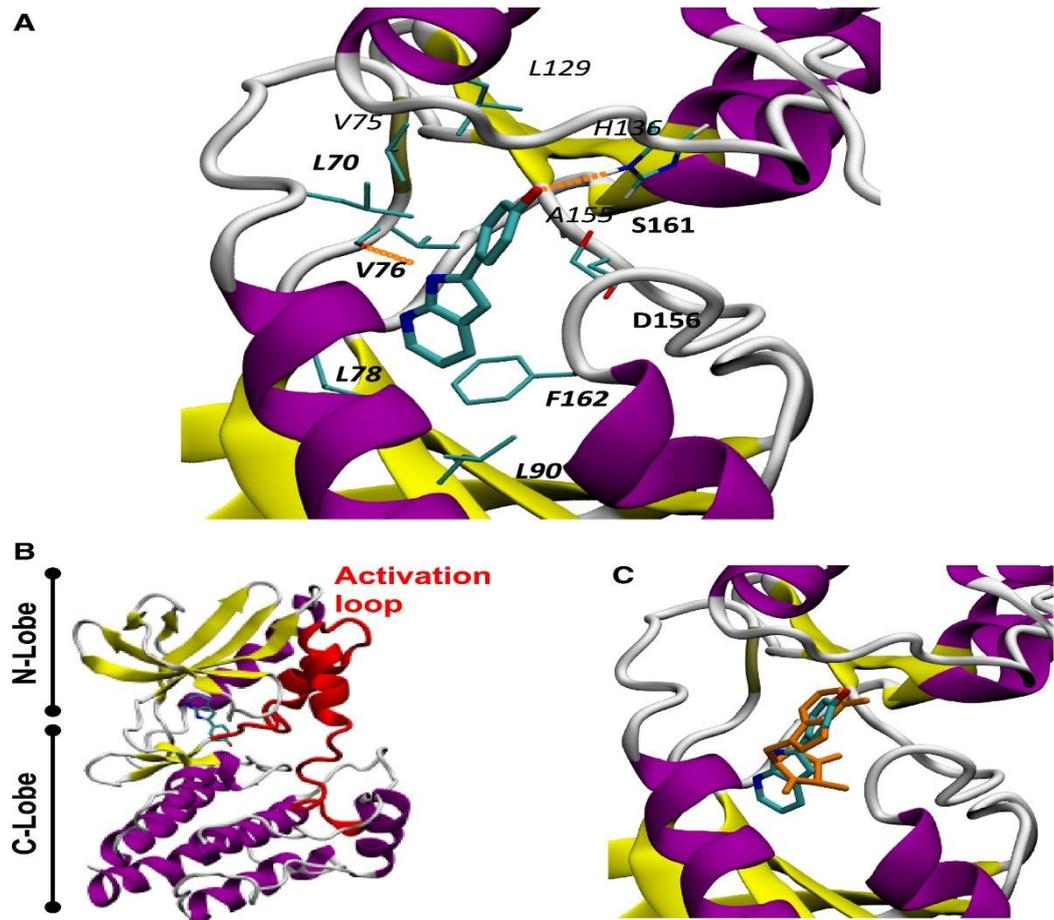


Figure 12 La sibiriline interagit à proximité de la poche de liaison RIPK1 ATP (Fabienne Le Cann. F et al., 2017)

- (A) Vue rapprochée de l'interaction entre Sib et les résidus environnants dans RIPK1 indiquant les résidus de contact déterminés après optimisation de la meilleure position de Sib obtenue par docking.
- (B) Vue de la structure globale de RIPK1-Sib en soulignant le contact de pontage réalisé par Sib entre les deux sous-domaines protéiques. La boucle d'activation définie par les résidus Asp156 à Glu196 est représentée en rouge.
- (C) Superposition du modèle à la structure de rayons X 4ITH obtenue pour le complexe formé de Nec-1 (bâtonnets orange) avec RIPK1. [87]

4.2 Le 6E11

Pour la découverte d'un nouvel inhibiteur moléculaire puissant de la nécroptose « 6E11 », un test de nécroptose induite par le TNF a été utilisé pour cribler une bibliothèque chimique. Parmi les molécules testées, le composé 6E11 s'est avéré le plus puissant pour bloquer la mort cellulaire nécrotique induite par le TNF avec une IC50 de 4,6 μ M ; 6E11 est un nouveau cœur d'optimisation structurale. Son analogue inactif 8A03 n'a montré aucune inhibition vis-à-vis de la mort cellulaire nécrotique.

6E11 est un dérivé de produit naturel « flavanone », car il s'agit d'un dérivé synthétique des 2,5-dihydroxy-2-phénylchroman-4-ones naturels, isolés à partir de bourgeons de *Populus nigra*.

Les structures chimiques de ces composés sont illustrées à la figure ci-dessous.

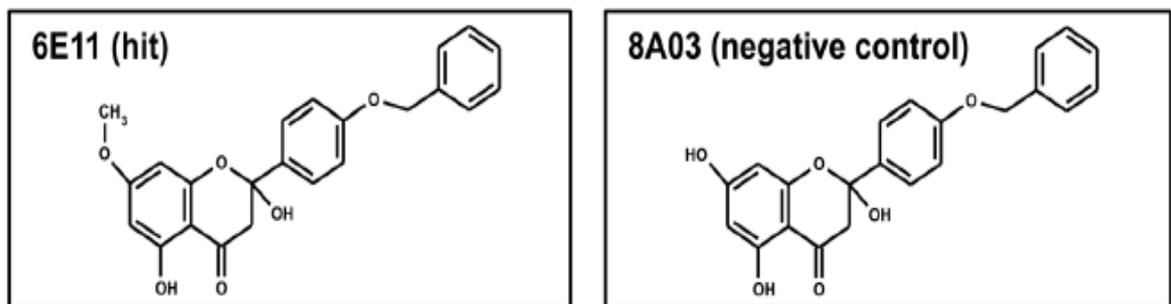


Figure 13 Caractérisation du composé 6E11 en tant que nouvel inhibiteur de nécroptose. (Claire Delehouzé, C et al., 2017)

- **6E11 est sélectif envers la nécroptose induite par le récepteur de mort :**

L'activité antinécroptotique de 6E11 a été démontrée par des mesures des taux intracellulaires d'adénosine triphosphate (ATP), de la perméabilisation de la membrane plasmique (% de cellules positives à l'iodure de propidium) et du potentiel transmembranaire mitochondrial dans les cellules vivantes.

La nécroptose a été induite par des déclencheurs nécroptotiques tels que le TNF- α , 6E11 a bloqué la nécroptose de manière dose-dépendante. De plus, 6E11 n'a pas sauvé les cellules WT Jurkat de l'apoptose induite par TRAIL. Ces résultats indiquent que 6E11 bloque la mort cellulaire nécroptotique mais non apoptotique et suggèrent que cette efficacité anti-nécroptotique est spécifique à l'espèce.

- **La cytotoxicité de 6E11**

6E11 a peu ou pas d'effet cytotoxique contre les leucocytes du sang périphérique humain (PBL) ou les cellules épithéliales pigmentaires rétiniennes humaines (RPE-1 hTERT).

Afin d'étudier l'activité 6E11 en tant qu'inhibiteur de nécroptose, ils ont étudié son efficacité après, plutôt qu'avant, l'induction de nécroptose. Le 6E11 protège de la nécroptose même après le début de la mort cellulaire.

- **La selectivité de 6E11**

6E11 est un inhibiteur hautement sélectif de la RIPK1 humaine parmi les protéines kinases. Il montre une forte affinité pour RIPK1 avec un K_d de 130 nM qui est sensible à la température.

- **La liaison de 6E11 avec RIPK1**

6E11 a un site de liaison putatif sur la fente de liaison à l'ATP de RIPK1. Les résidus de contact stables comprenaient six acides aminés clés, Lys30, Val47, Leu60, Leu78, Tyr88 et Leu90. Il y avait une amélioration du mode de liaison préférentielle identifié par des calculs d'ancrage. À partir de l'analyse des contacts les plus fréquents du composé avec la kinase, ils ont proposé que 6E11 devrait se lier à la RIP1 kinase par le biais d'interactions hydrophobes étroites et d'une liaison hydrogène non spécifique (HB), ainsi que d'autres interactions transitoires de HB observées au cours de la réaction.

Le site de liaison supposé de 6E11 est marqué d'un cercle bleu sur la figure.

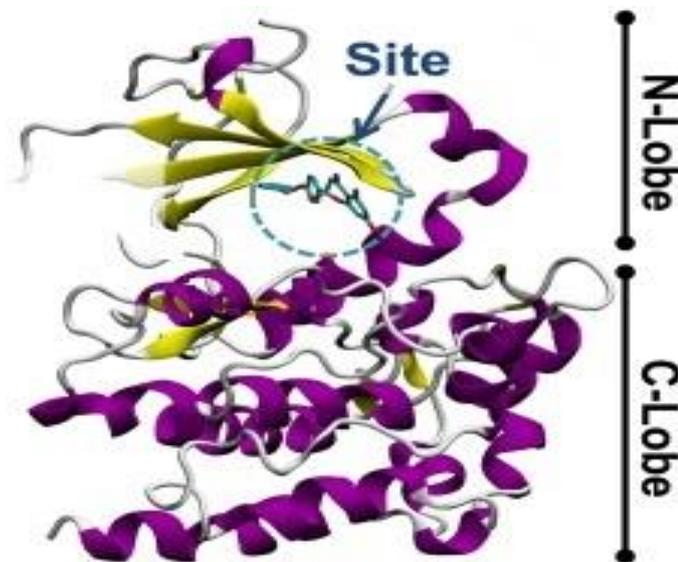


Figure 14 Site de liaison de 6E11 (Claire Delehouzé. *C et al.*, 2017)

Le 6E11 s'intègre parfaitement dans une fente alternative et putative entourée notamment par les résidus de la triade catalytique RIPK1: Lys45, Glu63 et Asp156. Cette fente de RIPK1 est principalement hydrophobe mais plus riche en accepteurs de liaisons hydrogène que la charnière de la kinase dans le site de liaison à l'ATP. Fait intéressant, ce modèle montre que 6E11 n'a aucune interaction avec la charnière kinase dans cette conformation de RIPK1, quelles

que soient les liaisons hydrogène. De plus, ce mode de liaison proposé pour 6E11 occupant une poche lipophile dans une fente près du site de liaison au substrat de RIPK1 indique que ce composé est probablement un inhibiteur de kinase de type III. [88]

4.3 1HX (Le complexe 4ITJ)

C'est une structure cristalline à 2 chaînes avec une séquence « Homo sapiens » de la kinase RIP1 en complexe avec la nécrostatine-4 (1HX). [89]

- **Informations sur l'inhibiteur « 1HX » :**

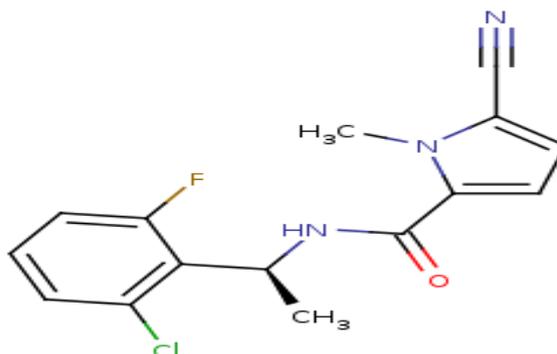


Figure 15 La structure moléculaire de 1HX(<http://www.rcsb.org/ligand/1HX> consulté le: 10/05/2019)

Le nom chimique	N-[(1s)-1-(2-Chloro-6-Fluorophenyl)ethyl]-5-Cyano-1-Méthyl-1h-Pyrrole-2-Carboxamide
La masse moléculaire	305.737 g/mol
la formule	C ₁₅ H ₁₃ ClFN ₃ O

- **Effet de résonance de 1HX :**

L'inhibiteur Nec-4 portant le code 1HX dans la PDB affiche dans sa structure une liaison peptidique connue pour son phénomène de résonance appelé aussi mésomérie ou conjugaison qui résulte de l'alternance de simples et de doubles liaisons. Deux doubles liaisons sont dites conjuguées si elles sont séparées d'une liaison simple. [90]

De ce fait la résonance est l'interaction entre certaines parties (**liaisons, atomes**) d'une structure, donnant lieu à la délocalisation de certains électrons (π ou n) qui met en évidence leur "libre circulation" sur une zone plus ou moins étendue, avec stabilisation par abaissement de leur niveau d'énergie. [91]

La stabilité offerte par le phénomène de résonance diminue le nombre de liaisons simples δ rotatives sur leurs axes qui génèrent plusieurs conformations possibles pour la même molécule compliquant ainsi les calculs informatisés du Docking.

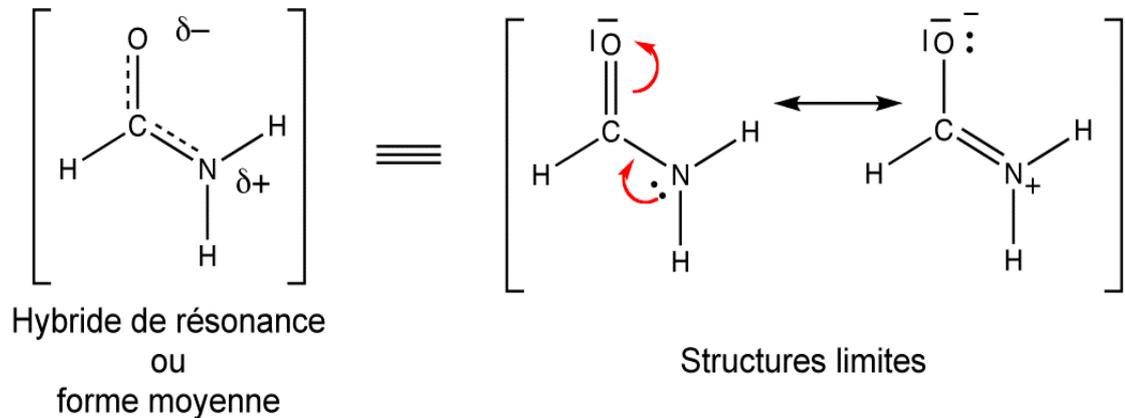


Figure 16 Exemple de la mésomérie du Formamide (Stephane.humbel. S., 2008)

- **RIP1 lié à Nec-4**

La nécrostatine, mise en cage dans une poche hydrophobe entre les lobes N et C du domaine kinase, stabilise RIP1 dans une conformation inactive par le biais d'interactions avec des acides aminés hautement conservés dans la boucle d'activation et les éléments structurels environnants.

Pour caractériser les activités des nécrostatines, ils ont reconstitué un test d'autophosphorylation (Degterev et al., 2008). En utilisant ce test, la nécrostatine-4 (Nec-4) a présenté des valeurs de CI50 d'environ 0,37 nM.

La structure cristalline du domaine de la kinase RIP1 liée à Nec-4 a été déterminée à 1,8 Å. La boucle P de RIP1 liée à Nec-4 occupe le même emplacement général que celui requis pour la liaison à l'ATP, ce qui explique pourquoi un nucléotide ne peut plus se lier à RIP1 liée à Nec-4.

La nécrostatine se lie dans une poche hydrophobe. Les interactions de Van Der Waals sont ajustées pour tenir compte des différentes structures chimiques des nécrostatines.

Nec-4 forme deux liaisons H avec l'oxygène carbonyle de l'Ile154 et l'azote amide de l'Asp156. Ces caractéristiques structurales conservées sont susceptibles de servir de guide important pour l'amélioration des inhibiteurs spécifiques de RIP1. Néanmoins, les groupes chimiques dans ces nécrostatines qui sont impliqués dans les interactions sont assez différents entre les différentes nécrostatines. [92]

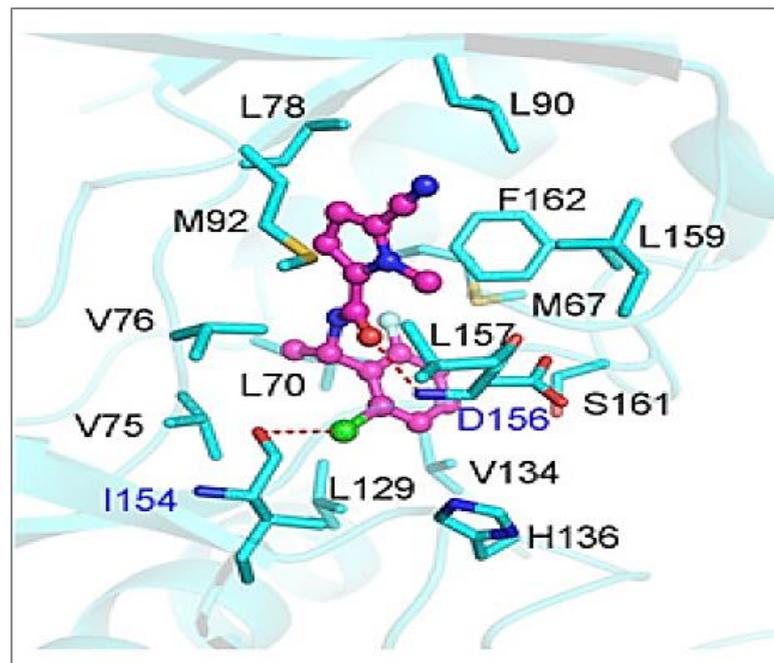


Figure 17 Structures de RIP1 lié à Nec-4 (Tian Xie *et al.*, 2013)

Chapitre III

Le docking moléculaire

1. Principe théorique

Docking (ancrage ou amarrage, en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire (cible de docking) dont la structure tridimensionnelle est connue et d'une petite molécule (ligand). [93] Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes : le docking proprement dit et le scoring.

- ❖ La première (le docking) est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interaction les plus favorables. Bien que pouvant être faite « manuellement », cette étape est le plus souvent exécutée de manière automatisée à l'aide d'algorithmes de docking, ce qui améliore la vitesse et la précision des simulations.
- ❖ La deuxième (le scoring) est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine dans chacun des complexes sélectionnés lors de l'étape précédente. Cette tâche est accomplie par des outils informatiques nommées fonctions de score. Celles-ci évaluent d'abord les différentes contributions énergétiques (et parfois entropiques) pour la stabilisation du complexe protéine-ligand, et ordonnent ensuite ces complexes, permettant ainsi l'identification des modes d'interaction les plus probables. [94]

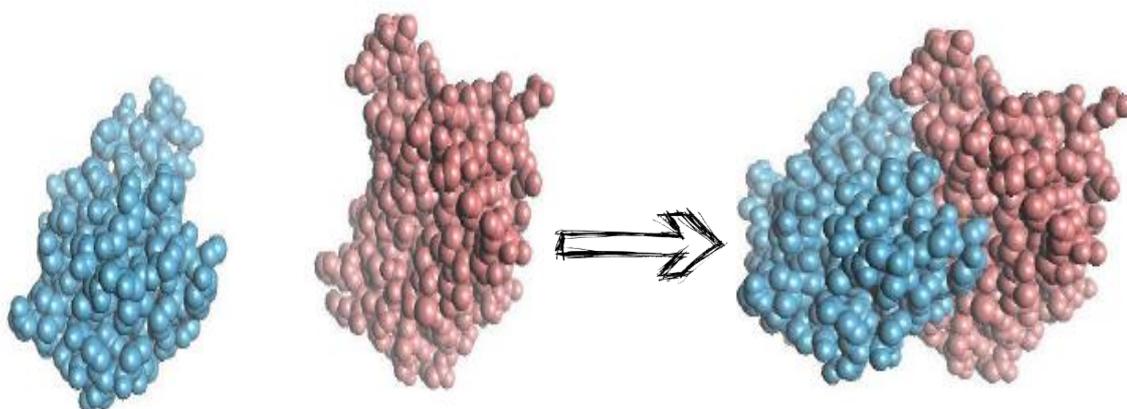


Figure 18 Docking protéine – ligand. (Mahdjoub Youcef ; Développement d'une application distribuée en utilisant la plateforme Jini « Application docking moléculaire »)

La résolution d'un problème de docking implique la combinaison entre un meilleur algorithme de recherche qui devrait créer un nombre optimum de configurations et une fonction de score qui sert à évaluer et filtrer ces configurations. [95]

2. Algorithmes de recherche

Les algorithmes de recherche permettant de traiter la flexibilité du ligand peuvent être classés en trois grandes catégories :

Les algorithmes de recherche systématique, les algorithmes de recherche aléatoire ou stochastique et les algorithmes de recherche déterministe ou de simulation. [96]

2.1 Recherche systématique

Les algorithmes de recherche systématique ont pour objectif d'explorer tous les degrés de liberté des ligands par rotation de 0 à 360° de toutes les liaisons rotatives à l'aide d'un pas incrémental choisi. En conséquence, le nombre de conformations ainsi générées peut être très grand. C'est ce qu'on appelle l'explosion combinatoire.

Deux types de méthodes peuvent être utilisés : des méthodes de recherche exhaustive et des méthodes de reconstruction incrémentale.

2.1.1 Les méthodes de recherche exhaustive

Permettent de mener un docking avec ligand flexible par des rotations systématiques de toutes les liaisons rotatives possibles du ligand à un intervalle donné. L'explosion combinatoire sous-jacente est limitée par définition de contraintes géométriques et chimiques à imposer aux conformations initiales des ligands à docker et les conformations ainsi sélectionnées sont finement affinées et optimisées. La première étape du protocole de filtres hiérarchiques de GLIDE [97] emploie un algorithme de recherche systématique exhaustive. [98]

2.1.2 Les méthodes de reconstruction incrémentale

Elles débutent par la fragmentation des ligands qui sont par la suite reconstruit de façon incrémentale dans le site actif. Si une liaison rotative de cette molécule est rompue pour obtenir deux fragments, cela élimine une liaison pour la recherche conformationnelle et les conformations des deux fragments sont indépendantes, ce qui réduit le nombre de conformations. [99]

Ces approches sont généralement divisées en 3 étapes :

- (1) identification de fragments rigides et de fragments flexibles.
- (2) les fragments rigides sont dockés dans le site actif.
- (3) les fragments rigides sont ajoutés incrémentalement. [100,101]

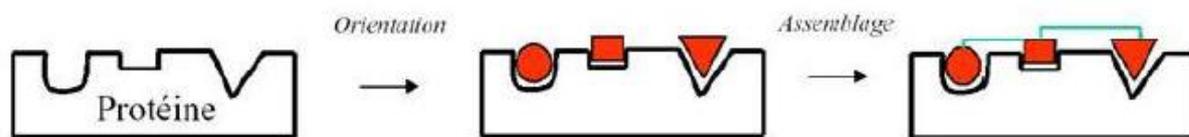


Figure 19 Docking par la méthode à base des fragments. (Mahdjoub Youcef)

2.2 Recherche aléatoire ou stochastique

Ses algorithmes procèdent à des changements aléatoires en termes de translations, rotations et torsions permettant de générer de nouvelles conformations de ligands. Les changements sont acceptés ou rejetés à l'aide d'une fonction de probabilité. [102] Quatre grands types d'algorithmes appartiennent à cette classe : les méthodes de Monte-Carlo, les algorithmes génétiques, les algorithmes de recherche tabou et les algorithmes d'optimisation en essaim. [103]

2.2.1 Les méthodes de Monte-Carlo

Elles débutent par la génération aléatoire d'une conformation initiale d'un ligand. Toujours de manière aléatoire, un changement conformationnel est opéré, que ce soit par une translation, une rotation ou une torsion. L'impact de ce changement évalué et une nouvelle conformation est retenue si elle présente une énergie plus basse que la précédente ou dans le cas contraire selon une fonction de probabilité dérivée de Boltzmann, appelée critère de *Metropolis*.

A partir de la nouvelle conformation ou de l'ancienne si la nouvelle a été rejetée, un changement aléatoire est à nouveau réalisé. Ces étapes sont ainsi répétées un certain nombre de fois, défini par le nombre de pas de Monte-Carlo. Le site de liaison est représenté par des cartes de grilles de potentiels de liaisons hydrogènes, de Van Der Waals, hydrophobe et électrostatiques pour réduire les temps de calculs. Ces cartes sont générées dans une boîte rectangulaire centrée sur le site de liaison. Un changement aléatoire (rotation, translation ou conformation) est imposé au ligand placé dans le site de liaison. Après minimisation, la conformation obtenue est soumise au critère de *Metropolis* pour décider de son acceptation ou de son rejet. [104]

2.2.2 Les algorithmes génétiques

Ils miment l'évolution biologique telle que décrite par la théorie de l'évolution de *Darwin* [105] à l'aide d'opérateurs génétiques que sont la sélection, la mutation et la recombinaison (ou « *crossover* »). Pour cela, plusieurs conformations initiales d'un ligand sont générées. Les combinaisons d'un ensemble de variables, par exemple angles de torsion, donneurs de liaisons hydrogène, accepteurs de liaisons hydrogène pour le logiciel GOLD [106], sont assimilées à des chromosomes. Une fonction de score appelée fonction de survie (ou « *fitness function* »)

permet de déterminer dans la population initiale les meilleures conformations qui constituent donc les chromosomes « parents ». Par application de mutation ou de recombinaison aux chromosomes, des changements respectivement ponctuels ou par échange de groupes de variables sont appliqués et de nouvelles conformations « enfants » sont obtenues

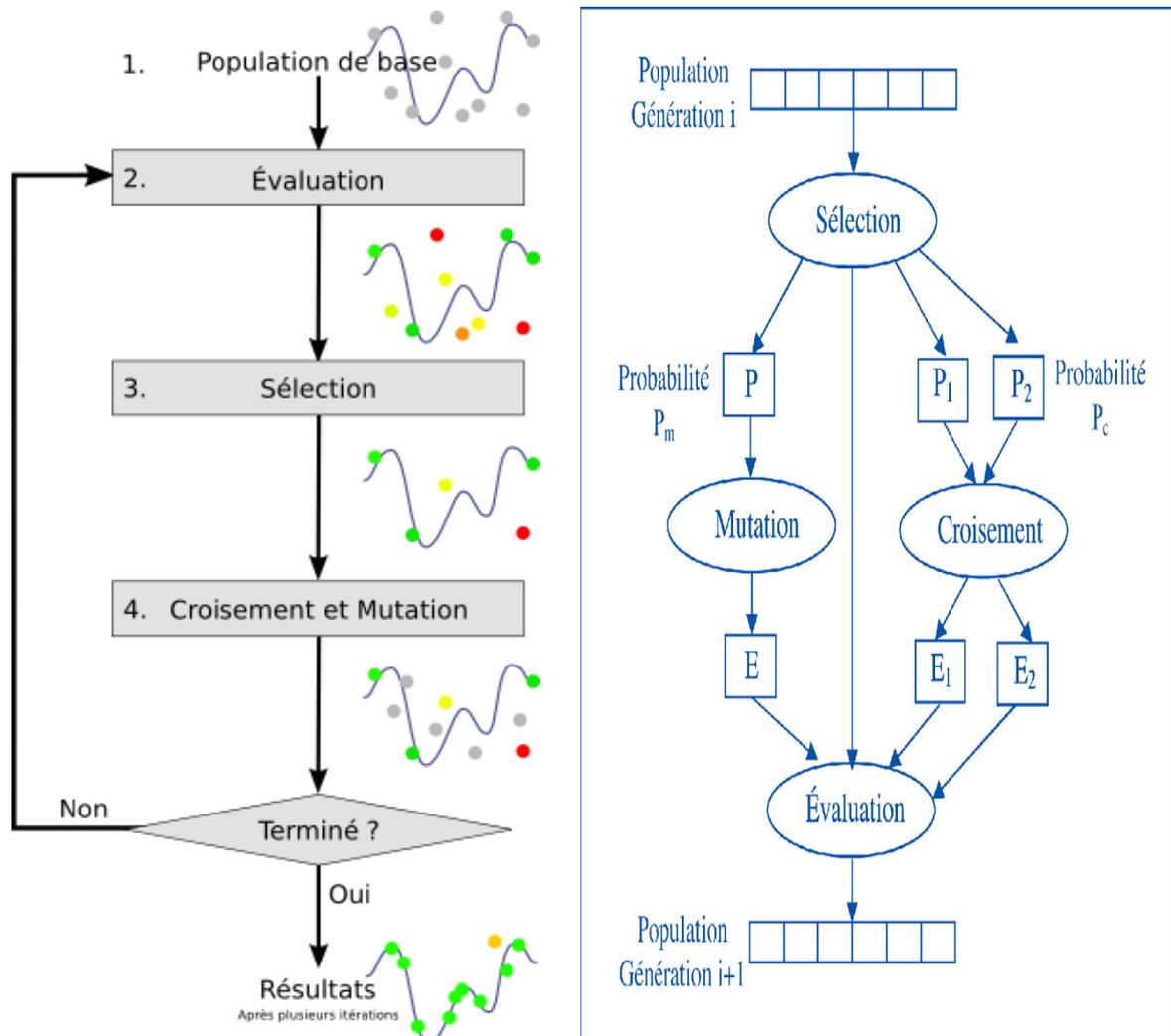


Figure 20 Principe général d'un algorithme génétique (Bayo, NoJhan., 2005 ; Ihsen Saad. I et al., 2009)

