

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



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée
Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Filière : Sciences Biologiques
Option : Bioinformatique

Thème

Modélisation moléculaire et docking moléculaire de l'inhibiteur
double COX/LOX

Présenté et soutenu par : SAYEH MEDDOUR Iméne.
BENMAGHSOULA Yacine.

Soutenu le 28/09/2020 devant le jury :

Président : Dr. M. TAMAGHOULT.

Maitre assistant en SNV Université Constantine 1.

Promoteur : Dr. A. KRID.

Maitre assistant en chimie Université Constantine 1.

Examineur : Dr. K. KELLOU.

Maitre assistant en SNV Université Constantine 1.

Année Universitaire : 2019/2020

Remerciement

Avant toute chose je remercie dieu le tout puissant pour m'avoir donné le courage et la patience d'achever ce travail.

Nous tenons à remercier vivement nos très chers parents pour leur soutien et encouragement dans notre parcours scolaire.

Remercions également notre encadrant monsieur **KRID Adel** pour avoir dirigé ce travail et sans oublier monsieur **BELKHIRI Lotfi** qui nous a ouvert son laboratoire.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mr **TAMAGHOULT Mahmoud** et Mr **KELLOU Kamel** pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail.

Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Table de matière

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

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

Partie 01 : Bibliographie

Chapitre 01 : Le docking moléculaire

1. Introduction.....	3
2. Les outils du docking moléculaire.....	5
2.1. Le récepteur.....	5
2.2. Le(s) ligand(s).....	5
2.3. Un programme de docking moléculaire.....	5
3. Autodock.....	6
3.1 Autodock vina.....	6
3.2 Autodock tools.....	6
4. Le docking : du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité.....	7
5. Fonction de score.....	7
6. Le ReDocking.....	7

Chapitre 02 : Aspect biologique de l'inflammation

1. L'inflammation.....	9
1.1. Etiologie.....	9
1.2. Acteurs et déroulement de la réaction inflammatoire.....	10
1.3. Notions d'inflammation aiguë et d'inflammation chronique.....	10
1.3.1. Inflammation aiguë.....	10
1.3.2. Inflammation chronique.....	10
2. Les réactions immunitaires du corps.....	11
2.1. La fièvre.....	11
2.2. Le Rhumatisme.....	11

2.3. L'Alzheimer.....	11
2.4. Le Cancer.....	11
3. Traitement pharmacologique.....	11
3.1. Anti-inflammatoire stéroïde.....	12
3.2. Anti-inflammatoire non stéroïde.....	12
4. Les structures mises en jeu.....	12
4.1. Cyclooxygénase (COX).....	12
4.2. COX-1.....	12
4.3. COX-2.....	12
4.4. Lypo-oxygénase (LOX).....	13
4.5. 5-LOX.....	13
5. Inhibiteur double COX / LOX.....	14

Partie 02 : Résultat et discussion

1. Matériel et Méthode.....	17
1.1. Microordinateur.....	17
1.2. Outils informatique.....	17
1.3. Matériel Biologique.....	17
1.3.1. Préparation des protéines.....	17
1.3.1.1. COX-2.....	17
1.3.1.2. 5-LOX.....	17
1.3.2. Préparation des ligands.....	18
2. Grid Box du COX-2 / 5-LOX.....	19
2.1.COX-2.....	19
2.2. 5-LOX.....	20
3. Présentation des résultats	21
3.1. Validation du logiciel Autodock vina (Re-dock).....	21
3.2. Simulation de docking moléculaire.....	22
4. Analyses de docking moléculaire.....	22
4.1. 1CX2-Ligand 3.....	23
4.1.1. Contact rapproché (Close contacts).....	24
1- Liaisons Hydrogènes	24
2- Interactions Hydrophobiques	25
3- Interactions électrostatiques : Halogen (flurine).....	28

4.2. 3O8Y-Ligand 3.....	28
1- Liaisons hydrogène	29
2- interactions hydrophobiques	30
3- Interaction électrostatiques.....	31
Conclusion.....	32