2.2.3 Les algorithmes de recherche tabou

Débutent par la détermination d'une position et d'une orientation aléatoire du ligand dans le site de liaison sur laquelle un nombre défini de changements vont être réalisés, par une procédure mimant des mutations par application de nombres aléatoires aux variables du docking. Ces changements sont ensuite évalués et triés à l'aide d'une fonction de score. Si le changement permet d'obtenir une énergie plus basse, il est immédiatement accepté et intègre la « liste tabou » regroupant les 25 meilleures solutions. Dans le cas contraire, la conformation est

comparée aux conformations précédemment acceptées et si la valeur de moyenne quadratique (ou Root Mean Square RMS) obtenue est supérieure à un seuil défini, le changement est accepté et intégré à la « liste tabou ». Dans le cas contraire, le changement est considéré comme tabou et éliminé. [107]

La Recherche Tabou

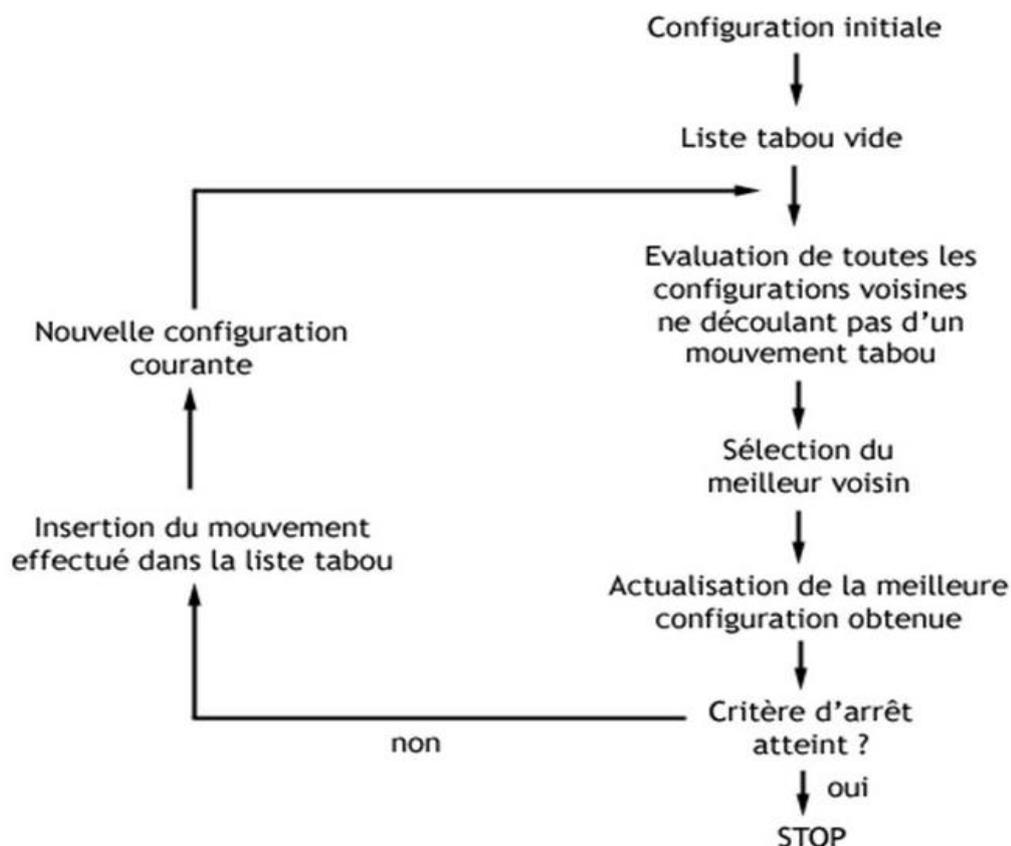


Figure 21 Principe général de la recherche tabou. (Hervé Rivano., 2010)

2.2.4 Les algorithmes d'optimisation par essais particuliers

Ou (Swarm Optimization algorithm), considèrent un ensemble de conformations d'un ligand. Chaque conformation est appelée une particule et l'ensemble, un essaim. Chaque particule subit des changements et retient en mémoire la meilleure position qu'elle a adoptée au cours du docking. Les mouvements du ligand à travers l'espace conformationnel sont ainsi guidés par les meilleures positions adoptées par ses voisins. [108]

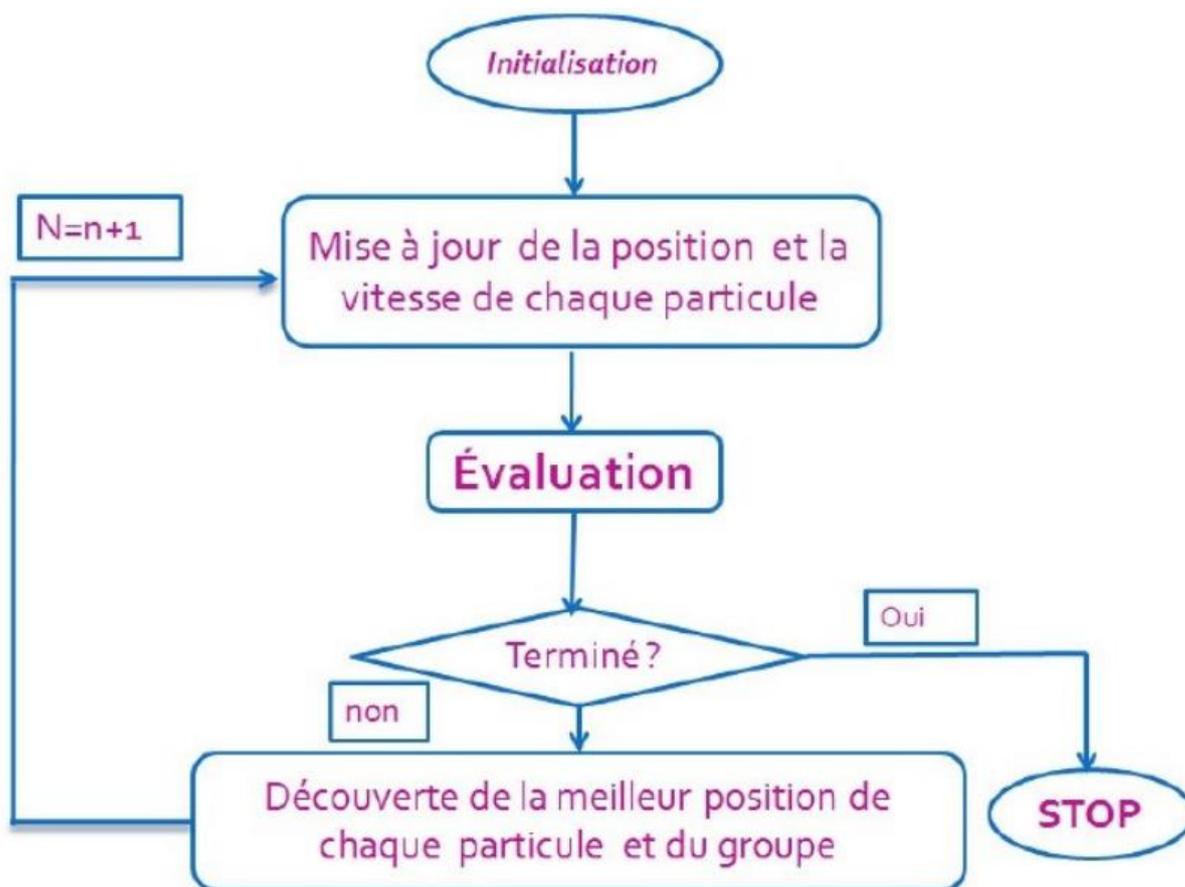


Figure 22 Algorithme d'optimisation par essais particulaires (BOUZID. A., 2008-2009)

2.3 Recherche déterministe ou de simulation

Les méthodes de recherche déterministe sont divisées en deux grandes classes : les méthodes de dynamique moléculaire et les méthodes de minimisation.

2.3.1 Les méthodes de dynamique moléculaire

Elles tentent de résoudre l'équation du mouvement d'un système atomique de Newton. Pour cela, la force de chaque atome est calculée à partir d'un changement dans l'énergie potentielle entre une nouvelle position et l'actuelle.

Les positions atomiques de chaque atome sont ensuite calculées à très courts intervalles de temps et permettent d'obtenir la trajectoire des changements de positions atomiques au cours du temps.

Malheureusement, avec des temps de calculs raisonnables, les méthodes de dynamique moléculaire ne sont généralement pas capables de franchir les barrières de hautes énergies et les ligands sont donc obtenus dans des conformations correspondant à des minimums locaux d'énergie. Cependant, différentes stratégies ont été développées pour pallier à ce problème. Malgré cela, les temps de simulation restent encore trop élevés pour pouvoir utiliser ces méthodes à large échelle lors d'un criblage virtuel. [93] Cependant, les approches de dynamique

moléculaire peuvent être employées sur un faible nombre de molécules à la fin d'un criblage virtuel pour optimiser la sélection des meilleurs composés.

2.3.2 Les méthodes de minimisation d'énergie

Ne permettent d'atteindre que des minimums locaux d'énergie. Elles ne sont donc pas utilisées seules mais plutôt en complément d'autres méthodes de recherche.

3. Principaux logiciels de docking

De nombreux logiciels de docking présentant des algorithmes de recherche et des fonctions de score variées ont été développées au cours du temps. [105]

Tableau 2 Quelques exemples de logiciels de docking (Lagarde. N., 2014)

Programme	Traitement du ligand	Recherche conformationnelle	Algorithme de recherche	Fonction de score
AutoDock	Flexible	Stochastique	Génétique	Basée sur les champs de force
Dock	Flexible	Systématique	Fragmentation / Reconstruction	Basée sur les champs de force
FlexX	Flexible	Systématique	Fragmentation / Reconstruction	Basée sur les connaissances
FRED	Rigide	Systématique	Recherche exhaustive	Basée sur les connaissances
Glide	Flexible	Stochastique	Monte Carlo	Empirique
Gold	Flexible	Stochastique	Génétique	Basée sur les champs de force
ICM	Flexible	Stochastique	Monte Carlo	Basée sur les champs de force
Surflex-Dock	Flexible	Systématique	Hammerhead modifié	Empirique
PRO_LEADS	Flexible	Stochastique	Tabou	Empirique

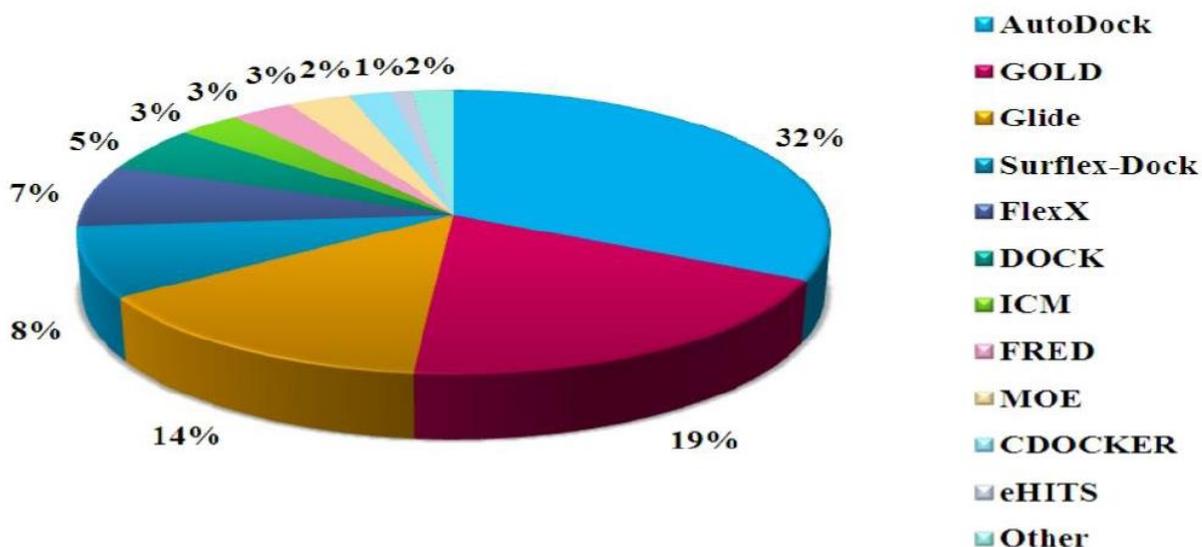


Figure 23 Utilisation des différents logiciels de docking en 2010-2011 (Yuriev. E et al., 2013)

3.1 Autodock

AutoDock emploie les méthodes Monte-Carlo, le Recuit Simulé et l'algorithme génétique Lamarckien (LGA) pour créer un ensemble de conformations possibles. LGA est utilisé comme optimiseur global et la minimisation d'énergie comme méthode de recherche locale. Les orientations possibles sont évaluées par le modèle AMBRE de champ de force en conjonction avec les fonctions de score d'énergie libre et un grand ensemble de complexes de protéine-ligand avec des constantes connues. La version 4 devrait contenir la flexibilité de chaîne latérale. AutoDock a des pages Web plus instructives que ses concurrents en raison de sa licence académique gratuite. [109]

L'AGL implanté dans la version 4.2.3 d'AutoDock, utilisé dans notre travail, est une méthode hybride basée sur un algorithme génétique couplé à une méthode de recherche locale reposant sur un algorithme optimisé par *Solis* et *Wets*. [110] L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'ajouter à l'algorithme génétique, la possibilité de modifier le phénotype suivant la fonction de score qui à son tour modifie le génotype. [111]

3.2 Surflex

Il utilise un algorithme de Hammerhead [112] modifié pour réaliser le docking flexible des ligands dans le site de liaison. La première étape du protocole de docking du logiciel Surflex-Dock consiste à générer un ligand idéal pour le site de liaison étudié, communément appelé «protomol». Pour cela, trois types de fragments (CH₄, C=O et N-H) sont placés dans de multiples positions dans le site actif et optimisés pour permettre l'établissement d'interactions

avec le site de liaison. Les fragments les mieux scorés sont assemblés pour former le protomol qui couvre l'intégralité du site actif.

Le docking en lui-même débute par la fragmentation des ligands en 1 à 10 parties par rupture

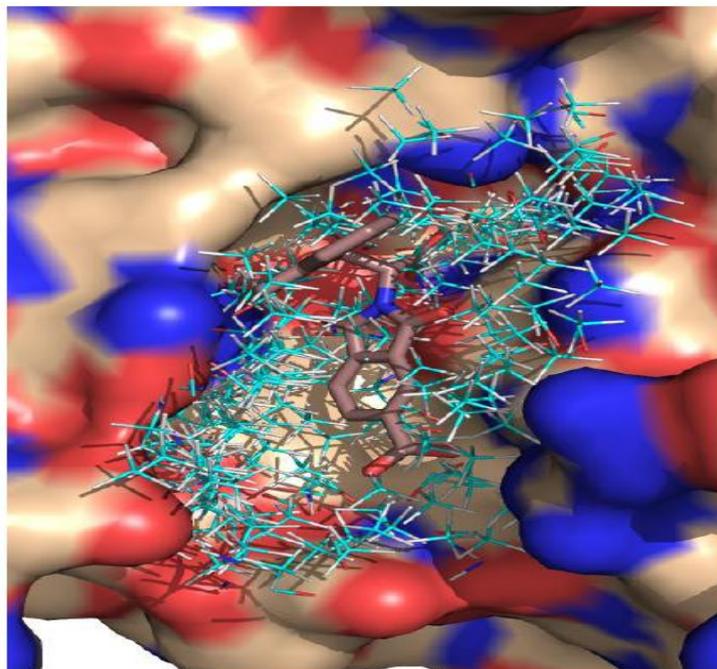


Figure 24 Protomol généré par Surfex (Lagarde. N., 2014)

de liaisons non aromatiques. Pour chaque fragment, une recherche conformationnelle est menée. Chaque conformation de chaque fragment est ensuite alignée au protomol par une fonction de similarité morphologique. [113] Les fragments ayant obtenu les meilleurs scores sont utilisés comme des têtes (ou « *heads* ») et sont localement optimisés pour s'adapter au mieux au site de liaison. Ensuite, un autre fragment, appelé queue (ou « *tail* ») est ajouté par alignement de toutes les conformations de ce fragment sur le protomol tout en respectant les contraintes de distance imposées par le fragment tête pour permettre la connexion entre les deux. L'attribution de scores permet ensuite de distinguer les poses entre elles.

4. Problématique liée aux méthodes de docking

De nombreux paramètres peuvent conduire à l'échec d'un criblage virtuel réalisé à l'aide d'une méthode de docking (Tableau 3). [114]

Tableau 3 Principales sources d'erreur lors d'un docking (Rognan. D., 2007)

Cause d'erreur	Traitement
Site actif dénué de cavité	Impossible ?
Flexibilité de la protéine	Très difficile
Influence de l'eau	Très difficile
Imprécision des fonctions d'évaluations	Très difficile
Flexibilité du ligand	Difficile
Mauvais jeux de coordonnées (protéine)	Facile
Mauvais types atomiques (ligand, protéine)	Facile

II - Partie Pratique

Chapitre I

Matériel

&

Méthodes

I. Matériel

1. Micro-ordinateur

Notre travail a été effectué en utilisant trois micro-ordinateurs dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau suivant :

Tableau 4 Les micro-ordinateurs utilisés et leurs caractéristiques

	Micro-ordinateur 1	Micro-ordinateur 2	Micro-ordinateur 3
Mémoire (RAM)	4,00 Go	1.00 Go	4,00 Go
Type du système	Système d'exploitation 64 bits	Système d'exploitation 32 bits	Système d'exploitation 64 bits
Processeur	Intel(R) Celeron (R) CPU N 3060 @ 1.60 GHz 1.60 GHz	Intel(R) Celeron (R) CPU 550 @ 2.00GHz 2.00 GHz	Intel(R) Core (TM) i3-6006U CPU @ 2.00GHz 2.00 GHz
Système d'exploitation	Windows 10 professionnel version 2018	Windows 7 édition intégral version 2009	Windows 10 professionnel version 2017

La réalisation des calculs de docking moléculaire a nécessité l'utilisation d'un ensemble de programmes informatiques, la consultation de plusieurs sites internet et certaines bases et banques de données.

2. Les banques (bases) de données et sites Internet

➤ **PDB (PROTEIN DATA BANK) : ou banque de données protéiques** à partir de laquelle nous avons téléchargé les complexes protéines-ligands sous format **.pdb** pour les calculs du RMSD et du score. Nous l'avons aussi interrogée pour quelques informations telles que : structure, résolution et méthodes de caractérisation des complexes, l'IC50 et le code des ligands ainsi que la classification s'il s'agit d'une enzyme.

➤ **Pubchem** : gérée par NCBI « Centre américain pour les informations biotechnologiques » [115] est une base de données chimiques qui nous a permis le téléchargement des **structures 3D** des similaires de notre ligand d'intérêt avec une extension

.sdf, elle donne aussi accès à plusieurs informations telles : le log P, le nombre de liaisons rotatives ainsi que le nombre de donneurs et d'accepteurs de liaison H.

➤ **Molinspiration** [116] : ce site présente des informations sur les propriétés ADME/Tox établies par les paramètres de la règle de cinq de Lipinski (poids moléculaire, les donneurs de liaison H, les accepteurs de liaison H, les liaisons rotatives et le log P).

3. Les programmes

Deux logiciels ont été utiles pour la séparation des molécules

➤ **Arguslab** : sa version 4.0.1 nous a été utile pour séparer les complexes téléchargés de la PDB.

➤ **Viewerlite4.2** : il a concerné la séparation des gros complexes qui n'ont pu être séparés par Arguslab.

Un logiciel pour la conversion des formats des molécules

➤ **Open Babel-2.4.2\obgui.exe** : nous a servi à la conversion des molécules séparées (enzyme et ligand) d'un format à un autre en tenant compte d'une protonation adéquate au pH physiologique.

La conversion concerne tous les types de formats de molécules (pdb, pdbqt, sdf, smiles, mol2....).

Deux logiciels pour le docking

➤ **Surflex version 1.3 (2005)** : qui exécute le docking selon deux méthodes ; une méthode incrémentale dite « Hammerhead » et une deuxième dite « molécule entière ». [117]

➤ **AutodockTools-1.5.6** : qui emploie les méthodes Monte-Carlo, le Recuit Simulé et l'algorithme génétique Lamarckien (LGA). [107]

Un logiciel pour le traçage de la courbe de corrélation

➤ **Excel (2013)** : il est utilisé pour tracer une courbe de corrélation et définir le coefficient de corrélation (r) entre le logarithme décimal de l'activité biologique que reflète la concentration inhibitrice 50 (log IC50) et leurs scores et cela pour chaque logiciel.

Deux logiciels pour la visualisation

L'observation et l'étude des interactions ligand - protéine ont été effectuées par l'utilisation de:

➤ **Biovia Discovery studio visualizer** : pour les résultats du docking effectué par les deux logiciels.

➤ **Vmd** : Pour visualiser la superposition des résultats du RMSD calculés par surflex et autodock.

Un logiciel pour la modélisation moléculaire

➤ **Titan 2.4** : il a permis la construction de nouvelles molécules en réalisant des mono et bi substitutions à notre ligand de référence afin d'obtenir des structures détenant des scores meilleurs.

Un logiciel pour calculer et évaluer les propriétés pharmacologiques ADME/Tox

➤ **DruLiTo [118]** : il calcule les propriétés physico-chimiques des molécules aux formats **.sdf** et **.mol** auxquelles il applique plusieurs filtres tels que la règle de Lipinski, Ghose filtre...etc ; pour évaluer la biodisponibilité orale « drug likeness » d'un futur candidat médicament.

II. Méthodes

1. Docking moléculaire

C'est la méthode qui prédit l'emplacement ou positionnement du ligand (médicament) au sein d'une molécule protéique (cible thérapeutique) qui engendrera un établissement d'interactions dont les calculs sont fournis par la méthode ; et qui rendent le complexe (protéine-ligand) le plus stable.

Cette méthode comporte deux approches incontournables et inséparables :

- La première, basée sur la complémentarité des surfaces
- La deuxième, basée sur le calcul du score (l'énergie ou l'affinité) du complexe. [119]

Celle-ci doit permettre d'attribuer le meilleur score au complexe le plus réaliste déterminé expérimentalement. [112]

2. Tests d'évaluation de la fiabilité du docking

Il est indispensable d'étudier l'efficacité des logiciels d'arrimage moléculaire afin de valoriser et crédibiliser les résultats fournis le long de notre travail. Pour cela, nous avons tenté d'évaluer la performance de deux logiciels, Autodock et Surflex, et de choisir le plus fiable pour finaliser notre étude. L'évaluation de la fiabilité comportera deux tests pour chacun des deux logiciels : le premier concerne le **coefficient de corrélation (r)** et le deuxième, le **RMSD (Root-Mean-Square Deviation)**.

2.1 Coefficient de corrélation linéaire (r)

La corrélation est une quantification de la relation linéaire entre des variables continues. Le coefficient de corrélation c est une mesure de l'association ou de la relation entre deux variables. Cette standardisation permet d'obtenir une valeur qui variera toujours entre -1 et +1, peu importe l'échelle de mesure des variables mises en relation. Le test de corrélation (contrairement à la régression simple) ne propose pas d'identifier une variable dépendante et une variable indépendante. On ne cherche qu'à déterminer l'absence ou la présence d'une relation linéaire significative entre les variables. [120]

Il existe diverses façons de mesurer la relation ou la liaison, selon qu'il s'agisse de variables quantitatives. [121]

Notre étude de corrélation a concerné le score obtenu à partir du docking moléculaire par les deux logiciels : Autodock et Surflex et l'activité biologique traduite par IC50, et elle s'est étalée sur 30 complexes tirés de la PDB.

2.2 Le RMSD ou l'écart quadratique moyen

En français la "déviation de la racine de la moyenne des carrés" compare deux modèles aux structures 3D obtenues selon un critère correspondant à la distance euclidienne calculée entre les coordonnées de deux fragments d'atomes superposés de façon optimale. Ce critère permet de savoir si deux fragments possèdent une même géométrie. [122]

Etant un outil d'évaluation des performances du docking moléculaire, le RMSD entre la conformation optimale suggérée par les logiciels d'arrimage et la conformation expérimentale, qualifiera une prédiction de décente seulement si sa valeur ne dépasse pas 2 Å (**Gabb. J et al., 1997**). [123]

- Nous avons établi le test RMSD sur 300 complexes pour chacun des deux logiciels extraits de la PDB sous format **.pdb**. Le choix de ces complexes a été basé sur des maladies induites par la nécroptose comme l'hépatite, l'infarctus du myocarde.....etc. pour certains complexes mais aléatoire pour beaucoup d'autres.
- Les calculs de RMSD des 300 complexes étudiés sont présentés dans l'annexe 1

3. Le choix du complexe 4ITJ

En fixant l'enzyme RIP1 kinase comme la cible thérapeutique provoquant la nécroptose. Au départ, nous avons opté pour l'inhibiteur 6E11 puisque il fait l'objet de la plus récente étude sur l'inhibition de la nécroptose (**C. Delehouzé, S. Leverrier-Penna, F. Le Cann et al ; 2017**) [87] sauf qu'il ne figure pas Co-cristallisé avec la protéine d'intérêt dans la PDB, c'est pourquoi nous avons pris, par la suite, un complexe appartenant à l'étude : «Structural Basis of RIP1

Inhibition by Necrostatins » (Xie, T., Peng, W., Liu, Y. *et al* ; 2013) [85] qui propose trois complexes : 4ITJ (1,8 Å de résolution) ; 4ITH (2.25 Å de résolution) ; 4ITI (2.86 Å de résolution).

Nous avons choisi d'étudier le complexe ayant le code 4ITJ parce que il présente une cristallisation à résolution meilleure que celles des deux autres complexes, une activité biologique avantageuse (IC50 = 377nM).

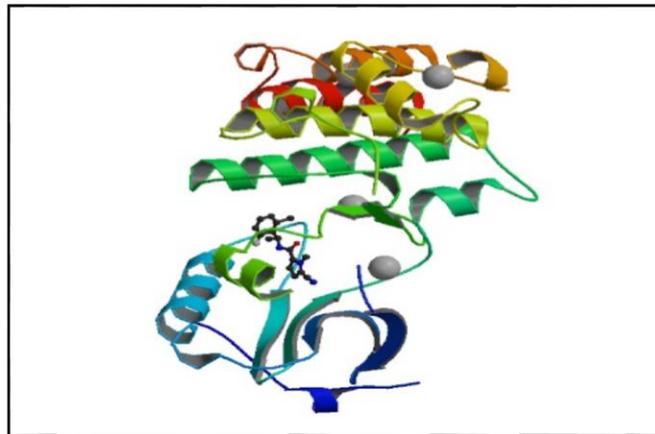


Figure 25 Structure tridimensionnelle du complexe 4ITJ

Quant à son ligand, le 1HX, affiche de meilleures caractéristiques pharmacologiques.

Tableau 5 Les caractéristiques pharmacologiques du ligand de référence

Le ligand	PM	Donneurs de H	Accepteurs de H	Liaisons rotables	Log p
1HX	305.737	1	4	3	3.05

4. Préparation des molécules au docking moléculaire

4.1 Préparation de la protéine

- L'enzyme cible pour laquelle nous avons opté est la Ser/Thr RIP1 Kinase (Receptor-Interacting Protein Kinase 1) à la structure tridimensionnelle co-cristallisée en complexe avec l'inhibiteur disponible dans la PDB, que nous avons téléchargé sous format **.pdb**.

- La RIP1 Kinase est constituée de deux chaînes A et B, une seule chaîne d'acides aminés nous servira de modèle lors du docking moléculaire et elle doit être dépourvue de molécules d'eau, d'ions, de métaux et de l'inhibiteur. Les modifications apportées à la protéine sont sauvegardées sous format **.pdb** par le logiciel Arguslab.

- La conversion des protéines séparées au format **.mol2** est indispensable pour le docking par Surfex grâce au programme **OpenBabel 2.4.2**.

4.2 Préparation du ligand

- La séparation du ligand (1HX) par **Arguslab** est par la suppression de tous les composants du complexe (protéine, molécules d'eau, métaux...) à l'exception du ligand (1HX).
- Enregistrement des modifications apportées au ligand (1HX) au format **.pdb**.
- Conversion des ligands séparés au format **.mol2** pour les adapter au docking par Surflex grâce à **OpenBabel 2.4.2**.

4.3 Les étapes du docking

Nous avons réalisé le docking moléculaire par deux logiciels : **Autodock** et **Surflex** selon les protocoles suivants :

4.3.1 Protocole de docking par Autodock

➤ 1^{ère} étape : préparation de la protéine

Par l'ajout des hydrogènes polaires puis fusion des non-polaires ensuite addition de la charge **kollman** et enregistrement des modifications sous format **.pdbqt**.

➤ 2^{ème} étape : préparation du ligand

Par l'ajout des hydrogènes polaires puis fusion des non-polaires ensuite enregistrement du ligand modifié sous format **.pdbqt**.

➤ 3^{ème} étape : la préparation du site actif

Par la configuration du site actif en centrant la grille de calcul sur le ligand au sein du site actif.

➤ 4^{ème} étape : l'arrimage moléculaire

Lancement du premier algorithme Autogrid4 puis le second algorithme de scoring Autodock4. L'achèvement du docking propose dix meilleures conformations au ligand inséré dans la cavité du site actif, et attribue à chaque position un score basé sur l'énergie.

4.3.2 Protocole de docking par Surflex

➤ 1^{ère} étape : génération du protomol

Conception d'une pseudo-molécule « protomol » qui représente un site de liaison idéalisé servant de matrice sur laquelle les ligands ou les fragments de ligand sont alignés sur la base de la similarité moléculaire. [124]

➤ 2^{ème} étape : le docking moléculaire

Il est réalisé après avoir garanti les entrées suivantes au format **.mol2** : protomol, protéine, ligand. Le logiciel Surflex propose dix meilleures conformations du ligand à l'intérieur du site

actif de l'enzyme et attribue à chacune un score après calcul de l'affinité. Les scores sont classés par ordre décroissant d'affinité de final-0 à final-9, le meilleur étant final-0 au format **.mol2**.

➤ **3^{ème} étape : calcul du RMSD**

Le RMSD considéré est celui des atomes lourds.

5. Recherche de nouveaux inhibiteurs théoriques de la RIP1 Kinase

5.1 Le criblage virtuel

La banque de ligands Pubchem fournit un nombre de similaires en concordance avec le pourcentage désiré d'homologie structurale au ligand de référence. À 87% d'homologie la Pubchem propose 331 similaires à notre ligand de référence. Nos similaires ont été convertis du format **.sdf** au format **.mol2** avec le programme **OpenBabel 2.4.2**.

Un criblage de ces similaires a été réalisé dans le site actif de notre cible enzymatique afin de prédire leur affinité envers elle grâce à une commande désignée par « dock_list » appartenant au logiciel Surflex.

Les résultats des affinités de ces similaires envers notre cible enzymatique seront ordonnés de la façon suivante : (log-0....log9; log-10....log19; log-20....log29; etc....)

Cette commande ne s'applique qu'après une préparation indispensable comme suit :

- ❖ Répertoire dans un dossier les similaires.
- ❖ Créer un fichier sans extension que l'on nomme « ligarchive » incluant l'adresse de chaque similaire dans son répertoire précis.
- ❖ Fournir la protéine ainsi que le protomol au format **.mol2**.

En parlant de criblage, il existe deux types :

Le criblage réel à haut débit (*in vitro*), extrêmement lent et couteux à risque d'efficacité.

Le criblage virtuel (*in silico*), rapide et moins couteux, rentable pour présélectionner. C'est un docking d'une seule protéine avec plusieurs ligands ; les défilant un par un sur la cible afin de trouver de nouvelles substances bioactives inhibant la protéine déficiente. Le criblage est un outil très efficace pour accélérer la découverte de nouveaux traitements.

5.2 La modélisation moléculaire par substitution *in silico*

A partir des données expérimentales un châssis moléculaire est déduit dont la modification est possible par une modélisation moléculaire qui permet la construction de nouvelles molécules ou le remplacement de quelques groupements chimiques par d'autres, ces substitutions présentent un moyen de construire des similaires (homologues) au ligand

expérimental, ayant des conformations à complémentarité structurale avec le site actif d'une protéine préférable à celle du ligand de référence.

L'étude de la modélisation moléculaire par substitution permet d'améliorer l'affinité et l'énergie de liaison de manière significative par un choix judicieux des fragments à substituer, ainsi l'établissement de nouveaux inhibiteurs meilleurs que notre ligand de référence. [112]

6. Filtrage ADME/Tox (la règle de cinq de Lipinski 1997)

Un contributeur majeur dans le domaine de la caractérisation de composés « drug-like » est Lipinski en proposant sa « règle des 5 » [125] Cette règle est la plus utilisée pour l'identification des composés « drug-like » [126]

D'après cette règle, les composés ne validant pas au moins deux des critères suivants ont de très fortes chances de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité : [127]

- Masse moléculaire ≤ 500 Da
- $\text{Log } P \leq 5$
- Accepteurs de liaisons H (HBA) ≤ 10
- Donneurs de liaisons H (HBD) ≤ 5

Autrement le « candidat médicament » sera prédit comme étant peu ou pas absorbé au niveau de l'intestin. [128]

Des compléments à cette règle ont été apportés, notamment par Veber. [129]

- Le nombre de liaisons à libre rotation (FRB) ≤ 10
- La surface polaire de la molécule (PSA) ≤ 140 Å [130]

La « règle des 5 » a été mise au point à partir de composés administrables par voie orale ayant passé avec succès la phase II des tests cliniques. Ce n'est donc pas une méthode pour distinguer les composés étant potentiellement des médicaments de ceux n'en étant pas, mais plutôt une méthode pour identifier les composés ayant une faible absorption ou une faible perméabilité. [131]

Les paramètres précédemment cités sauf pour le paramètre de surface polaire de la molécule que nous n'avons pas considéré sont déduits à partir des structures 3D en utilisant le serveur Molinspiration pour nos meilleurs similaires et le logiciel DruLiTo pour nos meilleurs composés substitués.

7. Analyse visuelle des interactions établies entre le ligand et les acides aminés du site actif

C'est une démarche primordiale dans la découverte de nouveaux candidats médicaments théoriques par le biais du docking moléculaire qui sert à vérifier :

- Les résultats de RMSD calculés et s'assurer que les modèles, théorique et expérimental, sont superposables atome par atome à travers VMD pour les RMSD calculés par Autodock et Surflex.
- L'insertion des ligands dans la cavité du site actif.
- Les interactions établies entre le ligand et les résidus clés du site.

Pour visualiser ces interactions **Biovia Discovery studio visualizer** s'est avéré très démonstratif générant une carte graphique 2D englobant les interactions de chaque ligand avec la cible enzymatique RIP1 Kinase.

Chapitre II

Résultats

&

discussion

I. Test d'évaluation de la fiabilité des programmes de docking

Le docking est le moyen qui calcule l'ensemble des interactions suite à une orientation spatiale optimale du ligand ; assurant la stabilité du complexe et déclenchant un signal responsable de l'effet thérapeutique. Le calcul concerne l'intensité de ce signal qu'il traduit en un score basé sur la puissance de l'affinité ou l'énergie attribuée par l'ensemble des interactions.

Cette méthode nous a été utile dans notre quête de nouveaux inhibiteurs théoriques de RIP1 Kinase et vu son importance plusieurs logiciels sont développés parmi lesquels nous avons choisi deux : Autodock et Surflex dont la fiabilité a été évaluée par deux tests pour chacun des logiciels : le test RMSD et le test de corrélation pour vérifier leur reproductibilité théorique par rapport aux résultats expérimentaux.

1. Le test RMSD

Ce test permet d'estimer la possibilité du programme à reproduire l'orientation spatiale expérimentale du ligand à l'intérieur du site actif, donc ce test se base sur une comparaison après superposition de la conformation expérimentale du ligand de référence et celle prédite par les logiciels de docking après calcul des interactions, et qui convient à la conformation du ligand ayant la plus grande affinité (final-0) pour Surflex ou la plus basse énergie pour Autodock. La prédiction est approuvable seulement si la valeur du RMSD est inférieure ou égale à 2 Å.

L'évaluation de la fiabilité par le RMSD a été effectuée sur 300 complexes (protéine-ligand) que nous avons téléchargés de la PDB et regroupés dans le tableau 18 des annexes.

1.1 Le test RMSD pour le programme Autodock

De 300 complexes utilisés, seuls 170 complexes ont eu une valeur de $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$ et sont considérés comme résultats positifs, ce qui mène à un pourcentage de **56.67 %**. Nos résultats sont au-dessous de ceux obtenus par **(Boutrif. C. et Merdassi. A., 2014)** avec **75,46%** sur un total de 110 complexes et ceux de **(Chebira. M. et Boujaadar. W., 2014)** avec **85%** sur un total de 100 complexes.

Notre pourcentage ne met pas en question les résultats précédemment obtenus.

Cette différence peut être attribuée à la taille de notre échantillon qui est 3 fois plus élevée et probablement aussi à la nature des complexes utilisés.

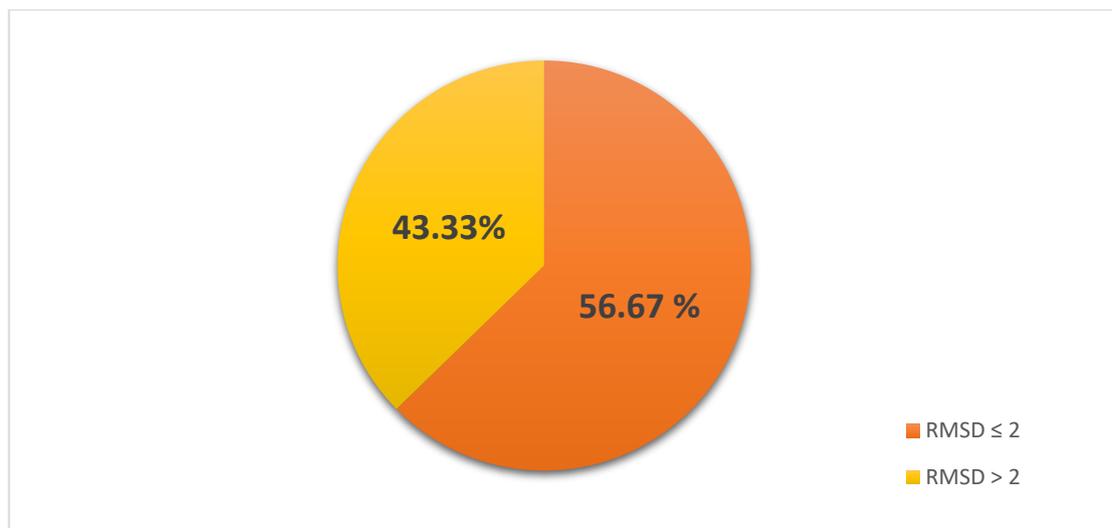


Figure 26 Un secteur qui représente le pourcentage des RMSD inférieurs à 2Å obtenus par autodock

1.2 Le test RMSD pour le programme Surflex

Sur un total de 300 complexes, 188 molécules ont affirmé un résultat positif donc un RMSD ≤ 2 Å ; ce qui se traduit par une valeur de **62,67%** des résultats obtenus.

Il est à noter que dans des études comparables des pourcentages meilleurs ont été trouvés : **63%** à partir de 300 complexes (**Chikhi. A. et Bensegueni. A., 2008**) et **85,8%** sur 134 complexes (**Teniou. S., 2012**).

Le pourcentage obtenu par **Chikhi. A et Bensegueni. A (2008)** confirme celui que nous avons déduit avec une faible marge de différence de **0.33%** tandis que le pourcentage obtenu

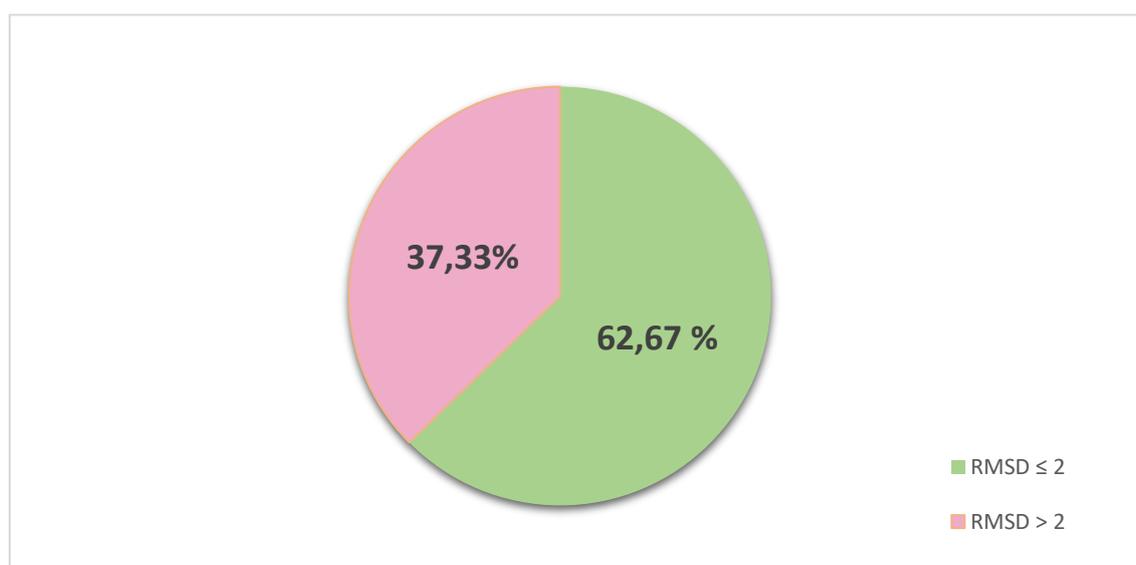


Figure 27 Un secteur qui représente le pourcentage des RMSD inférieurs à 2Å obtenus par surflex

par **Teniou. S (2012)** est manifestement lié à la taille de l'échantillon qui demeure beaucoup moindre.

- **Discussion de la qualité des RMSD fournis par Autodock et Surflex**

Les logiciels reproduisent à pourcentage semblable les structures dont le RMSD est compris entre 0.5 et 1 Å.

Mis-à-part l'intervalle des RMSD compris entre 1 et 1.5 Å qu'Autodock reproduit mieux ; Surflex se montre plus fiable grâce aux taux des RMSD appartenant aux intervalles 0 à 0.5 Å et 1.5 à 2 Å meilleurs que ceux fournis par le logiciel Autodock.

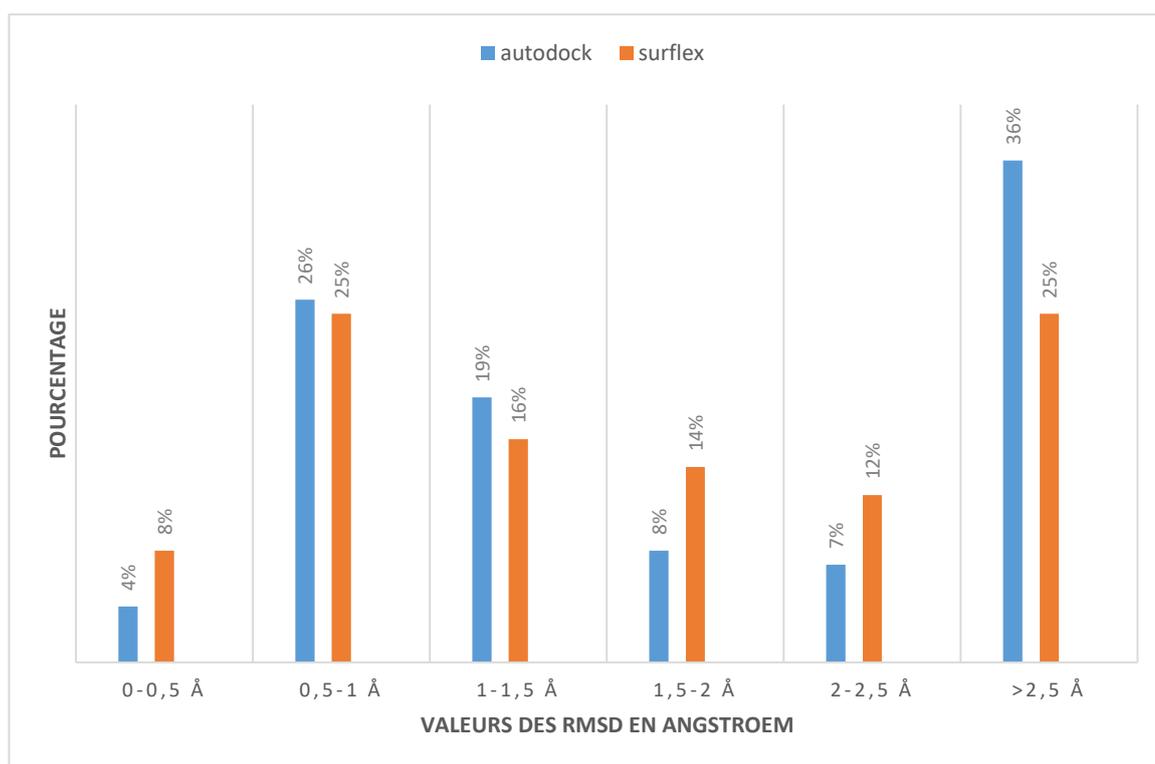


Figure 28 Les pourcentages des RMSD fournis par Autodock et Surflex

1.3 L'analyse visuelle des résultats du RMSD

L'évaluation de la fiabilité par le test RMSD ne s'accomplit qu'après vérification que les ligands (expérimental et prédit) sont superposables atome par atome.

À propos des prédictions par les logiciels de docking : **Autodock** et **Surflex**, nous avons choisi trois résultats de docking de différents complexes dont le premier est à RMSD inférieur à 2 Å ; le deuxième est aux alentours de 2 Å ; quant au troisième, il est nettement supérieur à 2 Å.

1.3.1 Analyse visuelle des RMSD résultants du logiciel Autodock

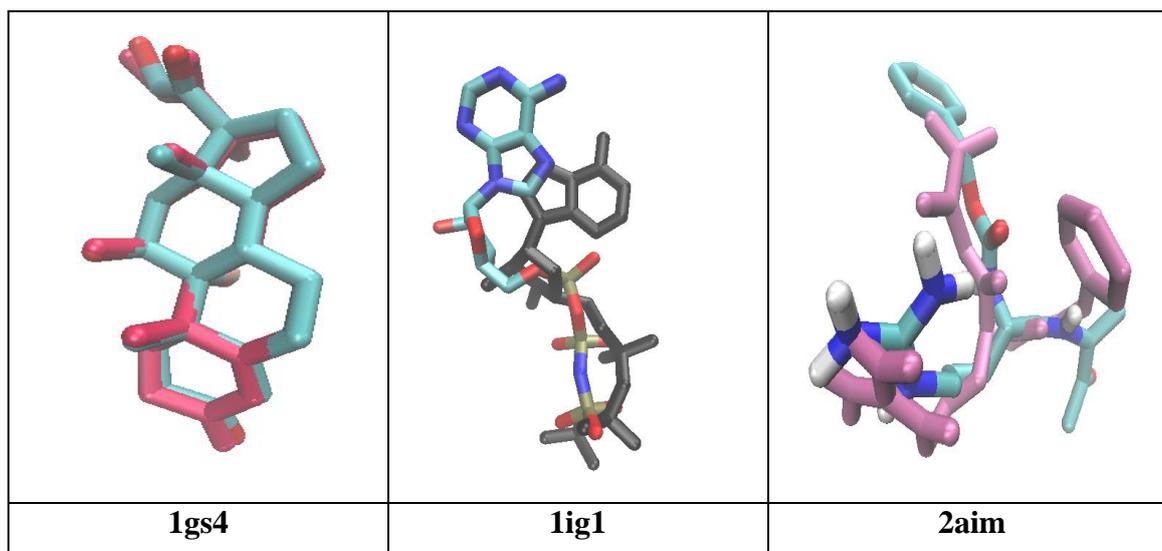


Figure 29 Superposition des trois ligands des complexes (1gs4, 1ig1 et 2aim) et ceux calculés par docking moléculaire avec autodock.

N =°	Complexe	RMSD (Å)	Description du RMSD	Description du ligand prédit
1 ^{er}	1gs4	0.25	Meilleur	Coloré en rouge
2 ^{ème}	1ig1	2.27	Intermédiaire	Coloré en noir
3 ^{ème}	2aim	3.22	Mauvais	Coloré en rose

1.3.2 Analyse visuelle des RMSD résultants du logiciel Surflex

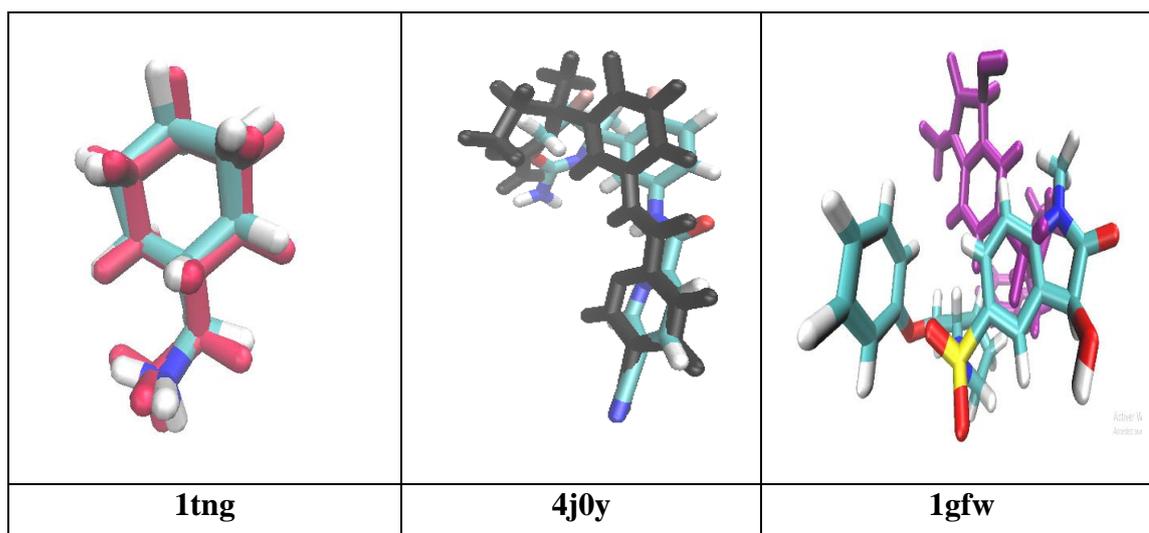


Figure 30 Superposition des trois ligands des complexes (1tng, 4j0y et 1gfw) et ceux calculés par docking moléculaire avec surflex

N =°	Complexe	RMSD (Å)	Description du RMSD	Description du ligand prédit
1 ^{er}	1tnq	0.257	Meilleur	Coloré en rouge
2 ^{ème}	4j0y	2.120	Intermédiaire	Coloré en noir
3 ^{ème}	1gfw	3.902	Mauvais	Coloré en mauve

2. Le test du coefficient de corrélation linéaire

Un deuxième procédé qui permet l'évaluation de la fiabilité des logiciels de docking est le test de corrélation qui quantifie l'intensité de la relation linéaire entre les deux variables suivantes : le score calculé par les logiciels de docking et l'IC50 (la concentration inhibitrice 50) déterminée expérimentalement ; elle relate la concentration qui inhibe 50% du processus enzymatique et juge l'efficacité d'un éventuel médicament.

Nous avons exprimé les IC50 par log IC50 afin de réduire l'échelle de la courbe de corrélation à tracer.

Le test de corrélation est un bon déterminant de la performance des logiciels de docking à travers le calcul du « coefficient de corrélation r » après traçage de la courbe, qui est réalisé sur 30 complexes dont 4 d'entre eux (4ITH, 4ITI, 4ITJ, 4NEU) se rapportent à notre enzyme d'intérêt « R1PKinase » et 26 autres complexes sélectionnés arbitrairement.

Le tableau ci-dessous comprend les données de corrélation :

Tableau 6 Données de l'analyse par la corrélation linéaire entre les scores obtenus par docking moléculaire (Autodock et Surflex) et les log IC50

	Le complexe	IC50 (nM)	Log IC50	Affinité (M ⁻¹)	Energie (Kcal/mol)
01	1W22	176	2,24	4.98	-8.81
02	1YVZ	4400	3,64	5.87	-9.76
03	1Z4U	70	1,84	4.86	-10.86
04	1YVX	8000	3,90	4.45	-8.79
05	2O7V	1100	3,04	3.77	-3.84
06	2FDU	28300	4,45	4.09	-5.65
07	2FDV	1650	3,21	4.18	-5.92
08	2GHL	92	1,96	7.18	-9.18
09	3WS9	92	1,96	6.67	-9.97
10	3QPP	12	1,07	5.53	-12.04
11	3UDJ	242000	5,38	3.42	-6.92
12	3UOH	2,1	0,32	9.21	-10.13
13	3VV6	157000	5,19	3.39	-6.17
14	3WB4	36600	4,56	3.26	-6.86
15	3VV7	4600	3,66	4.84	-8.68

16	3UNZ	3,7	0,56	9.04	-9.43
17	3UO5	10	1	8.11	-9.34
18	3UOK	0.8	-0.09	8.89	-9.70
19	3FQK	81	1,90	6.62	-11.24
20	4NEU	10	1	12.83	-12.93
21	4ITI	440	2.64	6.33	-11.45
22	4ITH	317	2.5	7.45	-9.59
23	4ITJ	377	2.57	5.05	-9.13
24	4HEV	1000	3	4.06	-8.06
25	4MIB	0,2	-0,69	10.13	-11.69
26	4HEU	0.1	-1	8.23	-12.54
27	4BBX	60	1,77	6.84	-7.16
28	4MK9	9	0,95	7.73	-10.82
29	4MKB	3	0,47	10.84	-11.26
30	5AXQ	0.1	-1	5.36	-9.14

Après avoir regroupé les données expérimentales et obtenu les scores de docking par les deux logiciels, nous les avons représentés par une courbe de corrélation linéaire entre deux variables qui sont les log IC50 et les scores en utilisant le programme « Excel » qui nous a affiché : l'équation, le coefficient de détermination « R^2 » et le coefficient de corrélation « r ». Pour interpréter les corrélations dans le cadre de la relation examinée, nous pouvons nous en tenir à certaines valeurs indicatives.