Références bibliographies

Annexes

Résumé

Abstract

الملخص

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques de COX-2/5-LOX.....	18
Tableau 2. Les énergies de docking.....	22
Tableau 3. Les acides aminés du site actif de la COX-2.....	24
Tableau 4. H-Bond interaction entre le ligand 3 et la COX-2.....	25
Tableau 5. Carbone H-Bond interaction entre le ligand 3 et la COX-2.....	25
Tableau 6. Pi-Sigma interaction entre le ligand 3 et la COX-2.....	26
Tableau 7: Pi-Sulfur interaction entre le ligand 3 et la COX-2.....	26
Tableau 8: Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 3 et la COX-2.....	26
Tableau 9: Alkyl interaction entre le ligand 3 et la COX-2.....	27
Tableau 10: Pi-Alkyl interaction entre le ligand 3 et la COX-2.....	27
Tableau 11. Les acides aminés du site actif de la 5-LOX.....	28
Tableau 12. Hydrogen-Bond intermoléculaire entre les molécules et la 5-lipoxygenase.....	29
Tableau 13. Alkyl intermoléculaire entre les molécules et la 5-lipoxygenase.....	30
Tableau 14. Pi-Alkyl intermoléculaire entre les molécules et la 5-lipoxygenase.....	30

Liste des figures

Figure 1. Étapes typiques d'un docking.....	4
Figure 2. Schéma représente que l'Autodock est la plus utilisé.....	6
Figure 3. Les signes de l'inflammation.....	9
Figure 4. Modèle tridimensionnel de la structure de COX-2.....	13
Figure 5. Modèle tridimensionnel de la structure de 5-LOX.....	14
Figure 6. Un schéma simplifié de la voie inflammatoire et de ses médiateurs.....	14
Figure 7. Structures chimiques de certains inhibiteurs représentatifs du double COX/LOX.....	15
Figure 8. Chaîne D du la COX-2.....	18
Figure 9. Chaîne B du la 5-LOX.....	18
Figure 10. Structure de ligand 1.....	19
Figure 11. Structure de ligand 2.....	19
Figure 12. Structure de ligand 3.....	19
Figure 13. Structure de ligand 4.....	19
Figure 14. Position de GRID BOX dans le site actif de la 1CX2.....	20
Figure 15. Sélection des acides amines et GRID BOX du 5-LOX.....	20
Figure 16. Validation de re-dock la couleur violet X-ray SC-58, la couleur bleu résultat de docking.....	21
Figure 17. 2D validation de Re-Dock (A) X-ray SC558 dans le site actif, (B) le même résultat de Re-Dock des résidus en interaction.....	22
Figure 18. Site actif de la protéine COX-2.....	23
Figure 19. Les interactions entre le site actif de la COX-2 et le ligand 3.....	24
Figure 20. le site actif de la protéine 5-LOX.....	28
Figure 21. Les interactions entre le site actif de la 5-LOX et le ligand3.....	29

Liste des abréviations

Å : Angström.

AA : Acide Amine.

AA : Acide Arachidonique.

ADT: AutoDock Tools.

AINS : Anti-inflammatoire non Stéroïdes.

AIS : Anti-inflammatoires Stéroïdes.

COX : Cyclooxygénase.

COX-1 : Cyclooxygénase-1.

COX-2 : Cyclooxygénase-2.

DOCK : Docking.

H-Bond : Hydrogène-Bond.

LOX : Lypooxygénase.

MGL: Molecular Graphics Laboratory.

PDB: Protein Data Bank.

Ref : Référence.

RE-DOCK : Re-Docking.

RMN: Résonance Magnétique Nucleaire.

RMSD: Root Mean Square Dérivation.

µM : micro Mètre.

3D: Trois Dimensions.

5-LOX : 5-Lypooxygénase.

8-LOX : 8-Lypooxygénase.

12-LOX : 12-Lypooxygénase.

15-LOX : 15-Lypooxygénase.

Introduction

Précédemment, un projet de développement d'un nouveau médicament était basé sur une méthode expérimentale, coûteuse et lente. Le criblage *in vitro* à haut débit consiste à tester *in vivo* l'activité d'un très grand nombre de ligand avec une certaine cible thérapeutique afin d'identifier des composés promoteurs. Cependant, cette approche s'est rapidement trouvée confrontée à de nombreux problèmes scientifiques, techniques, méthodologiques et financiers en particulier. Cependant les méthodes Analytique basées sur de l'informatique d'où le nom "BIO-INFORMATIQUE" sont devenue une alternative qui permet à la recherche de nouvelles molécules biologiques thérapeutiques de gagner assez de temps, moins coûteuses et permet de prédire les propriétés souhaitées [1].