2.1 L'analyse de corrélation des énergies obtenues par Autodock

Nous avons représenté ces résultats sur une courbe :

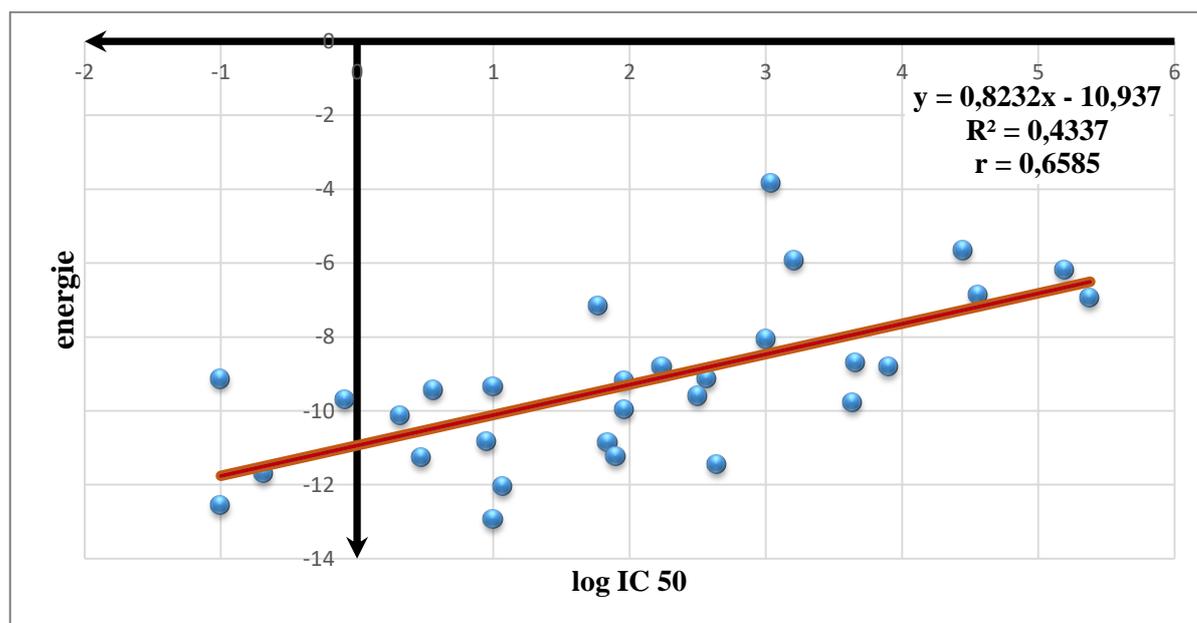


Figure 31 Courbe de corrélation entre log IC50 et énergies, obtenues par autodock

• **Commentaire**

La valeur du coefficient de corrélation des scores obtenus par Autodock et les activités biologiques est $r = 0.6585$. Cette valeur légèrement supérieure à 0.5 signifie que la corrélation est de moyenne intensité et positive (modification proportionnelle des variables dans un même sens).

Les résultats des travaux effectués par d'autres auteurs sont bien meilleurs que le notre. En effet, ils ont trouvé les valeurs suivantes : $r = 0.67$ (Chebira. M et Boujaadar. W., 2014) et $r = 0.86$ (Mokrani. E.H., 2012) affirmant ainsi la performance du logiciel Autodock.

Il est à noter, cependant, que le coefficient de corrélation peut être influencé par certaines valeurs extrêmes ou aberrantes.

2.2 L'analyse de corrélation des affinités obtenues par Surflex

Nous avons représenté ces résultats sur une courbe :

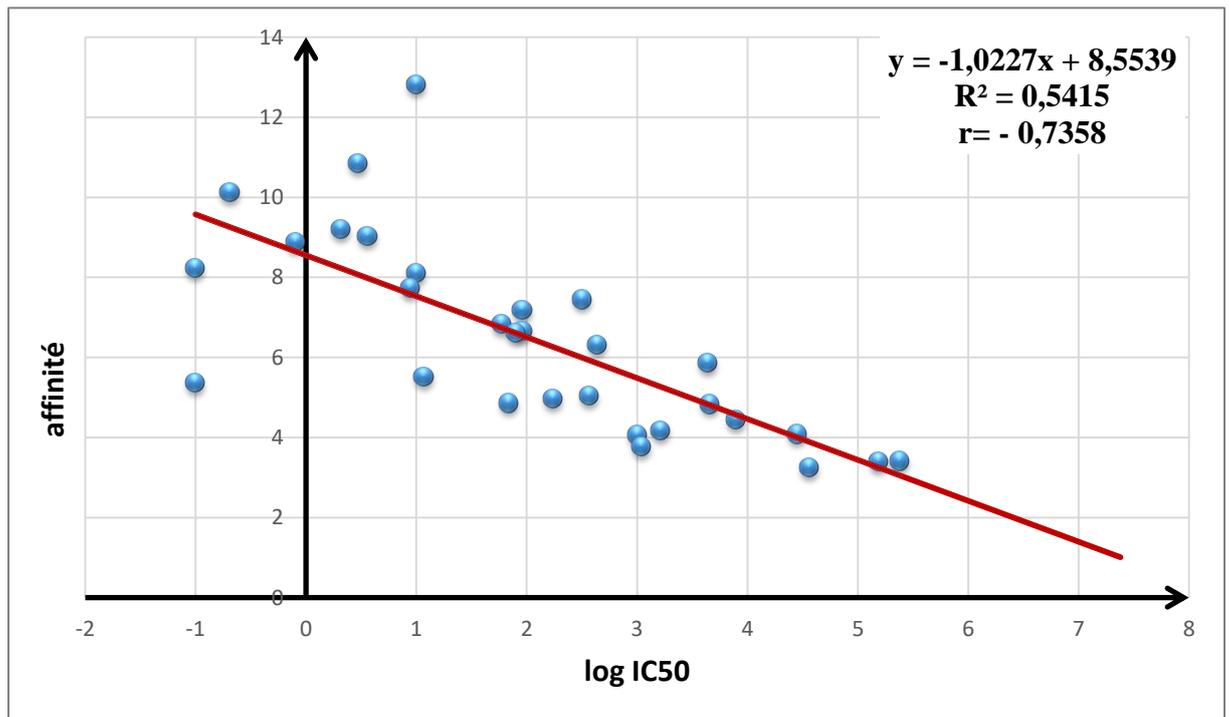


Figure 32 Courbe de corrélation entre Log IC50 et final-0 obtenus par surflex

• **Commentaire**

Le nuage de points se rapproche dans son ensemble de la droite, ce qui justifie la valeur du coefficient de corrélation $r = -0.7358$. Il indique ainsi une corrélation négative (variables inversement proportionnelles dont les valeurs évoluent dans des sens opposés) et d'assez bonne intensité puisque la valeur du coefficient r ne dépasse pas la valeur significative de « -0.8 ».

L'obtention d'un tel coefficient de corrélation prouve la performance du logiciel Surflex et cela en accord avec la valeur $r = 0.71$ obtenue par (Ait Hamoudi. L et Chami. S., 2018)

3. Le choix de l'outil d'arrimage moléculaire

L'étude comparative de la fiabilité des deux outils de docking, Autodock et Surflex, a élu ce dernier (Surflex) comme étant le plus performant avec **62.67%** de valeurs de RMSD $\leq 2 \text{ \AA}$ et un coefficient de corrélation $r = -0.7358$.

Il est à noter que Surflex contrairement à la version Windows d'Autodock possède un moyen de criblage virtuel qui permet le docking d'un ensemble de ligands un par un sur la protéine cible en utilisant une seule commande : `dock_list`.

La rapidité d'exécution de Surflex par rapport à Autodock est vraisemblablement due aux différents algorithmes utilisés par chaque programme :

- Algorithme Génétique Lamarkien (AGL) pour Autodock.
- Algorithme de fragmentation / reconstruction : Hammerhead modifié pour Surflex permettant le criblage rapide.

De plus Surflex propose une autre option celle d'optimisation du RMSD calculé par la commande `optrms` conseillée que pour les RMSD de valeurs entre 2 et 3 \AA .

II. Recherche de nouveaux inhibiteurs théoriques de la RIP1 Kinase

L'industrie pharmaceutique est basée sur l'actualisation des traitements thérapeutiques jusqu'à acquisition d'un meilleur inhibiteur à dose minimale impliquant une moindre toxicité d'où l'étape incontournable de recherche de similaires à notre ligand de base qui se placeront un par un à l'intérieur du site actif et auxquels nous établiront un calcul de docking jusqu'à trouver une meilleure affinité que celle du ligand expérimental de référence (1HX) et établissement de nouvelles inhibitions plus puissantes par de nouveaux inhibiteurs théoriques plus performants et actifs sur notre enzyme RIP1 Kinase.

1. Le criblage virtuel des similaires

Nous avons effectué le criblage virtuel de 311 similaires téléchargés de la Pubchem qui présente 331 similaires avec une homologie structurale de 87% à notre ligand de référence 1HX. 20 similaires ont été éliminés en raison de leur indisponibilité en structure tridimensionnelle et au format **.sdf**.

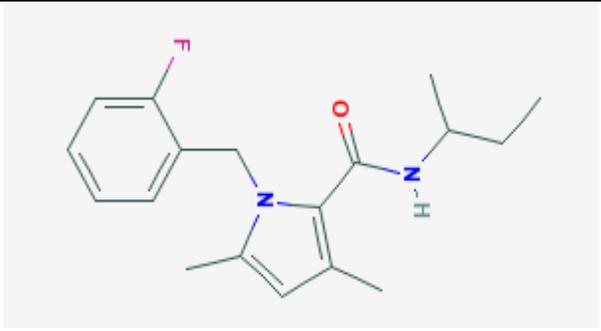
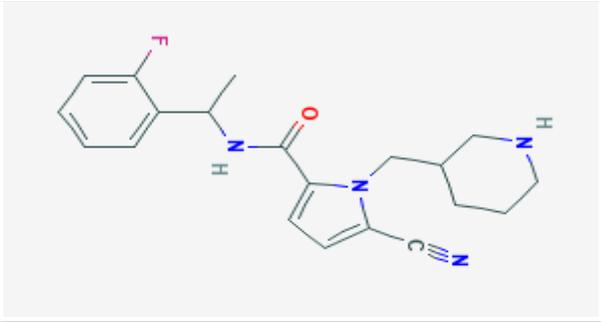
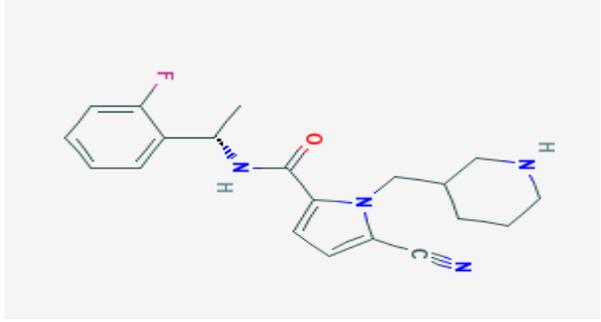
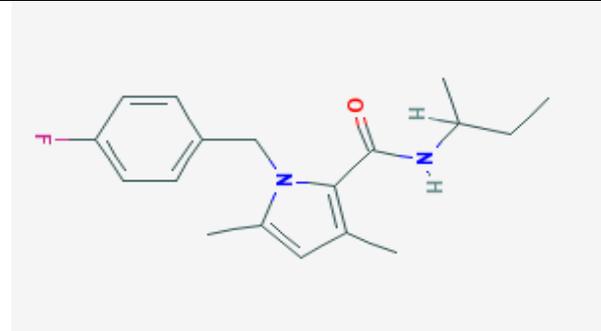
Les résultats de cette opération ont permis de repérer 20 similaires avec des affinités (final-0) supérieures à celle de notre ligand de référence, 1HX, estimée à **5.06 M⁻¹** et que nous regroupons dans le tableau 7 et dont les 4 meilleurs sont :

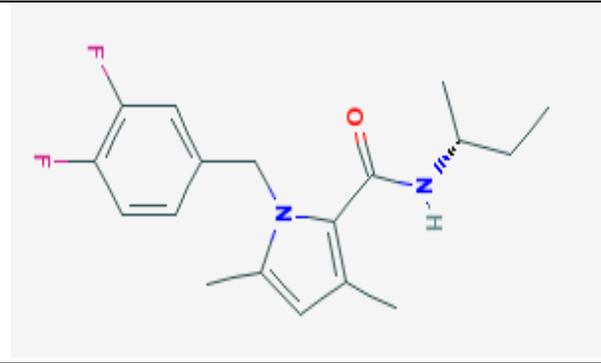
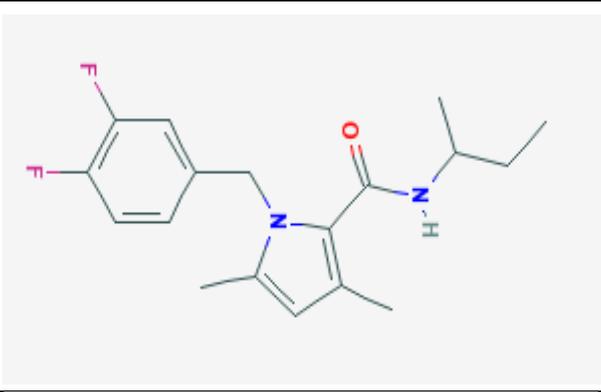
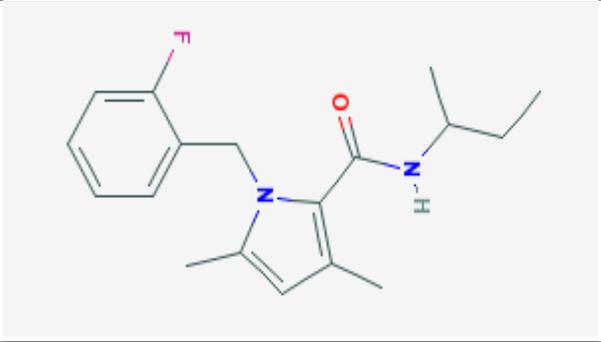
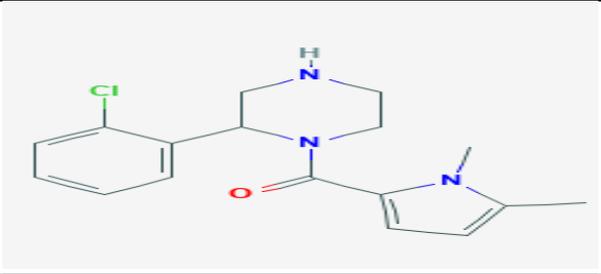
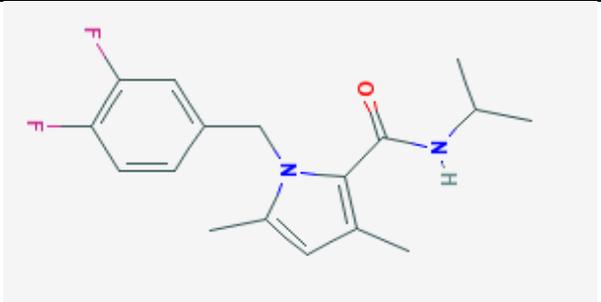
Le composé : A avec une affinité de 7.71 M^{-1}

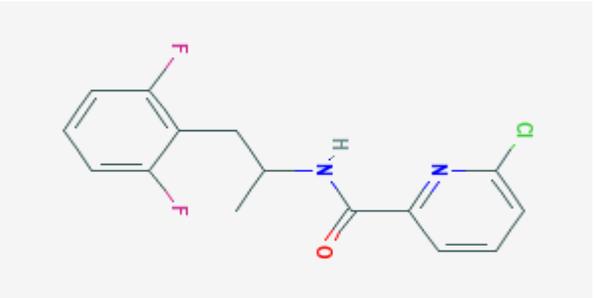
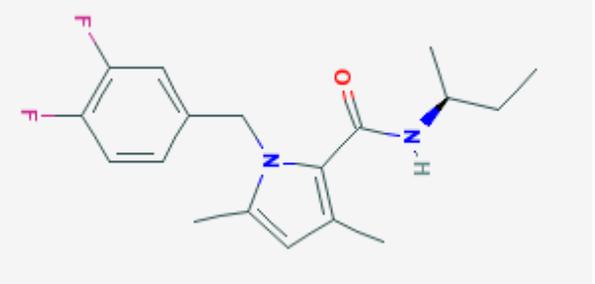
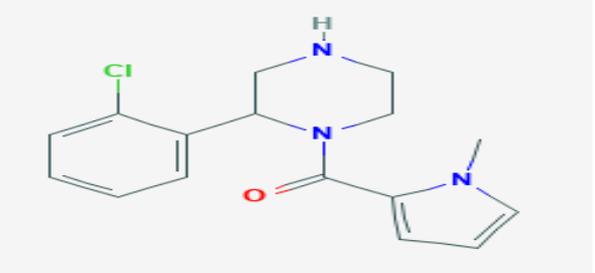
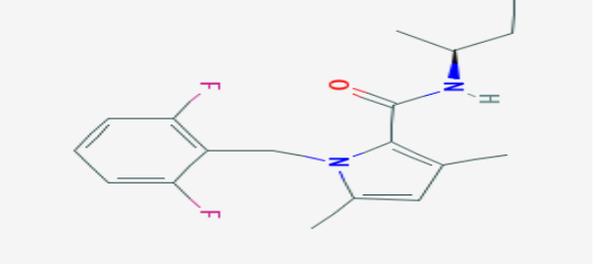
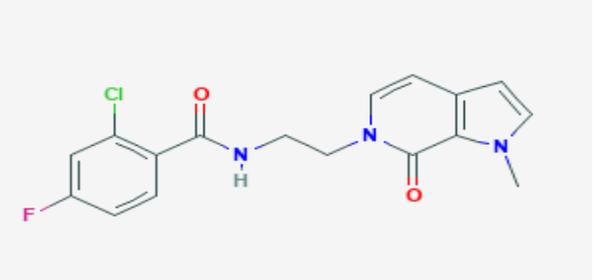
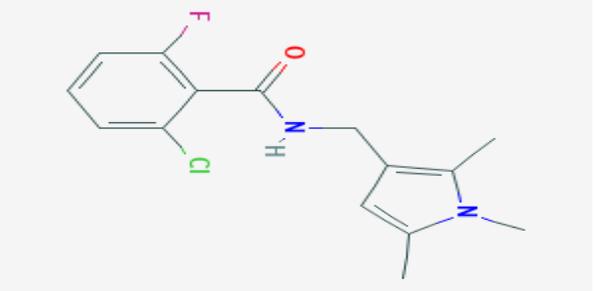
Les composés : B et C qui ont la même affinité : 7.18 M^{-1}

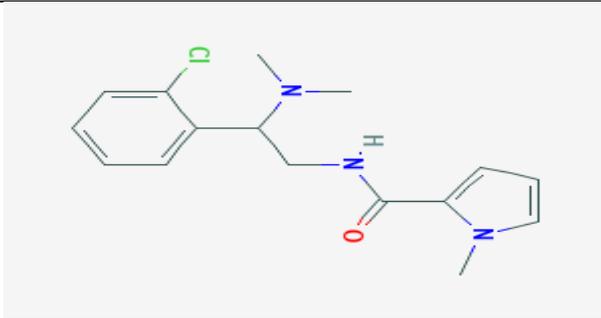
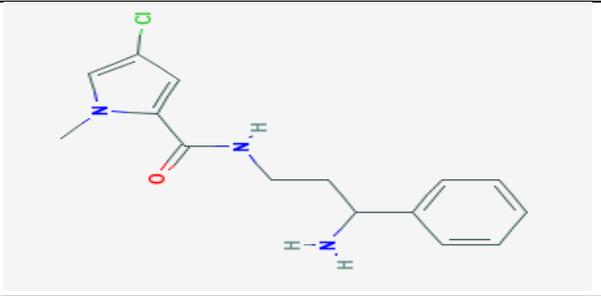
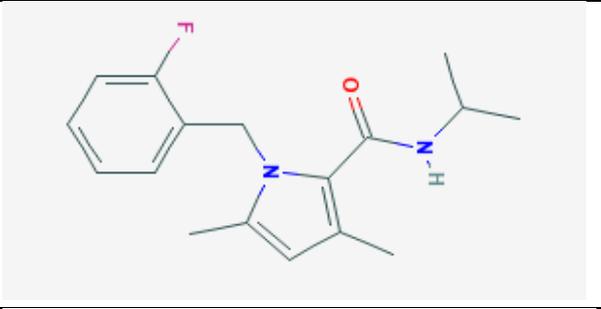
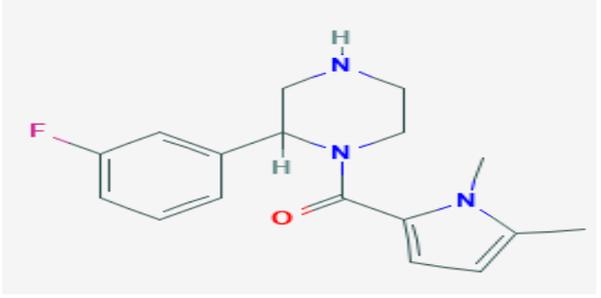
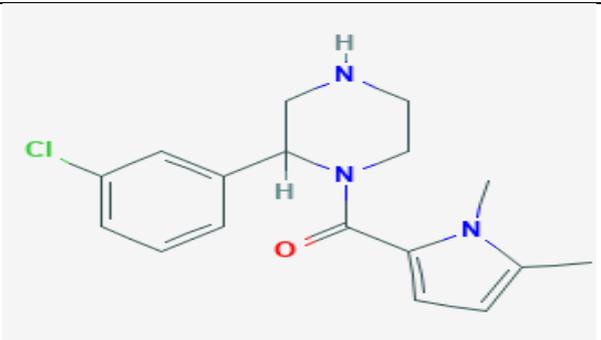
Le composé : D avec une affinité : 7.08 M^{-1}

Tableau 7 Les 20 meilleurs similaires, leurs affinités et leurs structures

	Nom du composé et N° CID	Affinité (M^{-1})	La structure
A	NGQCZJZSRDHLOE-HNNXBMFYSA-N 30898169	7.71	
B	WZUSZEVZSGGZCH-UHFFFAOYSA-N 123889614	7.18	
C	WZUSZEVZSGGZCH-MLCCFXAWSA-N 130314915	7.18	
D	MNYMLBMTZFQFSW-UHFFFAOYSA-N 42789555	7.08	

E	FVYCIDZAEGRCQC- GFCCVEGCSA-N 93115959	6.84	
F	N-(Sec-butyl)-1-(3,4- difluorobenzyl)-3,5-dimethyl- 1H-pyrrole-2-carboxamide 45948627	6.84	
G	N-Butan-2-yl-1-[(2- fluorophenyl)methyl]-3,5- dimethylpyrrole-2- carboxamide 3469136	6.81	
H	BJCQTDBUKQERRD- UHFFFAOYSA-N 120739876	6.67	
I	HYGZZDWOPUUNAU- UHFFFAOYSA-N 42792389	6.51	

J	VXDXPJMEPCQSNE- UHFFFAOYSA-N 62233266	6.52	
K	FVYCIDZAEGRCQC- LBPRGKRZSA-N 93115960	6.52	
L	RUMCLDZRAWWRPK- UHFFFAOYSA-N 120739422	6.47	
M	N-[(2S)-Butan-2-yl]-1-[(2,6- difluorophenyl)methyl]-3,5- dimethylpyrrole-2- carboxamide 8079888	6.40	
N	APWDQLZKCPVSGO- UHFFFAOYSA-N 121021643	6.33	
O	IJPLIWSFUMVMO- UHFFFAOYSA-N 110642047	6.33	

P	N-[2-(2-Chlorophenyl)-2-(dimethylamino)ethyl]-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamide 45844020	6.29	
Q	LCGPFZSNFSNNMB-UHFFFAOYSA-N 80506573	6.29	
R	JHDCLHZADNBKEO-UHFFFAOYSA-N 46127367	6.28	
S	CLUXECLPNLVMJQ-UHFFFAOYSA-N 120738061	6.25	
T	DPFYPBDRERQLOS-UHFFFAOYSA-N 120801938	6.16	

1.1 La règle de cinq de Lipinski

Il est indispensable pour tout futur candidat médicament de répondre à un ensemble de critères pour être considéré comme « drug-like ». Cela implique une possibilité d'absorption et de distribution qui seront déterminées par la règle de cinq de Lipinski qui valide ou invalide les

similaires comme inhibiteurs à potentiel médicamenteux. La règle de Lipinski exige des paramètres à respecter, ces paramètres peuvent être recherchés à la nouvelle page web de la banque de ligands Pubchem ou calculés par le serveur Molinspiration que nous avons consulté.

Tableau 8 Les paramètres de la règle de cinq de Lipinski des 20 meilleurs similaires

	N° CID	PM (g/mol)	Donneur de H	Accepteur de H	Liaison rotatable	Log p
A	30898169	305.806	1	4	5	2.60
B	123889614	354.429	2	5	5	2.63
C	130314915	354.429	2	5	5	2.63
D	42789555	302.393	1	3	5	3.92
E	93115959	320.384	1	3	5	4.01
F	45948627	320.384	1	3	5	4.01
G	3469136	302.393	1	4	3	3.05
H	120739876	317.817	1	4	2	2.33
I	42792389	306.357	1	3	4	3.47
J	62233266	310.729	1	3	4	3.35
K	93115960	320.384	1	3	5	4.01
L	120739422	303.79	1	4	2	2.11
M	8079888	320.384	1	3	5	3.99
N	121021643	347.774	1	5	4	3.08
O	110642047	294.754	1	3	3	2.63
P	45844020	305.806	1	4	5	2.60
Q	80506573	291.779	3	4	5	0.34
R	46127367	288.366	1	3	4	3.33
S	120738061	301.365	1	4	2	1.84
T	120801938	317.817	1	4	2	2.35

Les 2 tableaux dégagent la conclusion suivante :

Nos 20 meilleurs similaires inhibent la RIP1 Kinase avec une affinité (final-0) supérieure à 6 M^{-1} et remplissent tous les critères de la règle de cinq de Lipinski y compris le nombre de liaisons rotatives et le coefficient de partage par conséquent valident la biodisponibilité orale, cependant leur activité biologique ne peut être confirmée que par des tests « *in vitro* » et/ou « *in vivo* ».

1.2 L'analyse visuelle et discussion des interactions

La structure des matériaux est entièrement déterminée par les liaisons s'établissant entre atomes. Ces liaisons sont une manifestation d'interactions attractives entre atomes, dont l'origine est soit électrostatique (liaison ionique, liaison hydrogène), soit purement quantique (liaisons covalente et métallique, liaisons de type Van der Waals/London). [131]

Les interactions prédites par le docking sont, en général, électrostatiques.

Parmi les liaisons électrostatiques, les liaisons Hydrogènes sont très répandues et importantes en raison de leur force qui bascule entre celle de la liaison covalente et celle des forces de Van Der Waals.

A - Etude des interactions du composé A

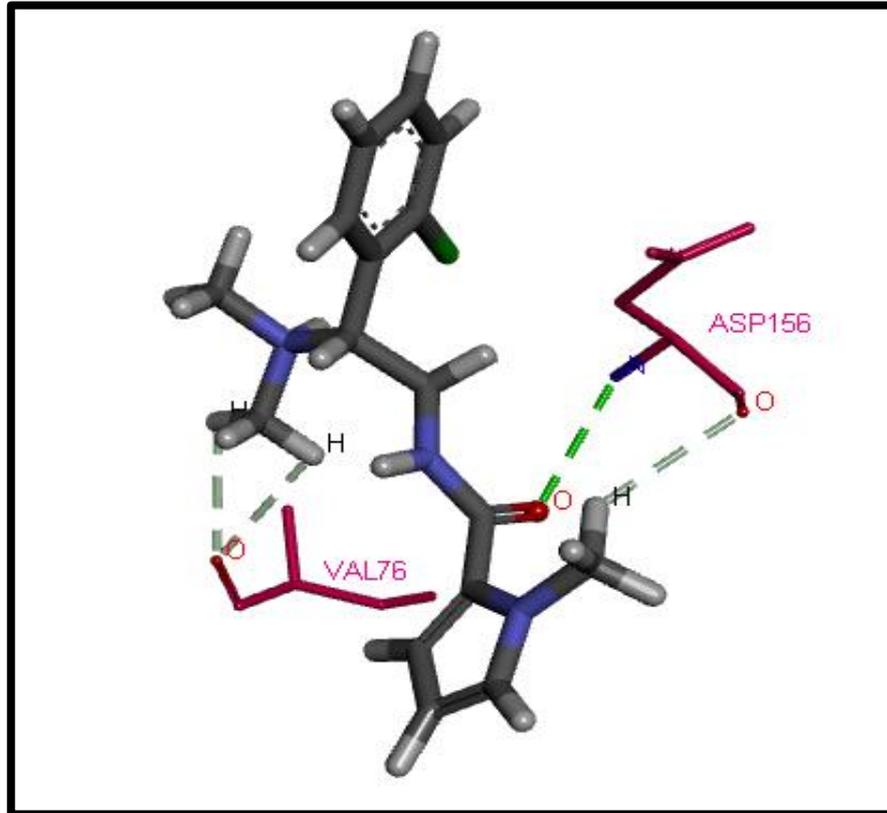


Figure 33 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé A avec le site actif de la RIPK1

▪ La présentation des interactions récepteur-ligand en schéma 2D

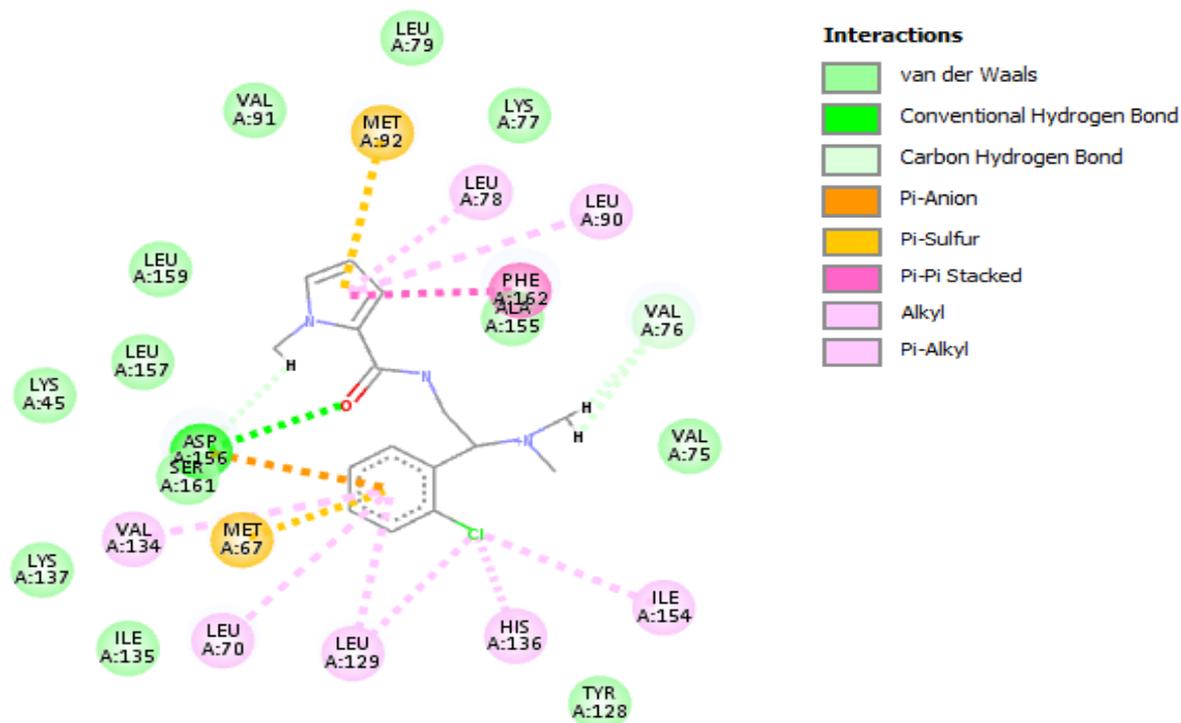


Figure 34 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé A en schéma 2D

▪ Discussion des résultats

Les liaisons hydrogènes

Tableau 9 Les liaisons hydrogène établies par le composé A avec le site actif

liaisons H	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Types	Distance (Å)
01	C (N°10) =H ----- O (N°477) de l'AA : VAL76	Carbon hydrogen bond	2,697724
02	C (N°10)=H ----- O (N°477) de l'AA : VAL76	Carbon Hydrogen Bond	2,580182
03	C (N°21)=H----O (N°1100) de l'AA : ASP156	Carbon Hydrogen Bond	2,909142
04	O (N° 2) -----N (N°1097) de l'AA : ASP156	Conventional Hydrogen Bond	2,827554

Mises à part les liaisons hydrogènes, les forces attractives de Van Der Waals figurent en vert clair impliquant même à longues distances les aminoacides suivants

- Les Leucines numérotées : 79 ; 157 ; 159 et l'Isoleucine 135
- Les Lysines numérotées : 45 ; 77 ; 137 et les Valines 75 et 91
- La Tyrosine 128 ; l'Alanine 155 et la Serine 161

A l'addition, des interactions hydrophobes schématisées en rose par effet des alkyles qui sont les radicaux à chaînes aliphatiques apolaires dont la terminaison est un groupement non-fonctionnel CH_3 et que nous retrouvons entre :

L'atome de chlore et les radicaux des aminoacides LEU 129 ; HIS 136 ; ILE 154.

Les cycles du ligand et les radicaux des aminoacides Leucines numérotés 70 ; 78 ; 90 ; 129 et Valine 134.

Une autre interaction hydrophobe nommée Pi-Pi Stacking qui s'établit entre deux cycles est présente entre l'un des cycles du ligand et le noyau aromatique de l'acide aminé Phénylalanine.

Les autres interactions impliquant les cycles du ligand sont l'interaction Pi-Anion suite à la charge négative du COO^- de l'acide aminé Aspartique et une interaction Pi-Soufre avec les acides aminés sulfurés et hydrophobes Méthionine 67 et Méthionine 92.

B- Etude des interactions du composé B

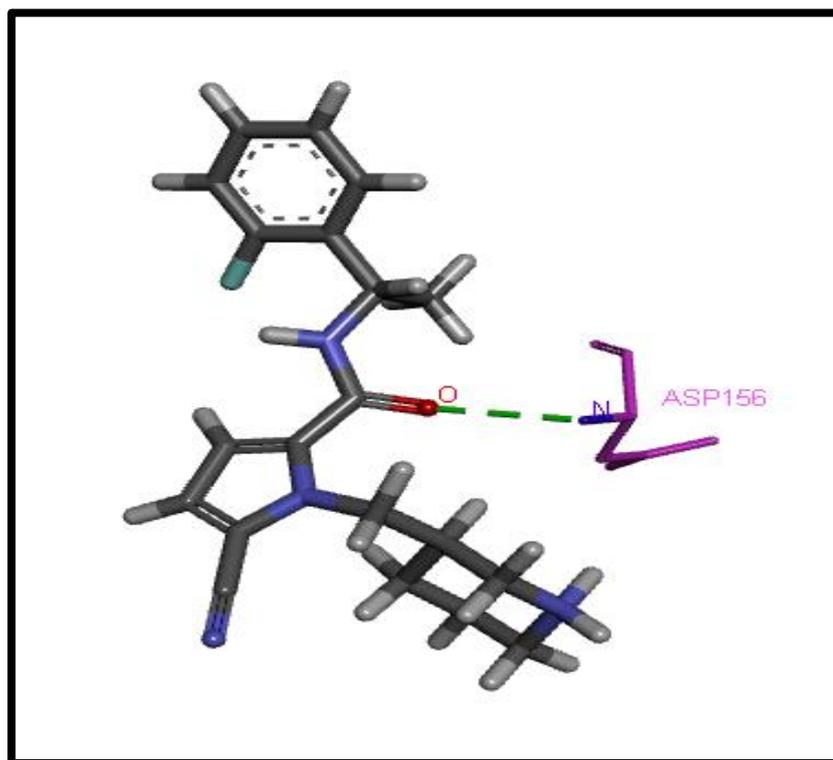


Figure 35 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé B avec le site actif de la RIPK1

▪ La présentation des interactions récepteur-ligand en schéma 2D

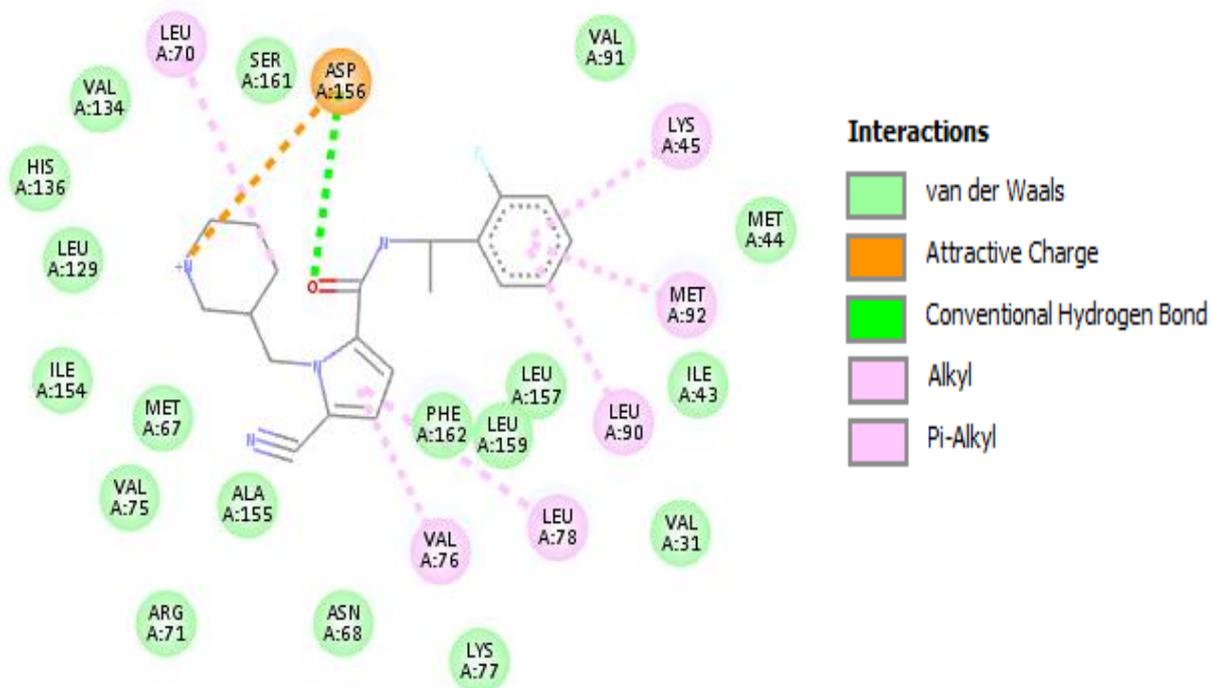


Figure 36 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé B en schéma 2D

▪ Discussion des résultats

Les liaisons hydrogènes

Tableau 10 Les liaisons hydrogène établies par le composé B avec le site actif

liaison H	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Types	Distance (Å)
01	O (N°2) ----- N (N°1097) de l'AA : ASP156	Conventional Hydrogen Bond	2,865948

C- Etude des interactions du composé C

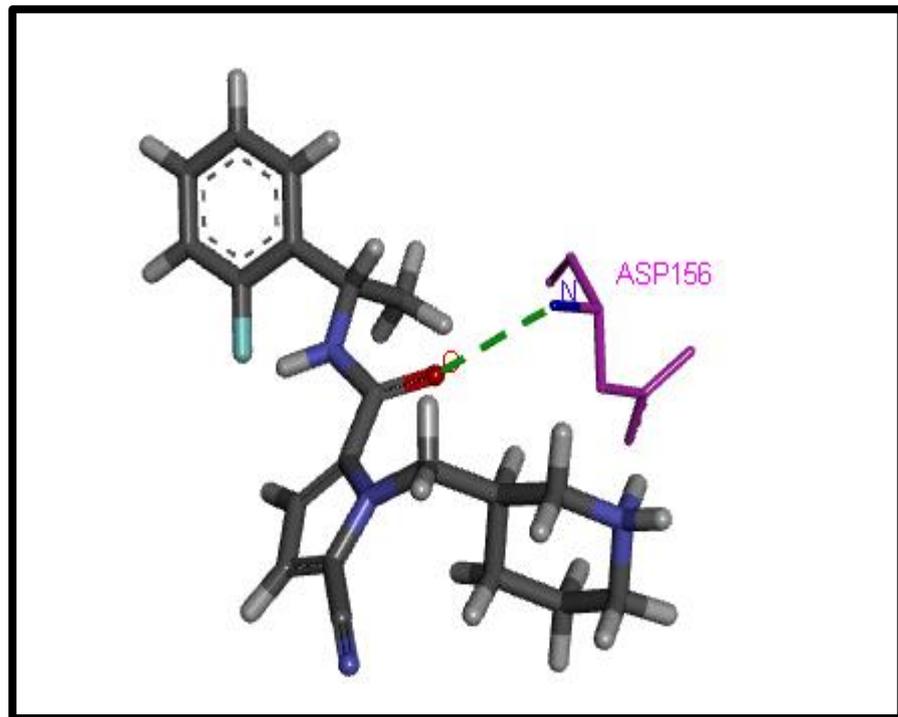


Figure 37 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé C avec le site actif de la RIPK1

▪ La présentation des interactions récepteur-ligand en schéma 2D

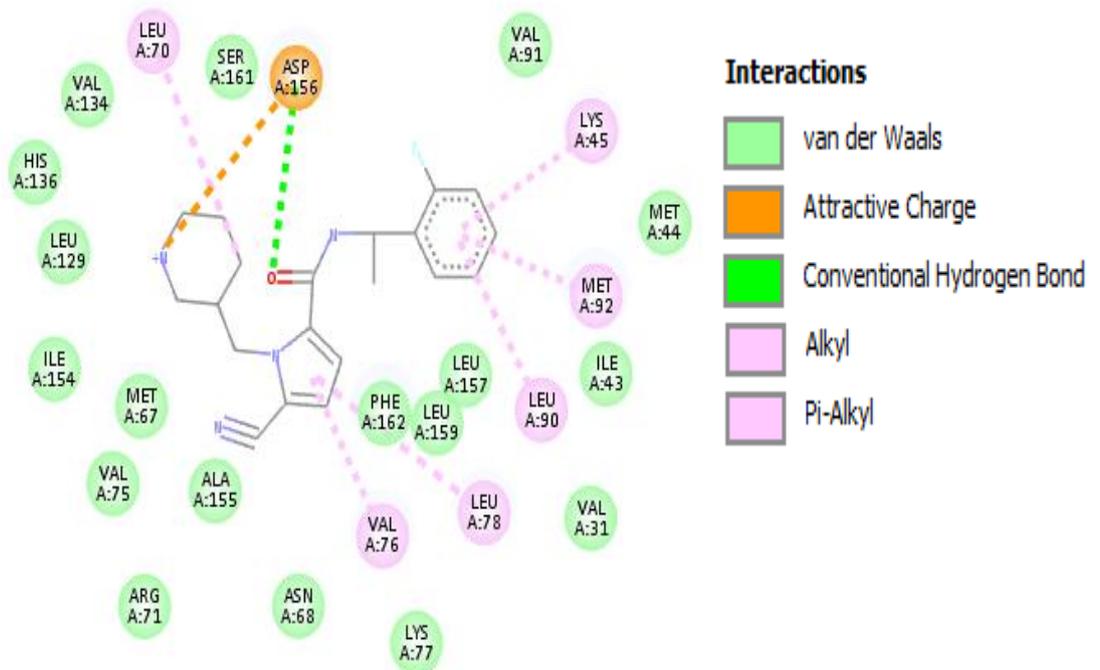


Figure 38 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé C en schéma 2D

▪ **Discussion des résultats**

Les liaisons hydrogènes

Tableau 11 Les liaisons hydrogène établies par le composé C avec le site actif

liaison H	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Types	Distance (Å)
01	O(N°2)- - - - - N (N°1097) de l'AA : ASP156	Conventional Hydrogen Bond	2,865948

Les composés B et C présentent le même nombre et type d'atomes ; l'unique différence réside dans la liaison peptidique CO-NH et qu'on rappelle porteuse d'un effet de résonance qui se retrouve dans le plan pour un composé et derrière le plan pour l'autre et qui ne semble pas influencer le nombre ou type d'interactions produites entre les deux ligands et les résidus clés du site actif.

Rappelons qu'en plus de la liaison hydrogène mentionnée ci-dessus nous avons aussi visualisé à travers le schéma graphique 2D :

Une liaison ionique entre l'atome N (N° 1097) chargé positivement de l'un des cycles du ligand et le groupement COO⁻ chargé négativement de l'acide Aspartique 156.

Des forces attractives de Van Der Waals figurent en vert clair impliquant les aminoacides suivants

- Les Leucines numérotées : 129 ; 157 ; 159 et les Isoleucines 43 et 154.
- Les Méthionines numérotées : 44 ; 67 et les Valines 31 ; 75 ; 91 et 134.
- L'Asparagine 68 ; l'Arginine 71 ; la Lysine 77 ; l'Histidine 136 ; l'Alanine 155 ; la Serine 161 et la phénylalanine 162.

Il se rajoute à ces forces, des interactions hydrophobes par les alkyles hydrocarbonés apolaires que nous retrouvons entre :

- Les cycles du ligand B ou C et les radicaux des aminoacides Leucines numérotés 70 ; 78 ; 90 et la Lysine 45 ; la Valine 76 et la Méthionine 92.

D - Etude des interactions du composé D

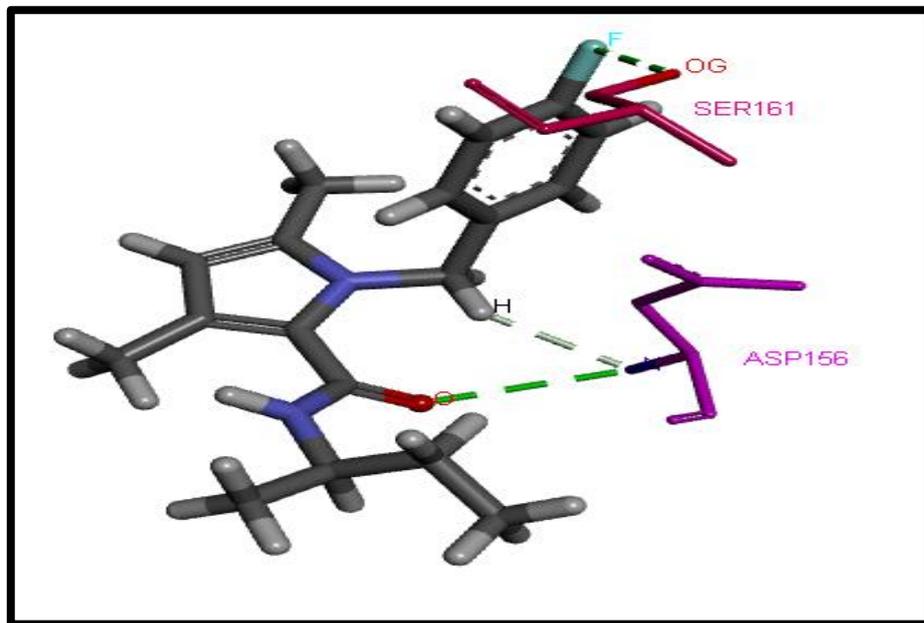


Figure 39 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé D avec le site actif de la RIPK1

La présentation des interactions récepteur-ligand en schéma 2D

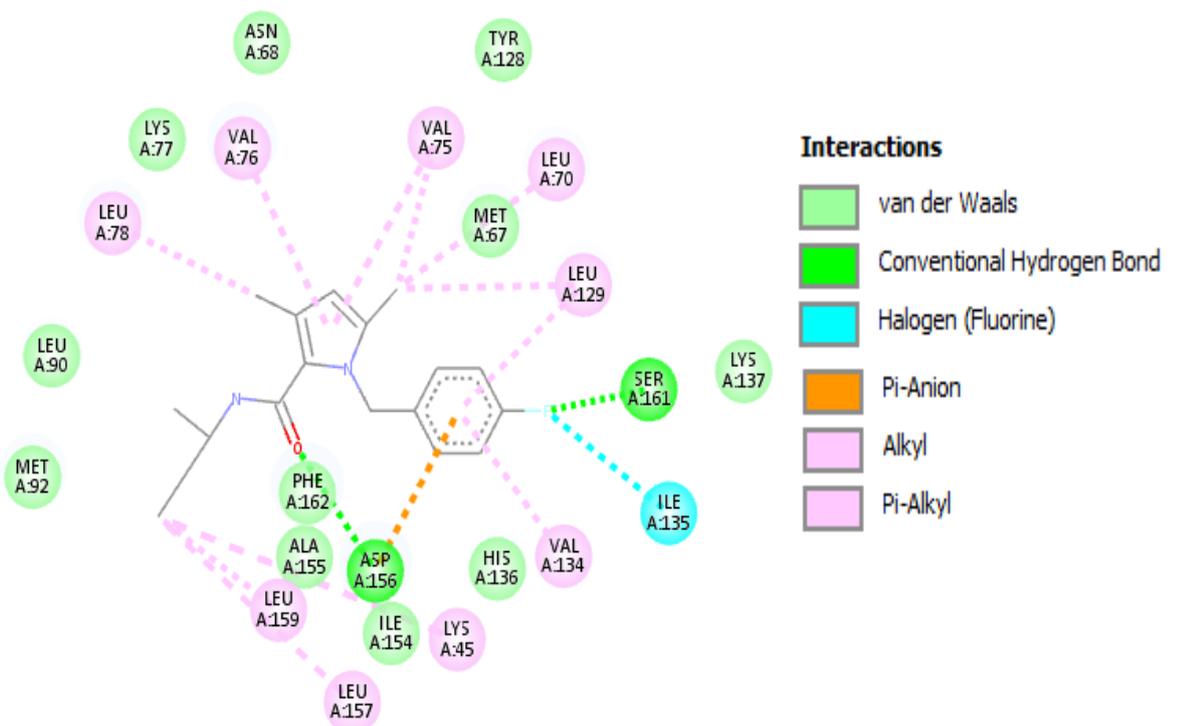


Figure 40 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé D en schéma 2D

▪ Discussion des résultats

Les liaisons hydrogènes

Tableau 12 Les liaisons hydrogène établies par le composé D avec le site actif

liaison H	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Types	Distance (Å)
01	O (N°2)----- N (N°1097) de l'AA : ASP156	Conventional Hydrogen Bond	3,011406
02	F (N°1)----- OG (N°1135) de l'AA : SER161	Conventional Hydrogen Bond	2,636243

Le composé D forme 2 liaisons hydrogènes covalentes (Conventional Hydrogen Bond) qui lient deux atomes électronégatifs discutées dans le tableau ci-dessus .

Le schéma graphique 2D indique aussi des forces attractives de Van Der Waals colorées en vert clair impliquant les aminoacides suivants :

- La Leucine 90 et la Isoleucine 154.
- Les Méthionines numérotées : 67 ; 92 et les Lysines 77 ; 137.
- L'Asparagine 68 ; l'Arginine 71 ; la Lysine 77 ; La Tyrosine 128 ; l'Histidine 136 ; l'Alanine 155 et la phénylalanine 162.

En rose s'ajoutent des interactions hydrophobes réalisées par les alkyls hydrocarbonés apolaires que nous retrouvons entre :

- Les ramifications hydrocarbonées du ligand D avec les radicaux aliphatiques des aminoacides : LEU 70 ; 78 ; 129 ; 157 ; 159 et VAL 75 ainsi que LYS 45 .
- Les cycles du ligand D et les radicaux des aminoacides Valines numérotés 75 ; 76 ; 134 et la Leucine 129 formant des interactions Pi-Alkyle.

Les systèmes π , possédant alternativement des sites riches et pauvres en électrons, aboutissant à une interaction électrostatique non-covalente de type Pi-Anion dont l'attraction a lieu entre le centre du cycle du ligand D et le radical de l'acide aminé Aspartique porteur d'une charge négative issue du groupement COO^- .

Une liaison halogène de nature très proche de la liaison Hydrogène entre l'halogène Fluor électrodéficient et l'acide aminé Isoleucine numéroté 135.

2. Essais de modélisation moléculaire

Dans le but de découvrir de nouveaux inhibiteurs plus puissants que 1HX, des substitutions ont été apportées à la structure de ce dernier dont l'affinité est de 5.06 M^{-1} sur laquelle nous avons effectué 2 types de substitution : 10 mono substitutions et 11 bi substitutions indiquées dans le tableau 13 dans lequel est également représenté le modèle bidimensionnel du ligand de référence (1HX), tiré de la PDB avec les différents atomes numérotés.

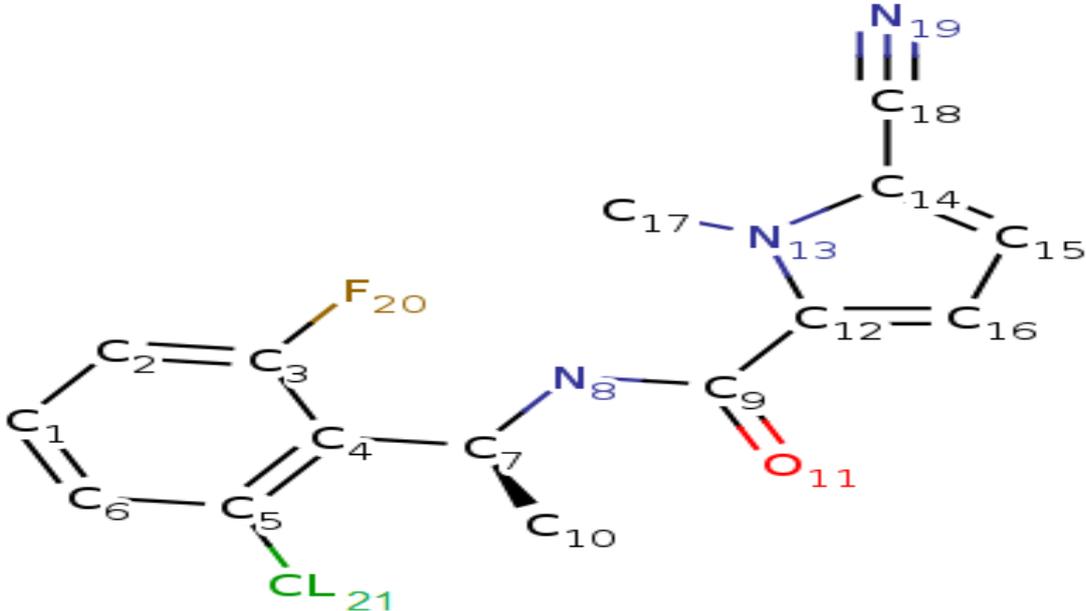
La substitution consistait en l'ajout d'un groupement méthyle (CH_3), d'un hydroxyle (OH), d'une fonction amine (NH_2) ou d'un cycle benzène à la place des hydrogènes liés à certains carbones et azotes de l'inhibiteur 1HX.

La mono substitution a concerné 10 composés et a permis une amélioration de l'affinité par sept d'entre eux : 1, 2, 3, 6, 7, 8 et 9; la meilleure (7.83 M^{-1}) étant celle du composé 1.

De la bi substitution résulte 11 composés parmi lesquels neuf ont des affinités améliorées supérieures à 5.06 M^{-1} représentées par les composés 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21; les 2 meilleurs étant les composés 11 et 14 dont l'affinité est supérieure à 7 M^{-1} .

L'analyse visuelle des interactions ne concernera que les composés 1, 11 et 14 ayant des affinités supérieures à 7 M^{-1} .

Tableau 13 Les mono et bi substitutions de 1HX

POSITIONS D'ATOMES DU 1HX								
	LES MONO-SUBSTITUTIONS							
	C6	C7	N8	C10	N13	C17	C18	Score (M ⁻¹)
1			NH ₂				7.83	
2		OH					6.72	
3		CH ₃					6.25	
4					Benzène		3.60	
5						NH ₂	3.89	
6			OH				6.57	
7				OH			6.09	
8	NH ₂						6.32	
9		NH ₂					4.42	
10						NH ₂	5.93	
	LES BI-SUBSTITUTIONS							
	C6	C7	N8	C10	N13	C17	C18	Score (M ⁻¹)
11			OH	NH ₂				7.93
12			CH ₃	NH ₂				6.79
13				NH ₂		Benzène		5.05
14	NH ₂			NH ₂				7.81
15		NH ₂		NH ₂				6.25
16			OH			Benzène		2.34
17			OH	OH				6.53
18	NH ₂		OH					6.86
19		NH ₂	OH					5.24
20			OH			NH ₂		6.60
21				OH		NH ₂		5.57

2.1 Évaluation pharmacologique « Drug-Likeness »

Une démarche importante est celle d'évaluer les propriétés pharmacologiques, pour déduire si nos trois composés 1, 11 et 14 peuvent agir comme médicament, par l'utilisation du logiciel "DruLiTo" qui estime la biodisponibilité à travers l'application des filtres suivants :

- La règle de Lipinski.
- Filtre de Veber.
- Filtre de Ghose.
- MDDR like rule, avec MDDR : MDL Drug Data Report
- BBB likeness, avec BBB : Blood Brain Barrier.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 14 et la figure 41

Tableau 14 Propriétés physico-chimiques des meilleurs composés de la substitution

Composé	PM (g/mol)	Log P	Accepteur de H	Donneur de H	Surface Polaire	Réfractivité molaire	Nombre d'Atome	Liaison Rotable
1	320.08	1.803	5	2	83.84	41.06	36	5
11	336.08	1.259	4	2	95.28	43.62	37	5
14	335.09	0.773	6	3	109.86	45.28	38	5

The screenshot shows the DruLiTo software interface. At the top, there is a menu bar with 'File' and 'Help'. Below it is a toolbar with various filter options: Properties, Lipinski's Rule, Ghose Filter, CMC-50-Like Rule, Veber Filter, MDDR-Like Rule, BBB Likeness, uwQED, wQED, AllSelectedFilters, and Summary. The main window displays a table with columns: Sr..., Title, MW, logp, Alogp, HBA, HBD, TPSA, AMR, nRB, nAtom, nAcidic..., RC, nRigidB, nAtom..., nHB, and SAlerts. Three rows are visible, corresponding to 'Composé 1', 'Composé 11', and 'Composé 14'. A dialog box titled 'Customize MDDR Like Rule' is open in the center, with three input fields: 'No. Rings >=' set to 2, 'No. of Rigid bonds >=' set to 17, and 'No. Rotatable bonds >=' set to 5. There are 'Reset' and 'Apply' buttons in the dialog. At the bottom of the interface, there is a file path 'C:\Users\pc\Desktop\1\supermol.mol', a 'Browse' button, and buttons for 'Calculate Properties', 'Apply Filter', and 'Reset'. Below these are checkboxes for various filters: Lipinski's Rule, Ghose Filter, CMC-50-Like Rule, Veber Filter, MDDR-Like Rule, BBB Likeness, Unweighted QED, and Weighted QED, each with a 'customize' button. The status bar at the bottom right indicates 'Molecules completed(3)'.

Figure 41 Les meilleurs résultats de la substitution évalués par le logiciel DruLiTo

Nous avons appliqué tous les filtres proposés par le logiciel à l'exception de CMC-50-Like Rule puisqu'il est fondé sur les mêmes critères (poids moléculaire, logP, nombre d'atomes et

réfractivité) auxquels Ghose (**Ghose, A.K et al., 1999**) propose des intervalles sauf que ce filtre ne considère que la médiane de ces intervalles ou les modifie selon la classe du médicament.

Nous avons travaillé avec les paramètres par défaut sauf pour le filtre MDDR-Like Rule que nous avons modifié pour prendre en compte les Mid-Structures qui se trouvent entre les structures Drug-Like et les structures non-Drug-Like d'après (**Oprea. T.I et al., 2000**).

- **Commentaire**

A l'opposé du composé 14 représenté en rose, les composés 1 et 11 mentionnés en vert remplissent les critères ADME de biodisponibilité orale.

Afin de tester si l'identification des composés drug-like par les propriétés ADME que calculent DruLiTo était indicatrice de leur toxicité, nous avons consulté la base de données SuperToxic [132] dédiée aux molécules toxiques à partir de laquelle nous avons téléchargé 10 composés toxiques pour les évaluer par les filtres précédemment cités de DruLito.

The screenshot shows the DruLiTo software interface. At the top, there is a menu bar with 'File' and 'Help'. Below it is a toolbar with various filter options: Properties, Lipinski's Rule, Ghose Filter, CMC-50-Like Rule, Veber Filter, MDDR-Like Rule, BBB Likeness, uwQED, wQED, AllSelectedFilters, and Summary. The main area contains a table with 10 rows of data. The columns are: S..., Title, MW, logp, Alogp, HBA, HBD, TPSA, AMR, nRB, nAtom, nAcidic..., RC, nRigidB, nAtomRI..., nHB, and SAlerts. The rows are color-coded: rows 1-6 are pink, rows 7-9 are green, and row 10 is pink. A dialog box titled 'Customize MDDR Like Rule' is open in the center, showing three input fields: 'No. Rings >=' with a value of 2, 'No. of Rigid bonds >=' with a value of 17, and 'No. Rotatable bonds >=' with a value of 5. There are 'Reset' and 'Apply' buttons at the bottom of the dialog. Below the table, there is a file path 'C:\Users\pc\Desktop\tox10\TOXMOL.mol' and buttons for 'Browse', 'Calculate Properties', 'Apply Filter', and 'Reset'. At the bottom, there are checkboxes for various filters: Lipinski's Rule, Ghose Filter, CMC-50-Like Rule, Veber Filter, MDDR-Like Rule, BBB Likeness, Unweighted QED, and Weighted QED, each with a 'customize' button. The text 'Molecules completed(10)' is visible at the bottom right.

S...	Title	MW	logp	Alogp	HBA	HBD	TPSA	AMR	nRB	nAtom	nAcidic...	RC	nRigidB	nAtomRI...	nHB	SAlerts
1	Absentol	255.1	-2.577	-3.6	7	5	138.67	51.36	7	34	0	0	7	0	12	1
2	Acardite I	330.08	4.528	-1.158	4	2	69.64	34.33	5	38	0	3	20	2	6	2
3	Acetamine Diazo...	640.17	7.277	-0.222	11	1	151.73	110.09	13	78	0	4	35	2	12	5
4	Acetate d'isopro...	964.35	4.106	-4.244	26	4	317.6	207.13	27	124	0	6	46	0	30	4
5	Acetol	497.2	4.872	-3.04	8	0	88.51	93.14	7	64	0	6	35	3	8	1
6	Ag 620	376.06	3.913	-0.52	4	1	107.51	46.32	4	42	0	3	24	2	5	3
7	Alanine Nitrogen...	377.29	2.786	-0.795	4	3	63.93	105.72	5	66	0	4	25	0	7	1
8	Albamine	281.1	2.488	0.221	6	4	103.36	46.34	6	35	0	1	13	1	10	3
9	Ammonium plati...	360.14	1.638	-0.024	5	1	66.29	71.02	6	46	0	3	20	3	6	1
10	Antioxydant D	343.13	4.575	-0.886	4	2	70.92	28.52	6	43	0	4	23	4	6	2

Figure 42 Dix molécules toxiques évaluées par le logiciel DruLito

Sur un total de 10 molécules toxiques, DruLiTo indique 8 composés en rose parce qu'ils ne valident pas les propriétés ADME qui caractérisent un composé « drug-like », concluant ainsi

qu'une invalidation des propriétés ADME par DruLiTo peut être indicatrice de la toxicité qui doit être vérifiée par des méthodes plus pertinentes.

- **Conclusion**

Le logiciel DruLiTo est utile pour l'identification des composés « drug-like » et non pas pour distinguer les composés à potentiel médicamenteux (effet thérapeutique), il peut aussi offrir un premier pronostic de la toxicité par son invalidation des composés auxquels s'appliquent des filtres qui prédisent la biodisponibilité orale « drug likeness ».

Une toxicité qu'il faut vérifier par de nombreuses méthodes *in silico* comme : construction de bases de données toxicologiques, établissement de modèles QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship ou relation quantitative structure-activité), et méthodes basées sur la structure. [133]

2.2 L'analyse visuelle et discussion des interactions

A - Etude des interactions du composé 1

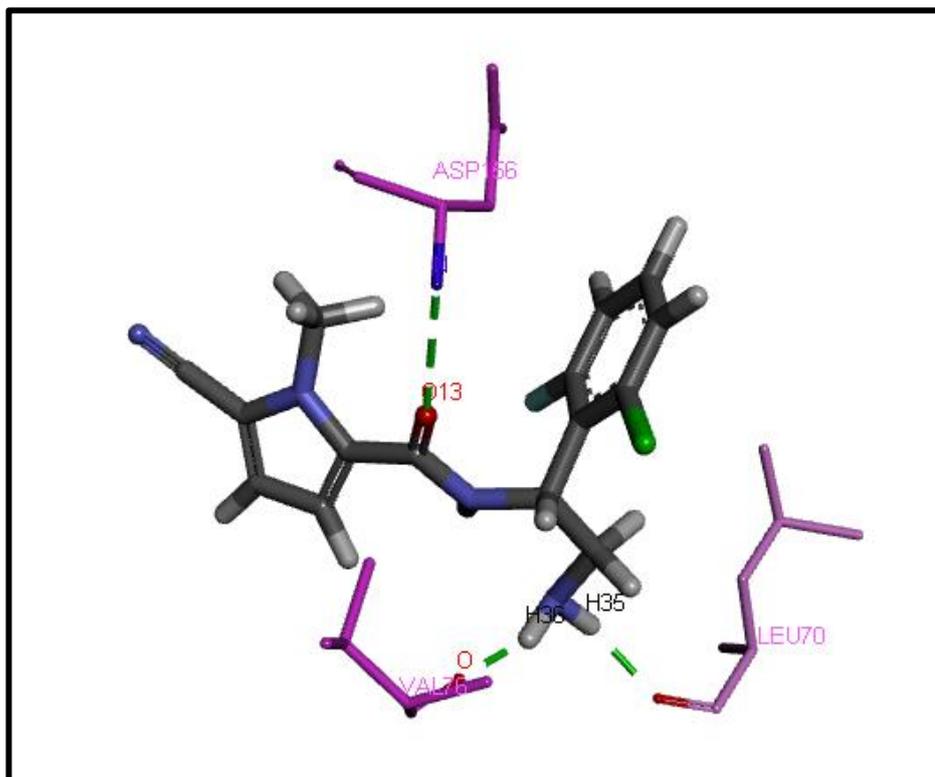


Figure 43 Mode d'interactions du composé 1 avec le site actif de la RIPK1

La présentation des interactions récepteur-ligand en schéma 2D

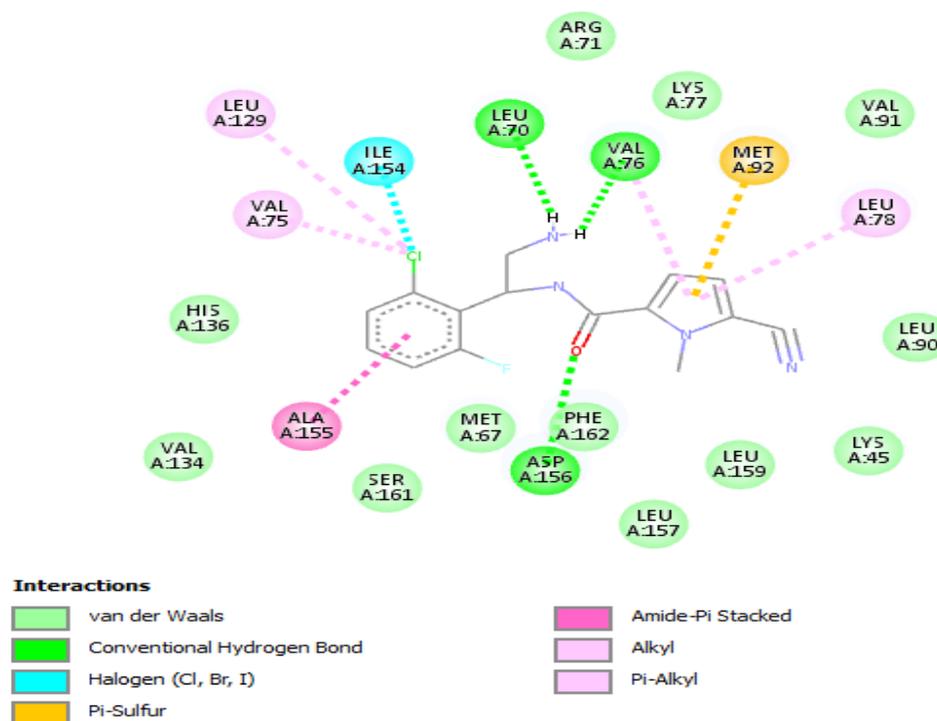


Figure 44 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé 1 en schéma 2D

Discussion des résultats

Les liaisons hydrogènes

Tableau 15 Les liaisons hydrogène établies par le composé 1 avec le site actif

liaisons H	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Types	Distance (Å)
01	N(N°26)=H ----- A:LEU70:O(N°424)	Conventional Hydrogen Bond	1,899221
02	N(N°26)=H ----- A:VAL76:O(N°477)	Conventional Hydrogen Bond	1,913118
03	O(N°13) ----- A:ASP156:N(N°1097)	Conventional Hydrogen Bond	2,741822

Les interactions qui figurent sur le schéma 2D sont toutes électrostatiques. En plus des liaisons Hydrogène discutées dans le tableau ci-dessus, on trouve aussi :

Les forces attractives de Van Der Waals que représentent les aminoacides suivants :

- Leu 90 ; 157 ; 159 et Lys 45 ; 77 ainsi que Val 91 et 134.
- Met 67 ; Arg 71 ; His 136 ; Ser 161 et Phe 162.

Des interactions Hydrophobes :

- De types alkyles établies entre le chlore et les radicaux hydrocarbonés de la Leu 129 et Val 75.
- De type Pi-Alkyle établies entre le noyau du cyclopentane et les radicaux hydrocarbonés apolaires du Leu 78 et Val 76.

D'autres interactions électrostatiques s'ajoutent aux précédentes comme :

L'interaction Pi-Amide ou N-H/ π entre le noyau du cycle aromatique et le N-H de l'acide aminé Alanine numéroté 155 où s'établit une interaction dite liaison Hydrogène non-covalente.

L'interaction Pi-Soufre est aussi un type de liaison Hydrogène X-H/ π qu'on considère une forme d'interaction non-covalente où le nuage π du cycle est l'accepteur et X-H avec X un atome électronégatif (O, N, S) donneur.

Une liaison halogène de nature très proche de la liaison Hydrogène entre l'halogène Cl électrodéficient et l'acide aminé Isoleucine numéroté 154.

B- Etude des interactions du composé 11

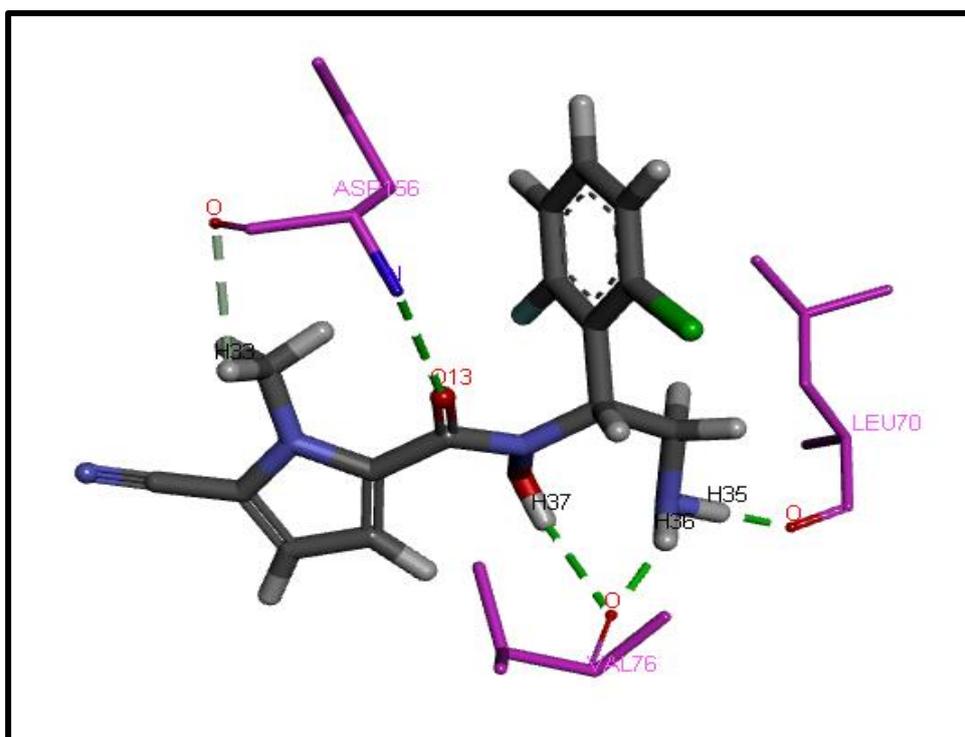


Figure 45 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interactions du composé 11 avec le site actif de la RIPK1

La présentation des interactions récepteur-ligand en schéma 2D

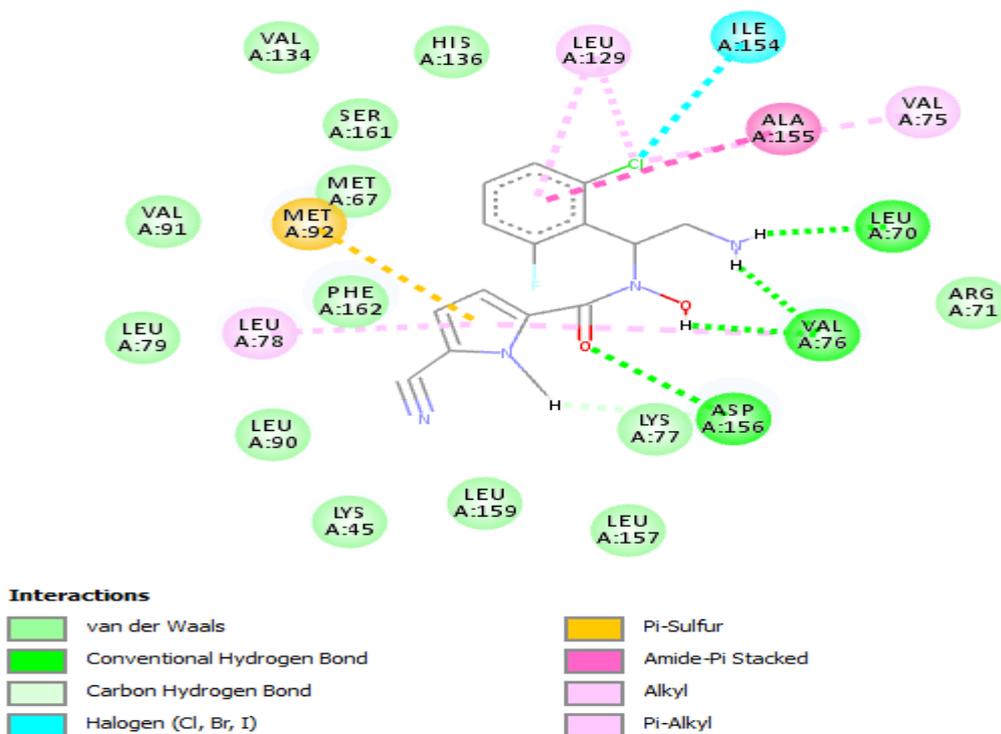


Figure 46 La présentation des interactions récepteur-ligand du composé 11 en schéma

Discussion des résultats

Les liaisons hydrogènes

Tableau 16 Les liaisons hydrogène établies par le composé 11 avec le site actif

liaison H	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Types	Distance (Å)
01	O(N°13)-----A:ASP156:N(N°1097)	Conventional Hydrogen Bond	2,689672
02	N(N°26)=H----- A:LEU70:O(N°424)	Conventional Hydrogen Bond	1,663008
03	N(N°26)=H -----A:VAL76:O(N°477)	Conventional Hydrogen Bond	2,457570
04	O(N°29)=H----- A:VAL76:O(N°477)	Conventional Hydrogen Bond	2,457570
05	C (N°21)=H ----- A:ASP156:O(N°1100)	Carbon Hydrogen Bond	2,673903

Suite à la 2^{ème} substitution réalisée sur le composé 1, le composé 11 présente les mêmes interactions établies entre le composé 1 et la RIPK1 avec en plus:

Une liaison Hydrogène covalente entre l'oxygène numéro 29 du ligand et l'oxygène 477 de l'acide VAL76.

une liaison Hydrogène non-covalente formée entre l'hydrogène lié a un carbone numeroté 21 du ligand et un oxygène appartenant à l'acide Aspartique 156.

Une interaction Pi-alkyle qui impliquera Leu 78 et Val 76 interagissant avec le cyclopentane et auxquels s'ajoute l'interaction de la Leucine 129 avec le noyau benzène.

C - Etude des interactions du composé 14

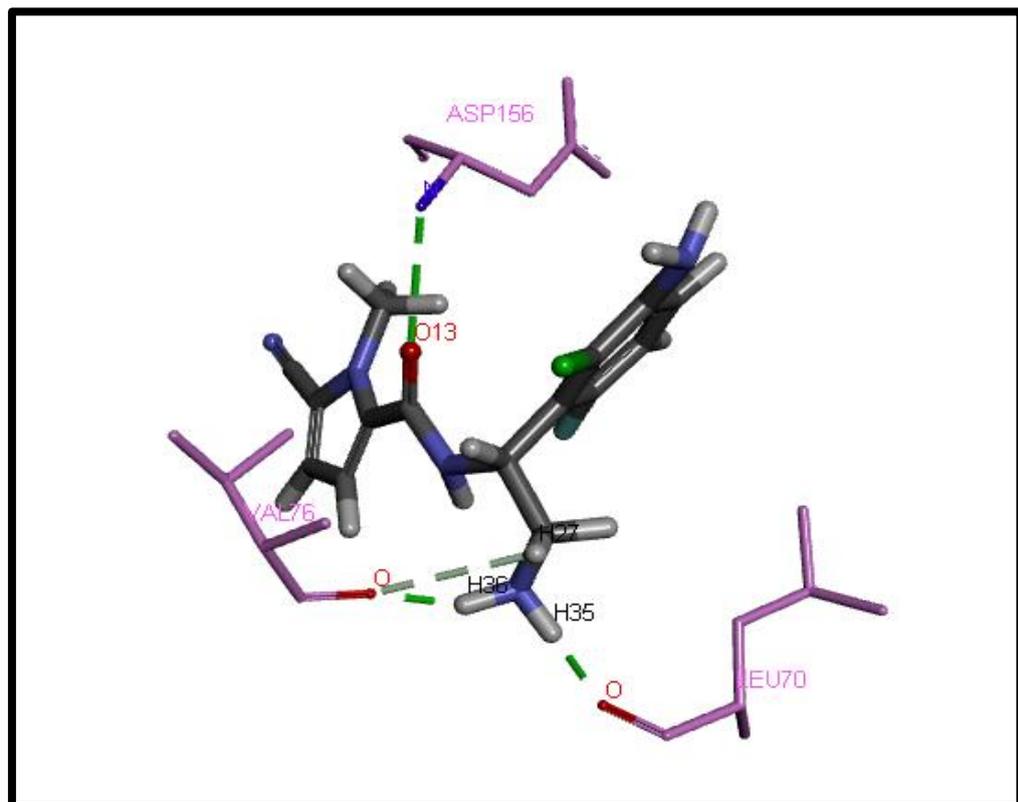


Figure 49 Analyse visuelle par Biovia Discovery Visualizer du mode d'interaction du composé 14 avec le site actif de la RIPK1

La présentation des interactions récepteur-ligand en schéma 2D

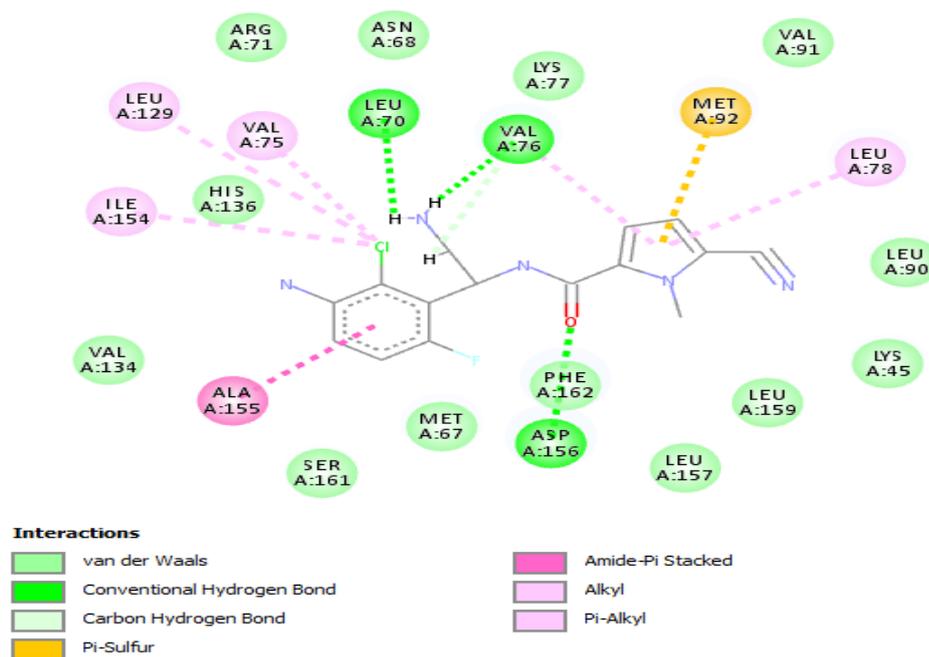


Figure 50 Les liaisons hydrogène établies par le composé 14 avec le site actif

Discussion des résultats

Les liaisons hydrogènes

Tableau 17 Les liaisons hydrogène établies par le composé 14 avec le site actif

liaison H	Mode de liaison d'inhibiteur avec les résidus du site actif	Types	Distance (Å)
01	O(N°13)-----A:ASP156:N(N°1097)	Conventional Hydrogen Bond	2,803065
02	N(N°26)=H ----- A:LEU70:O(N°424)	Conventional Hydrogen Bond	1,970228
03	N(N°26)=H ----- A:VAL76:O(N°477)	Conventional Hydrogen Bond	1,902715
04	C(N°11)=H ----- A:VAL76:O(N°477)	Carbon Hydrogen Bond	3,034556

En plus des liaisons Hydrogène citées dans le tableau ci-dessus, on note :

Les forces attractives de Van Der Waals représentées par :

- Leu 90 ; 157 ; 159 et Lys 45 ; 77 ainsi que Val 91 et 134.
- Met 67 ; Asn 68 ; Arg 71 ; His 136 ; Ser 161 et Phe 162.

Des interactions :

Alkyle établies entre le chlore et les radicaux hydrocarbonés de la Valine 75 ; Leucine 129 et Isoleucine 154

Pi-alkyle établies entre le noyau du cyclopentane et les radicaux hydrocarbonés apolaires de la Leu 78 et Val 76

Pi-amide non-covalente entre le noyau du cycle aromatique et le N-H de l'acide aminé Alanine numéroté 155.

Pi-Soufre, formée entre l'atome d'hydrogène partiellement positif influencé par le soufre environnant et les électrons π chargés négativement du benzène.

Une liaison halogène entre l'atome Cl électrodéficient et l'acide aminé Isoleucine numéroté 154.

Conclusion
&
Perspectives

Le présent travail a pour objectif de trouver un composé à meilleur effet inhibiteur que le composé « 1HX » qui agit sur la cible RIP1 Kinase, enzyme impliquée dans la nécroptose.

Auparavant, nous avons fait une étude comparative de l'efficacité de deux logiciels de docking : Surflex et Autodock, dans le but de poursuivre notre recherche avec le plus fiable d'entre eux. Nous avons téléchargé 300 complexes à partir de la PDB aléatoirement et déterminé le RMSD, premier critère de fiabilité, par les deux programmes, les résultats positifs étant ceux ayant une valeur inférieure ou égale à 2 Å.

Les pourcentages obtenus ont été les suivants : **62.67 %** pour Surflex et **56.67 %** pour Autodock. Pour confirmation, ce test a été suivi d'une analyse visuelle de la superposition de 3 complexes qui ont un RMSD inférieur, égal et supérieur à 2 Å pour les deux logiciels.

Après, nous sommes passées au deuxième paramètre testant la fiabilité qui est la détermination du coefficient de corrélation linéaire entre l'activité biologique expérimentale (IC50) et les scores d'affinités pour Surflex et d'énergie pour Autodock en utilisant 30 complexes ayant une IC50, quatre d'entre eux ayant pour cible l'enzyme qui induit notre maladie d'intérêt. Les calculs d'Autodock ont été corrélés aux activités biologiques avec un coefficient « r » égal à **0.6585**. Ce 2^{ème} test a été décisif dans le choix du logiciel le plus performant après avoir obtenu un meilleur coefficient de corrélation avec Surflex : **- 0.7358**.

Nous avons ainsi poursuivi notre travail avec Surflex et procédé à la recherche de nouveaux inhibiteurs théoriques plus efficaces que notre ligand de référence 1HX.

Pour cela, nous avons téléchargé à partir de la chimiothèque "**Pubchem**" 311 structures avec un taux de similarité de 87% à notre ligand de référence 1HX et évalué leurs affinités envers l'enzyme RIP1 Kinase. 20 composés parmi les 311 ont présenté des affinités supérieures à celle de notre ligand qui est de 5.06 M^{-1} .

Quatre composés : A, B, C et D, à la tête de la liste des résultats du criblage virtuel par le logiciel Surflex, avec des affinités successives de : 7.71, 7.18, 7.18 et 7.08 M^{-1} , peuvent être proposés comme de meilleurs inhibiteurs potentiels de la cible enzymatique RIPK1.

La sélection de ces 4 meilleurs inhibiteurs a été complétée et vérifiée par l'analyse des interactions de divers types : Van Der Waals, Pi-Anion, Pi-Sulfur, Pi-Pi stacking, Alkyl et Pi-Alkyl, et les liaisons Hydrogènes qui sont au nombre de 4 pour le composé A, 1 pour le composé B, 1 pour le composé C et 2 pour le composé D.

Nous avons confirmé la biodisponibilité par voie orale de ces quatre composés, car ne présentant aucun effet néfaste théoriquement, par l'application de la règle cinq de Lipinski.

Nous avons poursuivi avec des essais de modélisation structurale par 10 mono substitutions et 11 bi substitutions. Seize (16) parmi les 21 composés substitués ont eu des affinités améliorées, supérieures à celle du ligand 1HX.

Nous n'avons retenu que les trois meilleurs composés substitués : composés 1, 11 et 14 ayant les affinités successives suivantes : 7.83 ; 7.93 et 7.81 M⁻¹ pour effectuer l'analyse du mode d'interactions établies puis, calculer des propriétés physico-chimiques par le logiciel DruLiTo qui permet aussi l'évaluation de leur biodisponibilité orale par des filtres correspondant à : la règle de Lipinski ; le filtre de Ghose ; BBB likeness....etc ; supposés être des indicateurs de la toxicité par leur invalidation des composés.

Nous clôturons ce travail en suggérant la nécessité d'approfondir cette étude théorique par plus de tests *in silico* qu'il faut par la suite vérifier et confirmer par des études expérimentales *in vitro* et *in vivo*.

Comme perspectives, nous proposons des voies futures pour les recherches de ce genre, comme :

- Se procurer de nouveaux logiciels pour bien élargir le champ de travail.
- S'initier à l'algorithmique pour créer une application de calcul de docking en collaboration avec des chercheurs de diverses disciplines (chimistes, informaticiens...).
- S'équiper pour voir les tests *in vitro* devenir réalité.

*Les références
bibliographiques*

- [1] Kuntz, I.D.; Blaney, J.M.; Oatley, S.J.; et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol*, 1982. **161**(2): p. 269-88.
- [2] Green DR, Oberst A, Dillon CP, et al. RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases : a mystery in five acts. *Mol Cell* 2011 ; 44 : 9-16.
- [3] Cabon L et al. 2013. La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Med Sci (Paris)* ; 29 : 1117–1124
- [4] Ameisen JC. La mort cellulaire programmée : programme de mort ou programme de vie ? *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 109–110. [[CrossRef](#)] [[EDP Sciences](#)] [[Google Scholar](#)]
- [5] Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal : the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 2011 ; 35 : 445–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
- [6] Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000 ; 10 : 369-77.
- [7] Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2012 ; 942 : 157-83.
- [8] Couzinet A, Hérincs Z, Hueber AO. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Med Sci (Paris)* 2002 ; 18 : 841-52.
- [9] Meier P, Vossden KH. Lucifer's labyrinth-ten years of path finding in cell death. *Mol Cell* 2007 ; 28 : 746-54.
- [10] Green DR. The end and after : how dying cells impact the living organism. *Immunity* 2011 ; 35 : 441-4.
- [11] LATRECHE-CARTON C. Rôle oncogénique des fragments de p65/RelA NF-κB générés par l'activité de RIPK3. Biologie-Santé. UNIVERSITE DE LILLE 2, 2017, 233.
- [12] Canbay, A., Taimr, P., Torok, N., Higuchi, H., Friedman, S., and Gores, G.J. (2003). Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 83, 655–663.
- [13] Filliol A. Etude de l'hépatolyse induite par les cellules immunitaires dans des modèles murins d'hépatites : rôles des protéines RIPK1 et PARP1/2. Biologie et Sciences de la santé. UNIVERSITÉ DE RENNES 1. 2016. 215.
- [14] Ameisen JC. Anoikis. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 117.
- [15] Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, Chiarugi P. Anoikis : an emerging hallmark in health and diseases. *J Pathol* 2012 ; 226 : 380-93.
- [16] Galluzzi L, Vanden Berghe T, Vanlangenakker N, et al. Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011 ; 289 : 1-35.

- [17] Green, DR., Lambi, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(12), (2015).
- [18] Nugues, AL., El Bouazzati, H., Héтуin, D., Berthon, C., Loyens, A., Bertrand, E., Jouy, N., Idziorek, T., Quesnel, B. RIP3 is downregulated in human myeloid leukemia cells and modulates apoptosis and caspase-mediated p65/RelA cleavage. *Cell Death Dis* 5, e1384 (2014).
- [19] Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 2009 ; 9 : 353-63.
- [20] Codogno P. L'autophagie, dégrader plus pour vivre plus, mais attention ! *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 323-4.
- [21] Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001 ; 4 : 303-13.
- [22] Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy : mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 2008 ; 15 : 1153-62.
- [23] Mailleux AA, Overholtzer M, Brugge JS. L'entose, mort cellulaire par cannibalisme entre cellules tumorales. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 246-8.
- [24] White E. Entosis : it's a cell-eat-cell world. *Cell* 2007 ; 131 : 840-2.
- [25] Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, et al. Dying for a cause : NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 2011 ; 18 : 581-8.
- [26] Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps : double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012 ; 189 : 2689-95.
- [27] Lippens S, Denecker G, Ovaere P, et al. Death penalty for keratinocytes : apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ* 2005 ; 12 : 1497-508.
- [28] Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol* 2008 ; 180 : 451-8.
- [29] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis : an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012 ; 149 : 1060-72.
- [30] Dempsey, PW., Doyle, SE., He, JQ., Cheng, G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4), 193-209 (2003).
- [31] Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F., Vanden Berghe, T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* 3(115), re4 (2010).
- [32] Humphries, F., Yang, S., Wang, B., and Moynagh, P.N. (2015). RIP kinases: key decision makers in cell death and innate immunity. *Cell Death Differ.* 22, 225–236.
- [33] Silke, J., Rickard, J.A., and Gerlic, M. (2015). The diverse role of RIP kinases in necroptosis and inflammation. *Nat. Immunol.* 16, 689–697.

- [34] Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 112–119.
- [35] Jouan-Lanhouet, S. et al. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin. Cell Dev. Biol.* **35**, 2–13 (2014).
- [36] Vanden Berghe, T., Hassannia, B. & Vandenabeele, P. An outline of necrosome triggers. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2137–2152 (2016).
- [37] Davidovich P, Kearney CJ, Martin SJ. Inflammatory outcomes of apoptosis, necrosis and necroptosis. *Biol Chem* 2014; 395: 1163–1171.
- [38] Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 2015; 517: 311–320.
- [39] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 331–342.
- [40] Lau A, Wang S, Jiang J, Haig A, Pavlosky A, Linkermann A et al. RIPK3-mediated necroptosis promotes donor kidney inflammatory injury and reduces allograft survival. *Am J Transplant* 2013; 13: 2805–2818.
- [41] Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 2013; 38: 209–223.
- [42] Linkermann A, De Zen F, Weinberg J, Kunzendorf U, Krautwald S. Programmed necrosis in acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 3412–3419.
- [43] Kooijman E, Nijboer CH, van Velthoven CT, Kavelaars A, Kesecioglu J, Heijnen CJ. The rodent endovascular puncture model of subarachnoid hemorrhage: mechanisms of brain damage and therapeutic strategies. *J Neuroinflammation* 2014; 11: 2.
- [44] King MD, Whitaker-Lea WA, Campbell JM, Alleyne Jr CH, Dhandapani KM. Necrostatin-1 reduces neurovascular injury after intracerebral hemorrhage. *Int J Cell Biol* 2014; 2014: 495817.
- [45] Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 263–268.
- [46] Xu X, Chua CC, Kong J, Kostrzewa RM, Kumaraguru U, Hamdy RC et al. Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. *J Neurochem* 2007; 103: 2004–2014.
- [47] Li Y, Yang X, Ma C, Qiao J, Zhang C. Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* 2008; 447: 120–123.

- [48] Yamanaka K, Saito Y, Yamamori T, Urano Y, Noguchi N. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J Biol Chem* 2011; 286: 24666–24673.
- [49] Kolsch H, Ludwig M, Lutjohann D, Rao ML. Neurotoxicity of 24-hydroxycholesterol, an important cholesterol elimination product of the brain, may be prevented by vitamin E and estradiol-17beta. *J Neural Transm* 2001; 108: 475–488.
- [50] Hughes TM, Kuller LH, Lopez OL, Becker JT, Evans RW, Sutton-Tyrrell K et al. Markers of cholesterol metabolism in the brain show stronger associations with cerebrovascular disease than Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012; 30: 53–61.
- [51] Yamanaka K, Urano Y, Takabe W, Saito Y, Noguchi N. Induction of apoptosis and necroptosis by 24(S)-hydroxycholesterol is dependent on activity of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 1. *Cell Death Dis* 2014; 5: e990.
- [52] Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T et al. Mitophagydependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *J Clin Invest* 2014; 124: 3987–4003.
- [53] Tait SW, Oberst A, Quarato G, Milasta S, Haller M, Wang R et al. Widespread mitochondrial depletion via mitophagy does not compromise necroptosis. *Cell Rep* 2013; 5: 878–885.
- [54] Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 2689–2701.
- [55] Linkermann A, Brasen JH, Himmerkus N, Liu S, Huber TB, Kunzendorf U et al. Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int* 2012; 81: 751–761.
- [56] Lin J, Li H, Yang M, Ren J, Huang Z, Han F et al. A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell Rep* 2013; 3: 200–210.
- [57] Smith CC, Davidson SM, Lim SY, Simpkin JC, Hothersall JS, Yellon DM. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther* 2007; 21: 227–233.
- [58] Koshinuma S, Miyamae M, Kaneda K, Kotani J, Figueredo VM. Combination of necroptosis and apoptosis inhibition enhances cardioprotection against myocardial ischemiareperfusion injury. *J Anesth* 2014; 28: 235–241.
- [59] Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M et al. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2014; 103: 206–216.
- [60] Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, den Ouden K, van Middelaar BJ, Doevendans PA et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo. *Basic Res Cardiol* 2012; 107: 270.

- [61] Dannappel M, Vlantis K, Kumari S, Polykratis A, Kim C, Wachsmuth L et al. RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis. *Nature* 2014; 513: 90–94.
- [62] Pierdomenico M, Negroni A, Stronati L, Vitali R, Prete E, Bertin J et al. Necroptosis is active in children with inflammatory bowel disease and contributes to heightened intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2014; 109: 279–287.
- [63] Homsí E, Andreazzi DD, Lopes de Faria JB, Janino P. TNF-alpha-mediated cardio-renal injury after rhabdomyolysis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 308: F1259–F1267.
- [64] Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 1541–1549.
- [65] Takemoto K, Hatano E, Iwaisako K, Takeiri M, Noma N, Ohmae S et al. Necrostatin-1 protects against reactive oxygen species (ROS)-induced hepatotoxicity in acetaminophen-induced acute liver failure. *FEBS Open Bio* 2014; 4: 777–787.
- [66] He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 2009; 137: 1100–1111.
- [67] Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* 2009; 325: 332–336.
- [68] Linkermann A, Brasen JH, De Zen F, Weinlich R, Schwendener RA, Green DR et al. Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor-alpha-induced shock. *Mol Med* 2012; 18: 577–586.
- [69] Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, De Zen F et al. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 16836–16841.
- [70] Wu J, Huang Z, Ren J, Zhang Z, He P, Li Y et al. Mik1 knockout mice demonstrate the indispensable role of Mik1 in necroptosis. *Cell Res* 2013; 23: 994–1006.
- [71] Ch'en IL et al. 2011. Mechanisms of necroptosis in T cells. *J Exp Med.* 208:633–41 [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)].
- [72] Dempsey LA. 2013. Interferon-induced necroptosis. *Nat Immunol.* 2013;14:892–2. [[Google Scholar](#)].
- [73] [Zhenyi Su](#) . 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. [NCBI]
- [74] Linkermann A, Green DR. January 2014. Necroptosis. *The New England Journal of Medicine.* 370 (5): 455–65.
- [75] Necroptose. [Académie nationale de pharmacie] [En ligne] <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Nécroptose> 15/1/2016. Consulté le : [23/5/2019].

[76] Duanwu Zhang et al. 2010 jul. receptor-interacting protein (RIP) kinase family. *cell mol immunol.* 7(4): 243–249 [PubMed] [Google Scholar].

[77] RIPK1. [Revolvy] [En ligne] « <https://www.revolvy.com/page/RIPK1> » consulté le : [23/5/2019].

[78] Vandenabeele P et al. February 2013. "Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models". *Cell Death and Differentiation.* 20 (2): 185–7.

[79] Hsu, H., Huang, J., Shu, H.-B., Baichwal, V., Goeddel, D. V. 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* 4: 387-396. [PubMed: 8612133].

[80] Zhu G et al. August 2007. "Optineurin negatively regulates TNF α - induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP". *Current Biology.* 17 (16): 1438–43.

[81] RIPK1 receptor interacting serine/threonine kinase 1 [Homo sapiens (human)] . [NCBI] [En ligne] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=8737> consulté le : [23/5/2019].

[82] Diana García García et al. juin-juillet 2016. Crystal Wars : la nécroptose contre-attaque. *médecine/sciences.* 6-7, vol. 32.

[83] MLKL, Mixed lineage kinase domain like pseudokinase [NCBI] [En ligne] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/197259> consulté le : [24/5/2019].

[84] Liming Sun et al. 2012. Mixed Lineage Kinase Domain – like Protein Mediates Necrosis Signaling Downstream of RIP3 KINASE. *Elsevier Inc .* Volume 148 , issue 1 , P213-227.

[85] Xie T, Peng W, Liu Y, Yan C, Maki J, Degterev A, Yuan J, Shi Y . 2013 Mar 5. Structural Basis of RIP1 Inhibition by Necrostatins. *Structure.* 21(3):493-9. doi: 10.1016/j.str.2013.01.016. [pubmed]

[86] Sibiriline : une nouvelle molécule inhibant la mort cellulaire par nécrose régulée. [biogenouest] [En ligne] <https://www.biogenouest.org/actualites/article/sibiriline-une-nouvelle-molecule-inhibant-la-mort-cellulaire-par-necrose-regulee> consulté le : [26/5/2019].

[87] Fabienne Le Cann et al. 17 July 2017. Sibiriline, a new small chemical inhibitor of receptor-interacting protein kinase 1, prevents immune-dependent hepatitis. *The journal FEBS.* 284 (2017) 3050–3068.

[88] Claire Delehouzé et al. 2017. 6E11, a highly selective inhibitor of Receptor-Interacting Protein Kinase 1, protects cells against cold hypoxia-reoxygenation injury. *Scientific reports* ,7 . 1-13 ; DOI : 10.1038/s41598-017-12788-4.

[89] Xie T, Peng W, Liu Y, Yan C, Maki J, Degterev A, Yuan J, Shi Y . 2013 Mar 5. Structural Basis of RIP1 Inhibition by Necrostatins. *Structure.*;21(3):493-9. doi:

10.1016/j.str.2013.01.016.

PMID:23473668

[pubmed]

<http://proteopedia.org/wiki/index.php/4itj>.

[90] Chimie générale. La délocalisation électronique, la conjugaison. [En ligne] http://www.sciences-en-ligne.com/DIST/Data/Ressources/lic2/chimie/chi_gen/chimie_structurale/delocalisation_electroniq.htm ; consulté le : [11/06/2019]

[91] Résonance. Chimie-organique.net [En ligne] « <https://www.chimie-organique.net/definition-resonance> » ; consulté le : [11/06/2019].

[92] Tian Xie et al; 2013. Structural basis of RIP1 inhibition by Necrostatins. *Structure*. 21, 493–499.

[93] G.L. Warren, C. Webster Andrews, A.M. Capelli, B. Clark, J. LaLonde, M.H. Lambert, M. Lindvall, N. Nevins, S.F. Semus, S. Senger, G. Tedesco, I.D. Wall, J.M. Woolven, C.E. Peishoff, M.S. Head. A critical assessment of docking programs and scoring functions. *Journal of Medicinal Chemistry* 49 (2006) 5912-5931.

[94] I. Helperin, B. Ma, H. Wolfson, R. Nussinov. Principles of dockings : an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *PROTEINS: Structure, Function and Bioinformatics* 47 (2002) 409-443.

[95] Mahdjoub Youcef. Développement d'une application distribuée en utilisant la plateforme Jini « Application docking moléculaire ». Département d'informatique. Université des Science et des Technologies d'Oran Mohamed Boudiaf, Date, 100.

[96] Brooijmans, N.; Kuntz, I.D. Molecular recognition and docking algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2003. 32: p. 335-73.

[97] Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem*, 2004. 47(7): p. 1739-49.

[98] Huang, S.Y.; Zou, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int J Mol Sci*, 2010. 11(8): p. 3016-34.

[99] Jain, A.N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J Med Chem*, 2003. 46(4): p. 499-511.

[100] Kuntz, I.D.; Leach, A.R. Conformational analysis of flexible ligands in macromolecular receptor sites. *Journal of Computational Chemistry*, 1992. 13: p. 730-748.

[101] Rarey, M.; Kramer, B.; Lengauer, T.; et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*, 1996. 261(3): p. 470-89.

[102] Kitchen, D.B.; Decornez, H.; Furr, J.R.; et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. 3(11): p. 935-49.

- [103] Huang, S.Y.; Zou, X. Advances and challenges in protein-ligand docking. *Int J Mol Sci*, 2010. **11**(8): p. 3016-34.
- [104] Metropolis, N.; Ulam, S. The Monte Carlo method. *J Am Stat Assoc*, 1949. **44**(247): p. 335-41.
- [105] Darwin, C. On the Origin of Species. Harvard Univ. Press, Cambridge, Massachusetts ed. 1859.
- [106] Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol*, 1997. **267**(3): p. 727-48.
- [107] Baxter, C.A.; Murray, C.W.; Clark, D.E.; et al. Flexible docking using Tabu search and an empirical estimate of binding affinity. *Proteins*, 1998. **33**(3): p. 367-82.
- [108] Nathalie Lagarde. Méthodes de criblage virtuel in silico : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine 6. Bio-Informatique, Biologie Systémique [qbio. QM]. Conservatoire national des arts et metiers - CNAM, 2014. Français. NNT: 2014CNAM0943. Tel-01132490.
- [109] MORRIS G. M., GOODSSELL D. S., HALLIDAY R. S. et al, Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function., *J. Comput. Chem.*, 1998, **19** : 1639-1662.
- [110] Solis F., Wets J. R. Minimization by random search techniques. *Mathematics of Operations Research*. 1981; **6**: 19-30.
- [111] Gautier M. Etude structurale du domaine d'interaction du récepteur de l'élastine. Approches biochimiques, biophysiques et bioinformatiques. Thèse de doctorat d'université : Biomolécules et Dynamique Cellulaire. Reims Champagne-Ardenne : Université de Reims Champagne-Ardenne. France. 2005. 240 p.
- [112] Welch, W.; Ruppert, J.; Jain, A.N. Hammerhead: fast, fully automated docking of flexible ligands to protein binding sites. *Chem Biol*, 1996. **3**(6): p. 449-62.
- [113] Jain, A.N. Morphological similarity: a 3D molecular similarity method correlated with protein-ligand recognition. *J Comput Aided Mol Des*, 2000. **14**(2): p. 199-213.
- [114] Rognan, D. Le criblage virtuel par docking moléculaire, in Des petites molécules pour explorer le vivant, E.R. Maréchal, S.; Lafanechère, L., Editor. 2007. p. 258.
- [115] Pubchem, NCBI « centre américain pour les informations biologiques » [en ligne] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> consulté : le [09/04/2019].
- [116] Molinspiration. Calculation of Molecular Properties and Prediction of Bioactivity. [En ligne] <<https://www.molinspiration.com/>>. Consulté:le:[15/04/2019].
- [117] CHIKHI A. Calculs et modélisations des interactions peptide deformylase – substances antibactériennes à l'aide de techniques de "Docking" (Arrimage) moléculaires. FACULTE

DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE. UNIVERSITE MENTOURI
CONSTANTINE, 2007, pages 5-95.

[118] DruLiTo 1. Chemistry Development Kit (CDK), Department of
Pharmacoinformatics NIPER, Mohali.
[logiciel]. http://www.niper.gov.in/pi_dev_tools/DruLiToWeb/DruLiTo_index.html.

[119] Karim Mezhoud. Docking Principes et méthodes. National Center of Nuclear sciences
and Technologies (CNSTN) ; 11-03-2011) ; [En ligne]
« <https://wiki.ubuntu.com/kmezhoud/Bioinformatics?action=AttachFile&do=get&target=docking.pdf> » consulté le : [08/05/2019].

[120] [En ligne] « <http://spss.espaceweb.usherbrooke.ca/pages/stat-inferentielles/correlation.php> » consulté le : [08/05/2019].

[121] Ulrike Held. 2010. Pièges des corrélations: les coefficients de corrélation de Pearson et
de Spearman. BIOSTATISTIQUE. *Forum Med Suisse* ; 10(38):652–653.

[122] Aurélie Bornot. Analyse et prédiction de la relation séquence - structure locale et
flexibilité au sein des protéines globulaires. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris-Diderot -
Paris VII, 2009. Français.tel-00583885.

[123] Gabb J., Jackson R.M., Sternberg M.J.E. 1997. Modelling protein docking using shape
complementarity, electrostatics and biochemical information. *J. Mol. Biol.* 272 : 106–120.

[124] Sperandio O et al. Structure-Based Virtual Screening. In : Maria A. Miteva. In Silico
Lead Discovery. Bentham Science Publishers. Maria A. Miteva, University Paris Diderot,
France, 2011, 20-46.

[125] 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. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001, 46, 3-26.

[126] Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov.
Today* 2004, 1, 337-341.

[127] MONGE Aurélien. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche
« in silico » de nouveaux composés bioactifs. Chimie Informatique et Théorique.
L'UNIVERSITE D'ORLEANS, 2006, 185, pages 25-35)

[128] Lipinski et al, 1997, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25.

[129] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., and Kopple K.D.,
2002, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med.
Chem.* 45, 2615–2623.

[130] Françoise Rocher, Gabriel Roblin, Jean-François Chollet; "Détermination de
l'importance de descripteurs moléculaires sur la mobilité dans la plante de molécules naturelles
ou xénobiotiques", PDF, [En ligne]
« http://www.gfpesticides.org/bdd_fichiers/480ef9da696d3d48a19036679cbb17e7eb96f91036.pdf » consulté le : [10/08/2019].

[131] Claire Laulhé. L3 Physique et Applications - Structure de la matière. – Chapitre II – Les différents types de liaisons et leur influence sur les structures. [En ligne] <http://hebergement.u-psud.fr/13papp/wp-content/uploads/2017/01/Chapitre-II.pdf> . Consulté le [26/05/2019].

[132] SuperToxic. Charité Berlin :: Structural Bioinformatics Group.[En ligne] « http://bioinformatics.charite.de/supertoxic/index.php?site=browse_toxins&char=a » consulté le : [05/06/2019].

[133] Valerio, L.G., Jr. In silico toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **241**(3): p. 356-70.

Annexes

Annexes 1

Tableau 18 Les résultats des calculs des 300 complexes utilisés pour comparer les RMSD des deux programmes Surflex et Autodock

	Le complexe	Rmsd(Å) Autodock	Rmsd(Å) surflex	Rmsd(Å) optimisé
01	1ai8	5.34	1.690	/
02	1aim	3.47	3.475	1.242
03	1bdr	3.81	2.673	1.267
04	1bp4	4.14	2.079	0.448
05	1btu	1.00	0.882	/
06	1bgo	4.62	1.366	/
07	1c1s	2.17	2.032	1.673
08	1cq1	0.85	1.050	/
09	1cgh	1.24	0.839	/
10	1eed	3.60	1.090	/
11	1eve	4.33	1.496	/
12	1fxy	2.27	0.729	/
13	1gcz	0.74	2.295	1.028
14	1gfw	4.76	3.902	2.307
15	1gs4	0.25	0.253	/
16	1h5t	1.50	0.800	/
17	1hfs	2.63	1.520	/
18	1i3s	2.73	2.636	0.603
19	1ia2	2.89	2.155	0.148
20	1ia3	0.81	0.668	/
21	1ig1	2.27	1.707	/
22	1iin	1.36	1.406	/
23	1il3	1.83	1.767	/
24	1il4	1.78	1.791	/
25	1il9	0.16	0.702	/
26	1jkk	2.27	1.235	/
27	1jkl	2.08	2.278	0.751
28	1k1i	1.16	2.388	1.749
29	1k1j	2.58	0.829	/
30	1k1l	2.54	2.021	1.462
31	1k1m	2.85	0.825	/
32	1k1o	0.93	0.977	/
33	1k1p	1.08	0.728	/
34	1kyn	5.85	3.155	0.097
35	1m6i	2.79	0.553	/
36	1mfi	0.38	1.111	/
37	1nhu	3.97	3.889	1.574
38	1os5	3.41	3.038	1.425
39	1oit	1.28	0.726	/
40	1p4f	2.69	0.557	/

41	1pxx	1.03	3.039	1.416
42	1qa7	5.21	1.262	/
43	1qdq	1.39	1.615	/
44	1q6k	1.49	0.638	/
45	1s1w	0.73	3.364	1.163
46	1scw	4.08	3.318	1.490
47	1sln	2.94	1.387	/
48	1snk	1.82	1.575	/
49	1so2	3.09	2.581	1.573
50	1tng	1.18	0.257	/
51	1tnl	1.35	1.240	/
52	1u9v	3.62	2.450	1.104
53	1u9w	3.26	1.648	/
54	1u9x	2.52	2.090	0.873
55	1usn	0.89	2.849	0.347
56	1w22	2.59	2.087	0.101
57	1ypl	3.01	0.937	/
58	1yvx	4.64	3.119	1.937
59	1yvz	2.45	0.384	/
60	1yw2	1.35	2.355	1.707
61	1yyy	2.45	2.565	0.387
62	1z4u	0.67	3.986	1.961
63	2aig	3.68	3.559	1.308
64	2aim	3.22	2.244	1.244
65	2aux	3.56	1.566	/
66	2bdl	2.83	3.348	2.033
67	2bnh	2.44	3.214	0.436
68	2brk	1.32	0.462	/
69	2bsz	3.56	3.552	0.063
70	2d3z	0.66	3.546	0.244
71	2dca	1.15	1.952	/
72	2fdv	1.17	1.044	/
73	2fdu	1.43	4.495	0.673
74	2ghl	1.36	0.751	/
75	2i3i	0.76	0.726	/
76	2jc1	1.34	2.320	1.531
77	2o7v	1.76	2.652	0.629
78	2ohl	5.79	1.358	/
79	2oiq	0.74	0.885	/
80	2rkb	3.87	1.767	/
81	2tnf	1.86	3.760	0.110
82	2vwh	4.38	1.056	/
83	2w12	2.88	2.287	1.014
84	2who	1.63	3.506	2.440
85	2xwy	1.08	0.726	/
86	2yig	2.30	1.313	/
87	2yj9	0.81	0.798	/
88	3acx	1.68	2.713	1.122

89	3aig	0.79	0.565	/
90	3b9s	1.38	1.444	/
91	3bl7	4.23	1.118	/
92	3bl9	3.51	0.826	/
93	3bla	2.95	1.000	/
94	3c6u	1.94	1.796	/
95	3e62	1.06	0.391	/
96	3e63	1.47	0.380	/
97	3e8r	2.21	1.666	/
98	3edz	1.44	0.888	/
99	3ela	4.87	2.421	0.270
100	3fh5	1.98	0.509	/
101	3fh7	2.88	2.128	0.634
102	3fh8	2.09	0.656	/
103	3fhe	2.10	1.158	/
104	3fqk	0.64	1.214	/
105	3ftz	2.95	1.590	/
106	3ful	4.35	0.949	/
107	3fvp	2.71	1.029	/
108	3gd4	3.13	0.535	/
109	3h1x	3.42	3.823	2.151
110	3hha	1.88	0.902	/
111	3hrb	0.77	2.327	1.886
112	3jsf	2.28	3.165	1.238
113	3jtu	1.50	2.527	0.639
114	3kec	1.10	1.536	/
115	3kf7	0.89	0.964	/
116	3kwz	4.53	3.559	1.253
117	3lnk	1.65	0.706	/
118	3l5u	0.87	0.696	/
119	3mf5	0.62	3.279	1.602
120	3mpt	1.07	0.867	/
121	3mw1	1.24	2.950	2.320
122	3nt1	0.80	0.584	/
123	3ntb	0.78	1.474	/
124	3o0u	4.32	1.492	/
125	3o1g	3.09	3.842	0.844
126	3of8	3.51	2.133	0.634
127	3of9	2.55	3.362	1.241
128	3ovx	4.14	2.140	0.277
129	3ow3	1.66	2.819	2.453
130	3owx	5.99	3.820	1.330
131	3pgh	1.33	0.765	/
132	3q0z	0.67	1.821	/
133	3qpn	0.62	2.634	1.034
134	3qpp	0.61	2.523	1.490
135	3s41	0.45	1.434	/
136	3s7l	1.98	3.358	0.689

137	3s7m	0.82	0.732	/
138	3tge	1.18	2.090	0.548
139	3tgg	3.65	1.177	/
140	3tso	1.40	0.540	/
141	3ttj	0.92	2.994	1.295
142	3tyq	3.08	3.741	1.691
143	3tyv	1.44	3.855	2.005
144	3udj	0.63	3.011	1.645
145	3udr	0.45	0.417	/
146	3ued	5.57	1.856	/
147	3ugc	0.76	0.273	/
148	3un2	0.62	1.099	/
149	3uo4	0.54	0.929	/
150	3uo5	1.36	0.316	/
151	3uoh	0.58	0.513	/
152	3uoj	1.36	2.765	1.722
153	3uok	0.64	0.566	/
154	3usn	1.78	2.628	0.169
155	3vf3	5.04	0.804	/
156	3vn9	1.27	1.165	/
157	3vv7	3.40	3.298	1.878
158	3vv8	3.10	2.191	0.458
159	3vw7	1.00	1.174	/
160	3wb4	2.34	3.753	0.780
161	3wi2	1.23	2.748	1.731
162	3wie	3.19	1.731	/
163	3ws8	0.59	1.601	/
164	3zbx	0.57	2.088	0.067
165	3zc5	0.39	0.562	/
166	3zcl	0.52	0.689	/
167	4a0n	2.44	2.921	0.660
168	4acu	0.54	0.774	/
169	4b00	0.70	0.550	/
170	4b05	3.35	1.647	/
171	4b72	4.30	2.681	1.854
172	4b77	0.66	3.857	2.592
173	4b78	3.89	0.416	/
174	4bsq	1.08	3.097	2.067
175	4bur	4.86	2.907	0.940
176	4bv6	2.90	0.453	/
177	4bbx	2.30	4.033	1.184
178	4c8b	0.87	0.693	/
179	4cbt	1.46	1.560	/
180	4cby	1.72	2.719	1.769
181	4cox	0.88	1.696	/
182	4ddl	3.57	2.931	1.610
183	4djw	0.93	3.525	2.242
184	4f0f	4.03	1.589	/

185	4f1m	3.59	1.621	/
186	4f1o	3.42	1.262	/
187	4fdc	4.07	0.663	/
188	4fm5	1.18	0.721	/
189	4fm8	0.69	0.585	/
190	4fs4	0.80	1.594	/
191	4frj	0.64	2.932	1.695
192	4gs6	1.07	2.319	1.755
193	4ha5	1.98	3.008	2.074
194	4heu	1.10	2.317	1.093
195	4hev	3.15	1.002	/
196	4hf4	3.10	3.410	0.712
197	4ih5	1.25	0.563	/
198	4ih6	0.83	0.450	/
199	4ith	0.38	0.611	/
200	4iti	1.66	0.734	/
201	4itj	0.43	0.999	/
202	4iva	0.61	0.486	/
203	4j0y	0.93	2.120	0.045
204	4j0z	2.41	1.808	/
205	4j1c	0.62	1.187	/
206	4j1e	3.48	0.506	/
207	4j1i	1.21	0.483	/
208	4j1f	3.64	1.058	/
209	4j1h	2.33	0.904	/
210	4jia	1.36	0.792	/
211	4jp9	0.51	0.355	/
212	4jpc	3.13	1.808	/
213	4jpe	0.99	2.377	0.046
214	4ke1	0.65	1.177	/
215	4l7g	4.58	0.826	/
216	4m69	3.25	1.024	/
217	4mib	0.62	0.490	/
218	4mk8	0.85	2.241	1.704
219	4mk9	0.60	0.537	/
220	4mka	0.42	0.973	/
221	4mkb	0.56	0.346	/
222	4mvh	0.84	0.907	/
223	4neu	0.43	0.477	/
224	4nkl	2.53	1.853	/
225	4odf	1.23	3.769	1.750
226	4ogn	1.06	0.786	/
227	4ogv	1.71	3.223	0.603
228	4ooy	5.91	2.803	0.066
229	4oty	0.74	1.041	/
230	4p6e	1.68	2.183	0.118
231	4tw9	1.84	2.368	0.623
232	4v05	3.91	1.647	/

233	4z1f	2.07	3.503	0.688
234	4z1g	3.99	1.711	/
235	4z1h	3.40	3.635	0.910
236	5axq	1.61	1.545	/
237	5c28	3.03	3.018	0.393
238	5cfw	2.27	1.799	/
239	5cj6	0.66	0.885	/
240	5cqh	4.47	0.528	/
241	5dtj	5.04	1.561	/
242	5fmh	4.32	0.660	/
243	5fs8	1.37	0.562	/
244	5fs9	2.38	1.966	/
245	5git	3.25	2.237	1.541
246	5hg1	2.82	2.182	0.554
247	5hka	1.26	1.452	/
248	5hkb	0.56	1.815	/
249	5hvs	3.03	1.477	/
250	5hvt	0.27	0.407	/
251	5i4n	3.81	2.200	1.044
252	5ko1	0.82	0.491	/
253	5kvh	1.35	0.828	/
254	5miv	4.05	1.841	/
255	5myk	6.38	2.859	0.766
256	5n1r	0.85	3.390	0.412
257	5n1s	1.10	0.648	/
258	5n38	6.60	1.753	/
259	5n9k	0.93	3.696	2.980
260	5nkh	1.28	1.503	/
261	5nqr	3.87	3.305	1.900
262	5nwh	3.51	1.542	/
263	5o1a	0.54	2.502	1.805
264	5o1b	3.41	3.810	2.293
265	5o1d	0.81	3.190	1.850
266	5o1e	0.71	3.220	1.856
267	5o1f	0.80	1.317	/
268	5o1g	1.20	1.324	/
269	5o1h	0.69	0.993	/
270	5tx5	2.76	0.658	/
271	5uab	0.65	0.866	/
272	5uad	0.69	0.688	/
273	5ut1	0.78	0.415	/
274	5ut2	2.50	1.137	/
275	5uuy	2.56	2.307	0.262
276	5v5y	0.89	0.547	/
277	5vc4	1.00	1.238	/
278	5vc5	0.93	1.163	/
279	5vc6	0.60	0.361	/
280	5vcw	0.90	1.345	/

281	5vcx	1.31	1.319	/
282	5vcy	1.14	1.861	/
283	5vcz	4.32	1.282	/
284	5vd0	0.91	1.072	/
285	5vd1	0.90	0.612	/
286	5vd3	1.26	2.376	1.329
287	5vdk	1.22	0.887	/
288	5w58	0.41	0.927	/
289	5wev	0.64	0.978	/
290	5y3n	2.14	3.978	1.161
291	6b1e	2.61	1.180	/
292	6b1k	0.71	0.373	/
293	6b1o	3.38	1.786	/
294	6b2p	1.01	3.707	1.590
295	6bbv	0.71	1.144	/
296	6bjj	3.46	0.885	/
297	6cb5	3.22	0.499	/
298	6cox	0.93	1.135	/
299	7tln	1.56	2.313	1.231
300	9est	6.12	1.981	/

Annexes 2

Tableau 19 Les résultats du criblage par Surflex des similaires du ligand 1HX

	molécules	Affinités (M ⁻¹)
01	Conformer3D_CID_2766732	4.02
02	Conformer3D_CID_3469136	6.81
03	Conformer3D_CID_5707429	4.30
04	Conformer3D_CID_8078462	5.38
05	Conformer3D_CID_8079887	5.60
06	Conformer3D_CID_8079888	6.40
07	Conformer3D_CID_8080217	4.07
08	Conformer3D_CID_8086235	5.26
09	Conformer3D_CID_8091676	5.46
10	Conformer3D_CID_10042339	2.73
11	Conformer3D_CID_13770063	1.93
12	Conformer3D_CID_14231911	4.04
13	Conformer3D_CID_18111437	4.83
14	Conformer3D_CID_18112196	3.16
15	Conformer3D_CID_18112638	4.96
16	Conformer3D_CID_18113927	3.56
17	Conformer3D_CID_18169320	4.07
18	Conformer3D_CID_22338250	3.61
19	Conformer3D_CID_24820012	4.40
20	Conformer3D_CID_24857830	5.06

21	Conformer3D_CID_25189626	2.44
22	Conformer3D_CID_25189627	4.25
23	Conformer3D_CID_25189628	5.18
24	Conformer3D_CID_25189629	5.26
25	Conformer3D_CID_25189630	3.80
26	Conformer3D_CID_25189693	4.19
27	Conformer3D_CID_25189694	4.30
28	Conformer3D_CID_25189695	4.60
29	Conformer3D_CID_25189696	4.20
30	Conformer3D_CID_25189697	4.42
31	Conformer3D_CID_25189698	5.01
32	Conformer3D_CID_25189699	5.01
33	Conformer3D_CID_25189700	2.48
34	Conformer3D_CID_25189761	3.90
35	Conformer3D_CID_25189762	3.30
36	Conformer3D_CID_25189763	4.34
37	Conformer3D_CID_25189764	0.94
38	Conformer3D_CID_25189765	4.88
39	Conformer3D_CID_25189766	3.65
40	Conformer3D_CID_25189767	3.08
41	Conformer3D_CID_25224050	1.63
42	Conformer3D_CID_25640025	3.91
43	Conformer3D_CID_29590362	5.18
44	Conformer3D_CID_29590365	3.40
45	Conformer3D_CID_30898169	7.71
46	Conformer3D_CID_30898175	3.37
47	Conformer3D_CID_31138733	3.65
48	Conformer3D_CID_31161726	3.71
49	Conformer3D_CID_31161729	3.73
50	Conformer3D_CID_31212437	3.75
51	Conformer3D_CID_31216662	3.54
52	Conformer3D_CID_31217296	3.66
53	Conformer3D_CID_120738061	6.25
54	Conformer3D_CID_120739422	6.47
55	Conformer3D_CID_120768854	4.09
56	Conformer3D_CID_120801938	6.16
57	Conformer3D_CID_121021643	6.33
58	Conformer3D_CID_121409802	1.73
59	Conformer3D_CID_121409818	4.47
60	Conformer3D_CID_121409834	1.77
61	Conformer3D_CID_121419923	5.74
62	Conformer3D_CID_121582402	5.00

63	Conformer3D_CID_123411913	-0.38
64	Conformer3D_CID_123541086	-0.08
65	Conformer3D_CID_123605895	-5.72
66	Conformer3D_CID_123889614	7.18
67	Conformer3D_CID_125172361	3.90
68	Conformer3D_CID_125172364	5.00
69	Conformer3D_CID_125179765	1.96
70	Conformer3D_CID_129002248	-0.47
71	Conformer3D_CID_129188681	1.25
72	Conformer3D_CID_129335224	1.91
73	Conformer3D_CID_130314915	7.18
74	Conformer3D_CID_130315013	2.79
75	Conformer3D_CID_130315014	3.06
76	Conformer3D_CID_31217379	3.44
77	Conformer3D_CID_31217514	5.45
87	Conformer3D_CID_31217792	5.44
79	Conformer3D_CID_31218427	1.24
80	Conformer3D_CID_31218840	4.59
81	Conformer3D_CID_31303026	4.62
82	Conformer3D_CID_31307649	4.61
83	Conformer3D_CID_31593458	5.38
84	Conformer3D_CID_37391133	5.31
85	Conformer3D_CID_37703085	4.27
86	Conformer3D_CID_37703316	4.25
87	Conformer3D_CID_37810841	3.69
88	Conformer3D_CID_37812667	3.61
89	Conformer3D_CID_37812731	5.41
90	Conformer3D_CID_39967847	4.30
91	Conformer3D_CID_42748841	-1.11
92	Conformer3D_CID_42748953	4.36
93	Conformer3D_CID_42789555	7.08
94	Conformer3D_CID_42789556	5.71
95	Conformer3D_CID_42792389	6.15
96	Conformer3D_CID_42896540	4.26
97	Conformer3D_CID_42932536	3.40
98	Conformer3D_CID_44055506	4.10
99	Conformer3D_CID_44242040	2.97
100	Conformer3D_CID_45844020	6.29
101	Conformer3D_CID_45859169	4.83
102	Conformer3D_CID_45866919	0.90
103	Conformer3D_CID_45948627	6.84
104	Conformer3D_CID_46127367	6.28

105	Conformer3D_CID_46127844	5.74
106	Conformer3D_CID_47011369	4.18
107	Conformer3D_CID_47353439	4.94
108	Conformer3D_CID_51368419	1.25
109	Conformer3D_CID_51931080	0.49
110	Conformer3D_CID_51931082	0.78
111	Conformer3D_CID_52014147	5.19
112	Conformer3D_CID_52014245	5.48
113	Conformer3D_CID_52014513	4.48
114	Conformer3D_CID_52014519	3.13
115	Conformer3D_CID_52014522	4.30
116	Conformer3D_CID_52014523	4.59
117	Conformer3D_CID_52014926	5.36
118	Conformer3D_CID_52015024	4.72
119	Conformer3D_CID_52262003	4.29
120	Conformer3D_CID_53544635	3.23
121	Conformer3D_CID_53567679	3.67
122	Conformer3D_CID_53610986	3.76
123	Conformer3D_CID_53619776	3.84
124	Conformer3D_CID_53625840	4.15
125	Conformer3D_CID_53671608	2.07
126	Conformer3D_CID_55052868	4.64
127	Conformer3D_CID_55177350	3.68
128	Conformer3D_CID_55331362	4.81
129	Conformer3D_CID_55527484	-0.64
130	Conformer3D_CID_55582704	5.53
131	Conformer3D_CID_55584328	0.91
132	Conformer3D_CID_55636233	4.25
133	Conformer3D_CID_55658966	0.02
134	Conformer3D_CID_55659021	2.59
135	Conformer3D_CID_55666263	1.81
136	Conformer3D_CID_55668485	1.45
137	Conformer3D_CID_55714691	0.30
138	Conformer3D_CID_55794811	2.38
139	Conformer3D_CID_55903038	5.10
140	Conformer3D_CID_55993583	-3.47
141	Conformer3D_CID_56000256	4.53
142	Conformer3D_CID_56002118	4.54
143	Conformer3D_CID_56063817	4.35
144	Conformer3D_CID_56152746	2.65
145	Conformer3D_CID_56191151	4.54
146	Conformer3D_CID_56235687	-5.91

147	Conformer3D_CID_ 56269171	4.92
148	Conformer3D_CID_ 56300482	3.75
149	Conformer3D_CID_ 56313529	1.77
150	Conformer3D_CID_ 56314191	5.57
151	Conformer3D_CID_ 56808401	4.19
152	Conformer3D_CID_ 57659797	2.83
153	Conformer3D_CID_ 57659798	5.08
154	Conformer3D_CID_ 57659802	3.12
155	Conformer3D_CID_ 57659803	2.26
156	Conformer3D_CID_ 57659805	5.70
157	Conformer3D_CID_ 57659807	5.50
158	Conformer3D_CID_ 57659809	1.04
159	Conformer3D_CID_ 60211031	5.54
160	Conformer3D_CID_ 60365331	5.01
161	Conformer3D_CID_ 60384531	5.85
162	Conformer3D_CID_ 60384771	5.38
163	Conformer3D_CID_ 60388679	4.53
164	Conformer3D_CID_ 60410963	4.59
165	Conformer3D_CID_ 60442478	-0.31
166	Conformer3D_CID_ 62232717	4.52
167	Conformer3D_CID_ 62232736	4.43
168	Conformer3D_CID_ 62232737	4.75
169	Conformer3D_CID_ 62233266	6.52
170	Conformer3D_CID_ 62233862	4.70
171	Conformer3D_CID_ 62233998	4.72
172	Conformer3D_CID_ 62234196	4.28
173	Conformer3D_CID_ 62234544	4.68
174	Conformer3D_CID_ 62234694	4.79
175	Conformer3D_CID_ 62234918	2.88
176	Conformer3D_CID_ 62235071	4.86
177	Conformer3D_CID_ 62235246	4.69
178	Conformer3D_CID_ 62235253	3.93
179	Conformer3D_CID_ 62235309	4.44
180	Conformer3D_CID_ 62304029	3.58
181	Conformer3D_CID_ 62415265	5.06
182	Conformer3D_CID_ 62416014	3.85
183	Conformer3D_CID_ 63011443	4.24
184	Conformer3D_CID_ 63120297	4.30
185	Conformer3D_CID_ 63120462	3.48
186	Conformer3D_CID_ 63120474	5.98
187	Conformer3D_CID_ 63120484	4.31
188	Conformer3D_CID_ 63716898	5.36

189	Conformer3D_CID_68686411	5.04
190	Conformer3D_CID_69415538	3.61
191	Conformer3D_CID_90448547	-1.65
192	Conformer3D_CID_90448550	0.74
193	Conformer3D_CID_90448559	-0.39
194	Conformer3D_CID_91927516	3.77
195	Conformer3D_CID_93115959	6.84
196	Conformer3D_CID_93115960	6.52
197	Conformer3D_CID_94142387	4.19
198	Conformer3D_CID_94142388	4.42
199	Conformer3D_CID_95049519	1.48
200	Conformer3D_CID_95150253	3.23
201	Conformer3D_CID_95268164	5.11
202	Conformer3D_CID_95268165	3.10
203	Conformer3D_CID_95334317	3.51
204	Conformer3D_CID_95334318	3.76
205	Conformer3D_CID_95344820	3.85
206	Conformer3D_CID_95344821	3.84
207	Conformer3D_CID_95352832	4.15
208	Conformer3D_CID_95352833	3.78
209	Conformer3D_CID_95974512	4.23
210	Conformer3D_CID_95974513	4.46
211	Conformer3D_CID_97242179	1.03
212	Conformer3D_CID_97242180	4.12
213	Conformer3D_CID_97835493	5.56
214	Conformer3D_CID_97835494	5.84
215	Conformer3D_CID_98852899	-1.32
216	Conformer3D_CID_98852900	0.07
217	Conformer3D_CID_108478539	3.75
218	Conformer3D_CID_110185963	3.73
219	Conformer3D_CID_110415578	4.17
220	Conformer3D_CID_110415954	4.53
221	Conformer3D_CID_110641408	5.50
222	Conformer3D_CID_110642047	6.33
223	Conformer3D_CID_110716431	3.66
224	Conformer3D_CID_110716432	2.81
225	Conformer3D_CID_110716435	3.92
226	Conformer3D_CID_110833502	4.79
227	Conformer3D_CID_110833503	4.20
228	Conformer3D_CID_110833504	4.64
229	Conformer3D_CID_112790679	4.20
230	Conformer3D_CID_112802195	5.15

231	Conformer3D_CID_112802210	3.54
232	Conformer3D_CID_112802216	5.32
233	Conformer3D_CID_112819235	5.75
234	Conformer3D_CID_113233054	4.79
235	Conformer3D_CID_113323346	5.59
236	Conformer3D_CID_113323412	5.07
237	Conformer3D_CID_113323414	5.87
238	Conformer3D_CID_115497028	5.29
239	Conformer3D_CID_115497168	5.15
240	Conformer3D_CID_115497205	2.85
241	Conformer3D_CID_125179764	2.35
242	Conformer3D_CID_129335225	-0.47
243	Conformer3D_CID_130314947	4.72
244	Conformer3D_CID_130314951	4.57
245	Conformer3D_CID_130314952	2.50
246	Conformer3D_CID_130314967	5.39
247	Conformer3D_CID_130315011	3.26
248	Conformer3D_CID_69975526	1.17
249	Conformer3D_CID_69995812	2.16
250	Conformer3D_CID_70472231	0.86
251	Conformer3D_CID_70790356	4.51
252	Conformer3D_CID_70790372	2.14
253	Conformer3D_CID_70790373	3.67
254	Conformer3D_CID_70790374	2.48
255	Conformer3D_CID_71016389	-2.21
256	Conformer3D_CID_71029642	4.77
257	Conformer3D_CID_72102750	4.23
258	Conformer3D_CID_72102797	5.28
259	Conformer3D_CID_74335094	5.91
260	Conformer3D_CID_75388834	4.12
261	Conformer3D_CID_75438412	5.15
262	Conformer3D_CID_75508918	5.56
263	Conformer3D_CID_75518704	1.39
264	Conformer3D_CID_75768878	4.94
265	Conformer3D_CID_78792123	3.84
266	Conformer3D_CID_78836578	1.67
267	Conformer3D_CID_78852743	3.55
268	Conformer3D_CID_78852900	4.66
269	Conformer3D_CID_78852980	3.53
270	Conformer3D_CID_78853083	3.11
271	Conformer3D_CID_78853198	3.46
272	Conformer3D_CID_80084915	4.21

273	Conformer3D_CID_80204651	5.76
274	Conformer3D_CID_80505685	4.09
275	Conformer3D_CID_80506573	6.29
276	Conformer3D_CID_85529209	5.76
277	Conformer3D_CID_85580113	3.69
278	Conformer3D_CID_86864886	2.22
279	Conformer3D_CID_86891509	-5.88
280	Conformer3D_CID_86894179	5.05
281	Conformer3D_CID_86915277	4.14
282	Conformer3D_CID_89988094	-3.10
283	Conformer3D_CID_90448449	5.41
284	Conformer3D_CID_90448450	2.96
285	Conformer3D_CID_90448451	5.41
286	Conformer3D_CID_90448452	4.82
287	Conformer3D_CID_90448453	3.74
288	Conformer3D_CID_90448455	2.99
289	Conformer3D_CID_115496711	5.49
290	Conformer3D_CID_115497155	5.33
291	Conformer3D_CID_115497169	4.27
292	Conformer3D_CID_115497224	4.56
293	Conformer3D_CID_115497443	4.23
294	Conformer3D_CID_115497523	5.78
295	Conformer3D_CID_116158725	3.64
296	Conformer3D_CID_117673333	4.73
297	Conformer3D_CID_117834779	4.62
298	Conformer3D_CID_117834928	2.28
299	Conformer3D_CID_117838484	1.35
300	Conformer3D_CID_118169742	-11.53
301	Conformer3D_CID_118184018	-13.57
302	Conformer3D_CID_118777944	5.00
303	Conformer3D_CID_118786973	2.35
304	Conformer3D_CID_118970234	4.94
305	Conformer3D_CID_119070073	1.70
306	Conformer3D_CID_120735687	4.28
307	Conformer3D_CID_120739138	5.08
308	Conformer3D_CID_120739876	6.67
309	Conformer3D_CID_130315013	2.79
310	Conformer3D_CID_130315014	3.06
311	Conformer3D_CID_440317	1.89

**Thème : CARACTERISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA RIPK1,
ENZYME DE LA NECROPTOSE**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en **Biochimie Appliquée****Résumé :**

Le but de ce travail était de trouver un composé à meilleur effet inhibiteur que le composé « 1HX » qui agit sur la cible RIP1 Kinase, enzyme impliquée dans la nécroptose.

En premier lieu, on a réalisé une comparaison de deux logiciels « Autodock » et « Surflex » en utilisant 300 complexes. Nous avons obtenu les pourcentages de valeurs positives de RMSD suivants : **56.67%** pour Autodock et **62.67%** pour Surflex. Et pour confirmation, ce test a été suivi d'une analyse visuelle de la superposition des ligands de référence et ceux obtenus par docking moléculaire pour les deux logiciels.

Ensuite, nous avons déterminé le coefficient de corrélation linéaire « **r** » en utilisant 30 complexes. Les valeurs obtenues sont de 0.6585 pour Autodock et de -0.7358 pour Surflex. Ainsi, nous avons poursuivi notre étude par Surflex en raison de sa performance prouvée par le bon pourcentage de valeurs positives du RMSD (**62.67%**) et un bon coefficient de corrélation (**r = - 0.7358**)

Un criblage virtuel a été effectué sur **311** similaires téléchargés de la Pubchem de notre ligand de référence **1HX** dont l'affinité est : **5.06 M⁻¹**. Les résultats de cette opération ont permis de sélectionner les **4** meilleurs composés suivants : **A, B, C et D**. avec des affinités supérieures à **7 M⁻¹**.

Des substitutions ont été apportées à la structure de **1HX**, notre ligand de référence, dans le but d'améliorer son action inhibitrice. Nous avons effectué 2 types de substitution :

La mono substitution a concerné **10** composés et a permis une amélioration de l'affinité de sept d'entre eux : **1, 2, 3, 6, 7, 8 et 9**. Alors que la bi substitution, concernant **11** composés, a amélioré neuf d'entre eux qui sont : **11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20 et 21**.

L'analyse visuelle des interactions n'a concerné que les composés **A, B, C et D et 1, 11 et 14** ayant une affinité supérieure à **7 M⁻¹**.

Une évaluation positive des propriétés pharmacologiques par le logiciel « **DruLiTo** » a déduit que nos composés peuvent agir comme médicament administré par voie orale.

Il est cependant nécessaire de vérifier et confirmer ces résultats théoriques par des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo*.

Mots clés : docking moléculaire, surflex, autodock, nécroptose, RIPK1, Lipinski**Laboratoire de recherche : Biochimie Appliquée****Jury d'évaluation :****Président du jury :** BENSEGUENI A

Pr. Université des Frères Mentouri Constantine 1

Rapporteur : CHIKHI A

Pr. Université des Frères Mentouri Constantine 1

Examinatrice: TENIOU S

M.A.A Université des Frères Mentouri Constantine 1

Date de soutenance : 08/07/2019