Le criblage virtuel par docking moléculaire est une nouvelle approche visant à simuler l'affinité d'un très grand nombre de ligands pour une cible thérapeutique donnée, plus simple à mettre en place, plus rapide à un coût bien moindre que les criblages expérimentaux. Aujourd'hui, ces approches sont devenues des étapes indispensables et cruciales dans de nombreux programmes de découverte de médicaments. Les industries pharmaceutiques consacrent près de 10% de leur budget à la recherche sur les médicaments assistée par ordinateur [2].

Actuellement, il existe un méritoire nombre de logiciel de docking moléculaire comme le programme AutoDock qui a déjà appui à la composition de nouveaux médicaments. Effectivement, AutoDock a été utilisé de manière intensive et pertinente dans le développement préclinique de la molécule « Raltegravir » (inhibiteur de l'intégrase du VIH), dont la distribution sur le marché américain a été autorisée fin 2007 par la FDA [3].

C'est au docking moléculaire par AutoDock v1.5.6 que nous s'adresserons dans ce travail. Nous avons choisi comme cible thérapeutique deux enzymes impliquées dans le phénomène et le processus de l'inflammation « COX/LOX ». La cyclo-oxygénase 2 (COX-2), enzyme clé induite par des stimuli pro-inflammatoires. Le choix de cette enzyme est déterminé par sa certitude de la pathologie humaine, aboutissant à la libération des prostaglandines. Nous avons choisi aussi la 5-lipoxygénase (5-LOX), qui est aussi une enzyme clé appartient à une famille d'enzymes peroxydantes lipidiques [4,5]. Son inhibition grâce à des molécules comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens(AINS), soulage donc des symptômes de l'inflammation et de la douleur.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude théorique par modélisation et simulation moléculaire des interactions protéine-ligand entre quatre molécules et les deux enzymes cibles déjà mentionnées. Le choix des ligands sont tirés d'une revue scientifique publiée en 2010 par le journal *Pharmaceutical review*, faite par Praveen et al.

Ce manuscrit est présenté sous forme de deux parties. La première consiste à donner un aperçu bibliographique sur la méthode du docking moléculaire utilisée dans la recherche des molécules biologiquement actives ainsi que l'aspect de l'inflammation du point de vu biologique. La deuxième partie est consacrée entièrement à la méthode de simulation, résultats obtenus et discussions. Cette partie sera suivit par une conclusion générale.

Partie 1

Bibliographie

Chapitre 1 : Le docking moléculaire

1. Introduction

L'interaction entre les molécules est à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Par conséquent, les détails de ces interactions au niveau moléculaire sont très intéressants et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou par résonance magnétique nucléaire (RMN). Malheureusement, compte tenu de l'existence d'innombrables molécules différentes dans une seule cellule, ces techniques ne permettent pas une description détaillée de toutes ces interactions.

Le but de l'ancrage moléculaire est de prédire la structure des complexes moléculaires à partir de molécules isolées, comparé à une méthode expérimentale, la structure est facile à mettre en œuvre, marché et rapide. Par conséquent, le logiciel d'amarrage est un outil très utile en biologie, en pharmacie et en médecine, car la plupart des ingrédients actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec des cibles biologiques thérapeutiquement significatives (gécepté thérapeutique), affectant ainsi le mécanisme de participation de cette protéine. Ce travail de mémoire a finalement appliqué l'ancrage dans la conception de nouvelles molécules actives. Après avoir expliqué les problèmes d'ancrage, cette introduction présente certaines des solutions les plus courantes et leurs performances actuelles. Ensuite, deux applications d'accostage dans le développement de nouveaux médicaments sont introduites. Les étapes typiques pour prédire l'interaction entre un ligand et son récepteur sont illustrées à la figure 1. La première étape consiste à obtenir la structure du récepteur par cristallographie aux rayons X, RMN ou modélisation. Comme la description de la structure est plus précise, l'interaction prévue sera plus utile, plus précise et plus utile. Par conséquent, il doit être vérifié et vérifié. Premièrement, il doit correspondre à une conformation biologiquement pertinente. Par conséquent, entre autres, il est nécessaire de vérifier la présence de contact cristallin ou la présence d'autres molécules avec le cristal et les interactions possibles. Ensuite, la qualité de la structure doit être vérifiée au niveau de l'atome lui-même. Par exemple, si l'atome est manquant dans la région du site d'interaction et que l'identité de séquence avec la structure utilisée comme modèle est trop faible (si la structure cible a un acide aminé flexible (par structure aux rayons X facteur B élevé ou par RMN) Les multiples conformations différentes identifiées peuvent être déterminées).

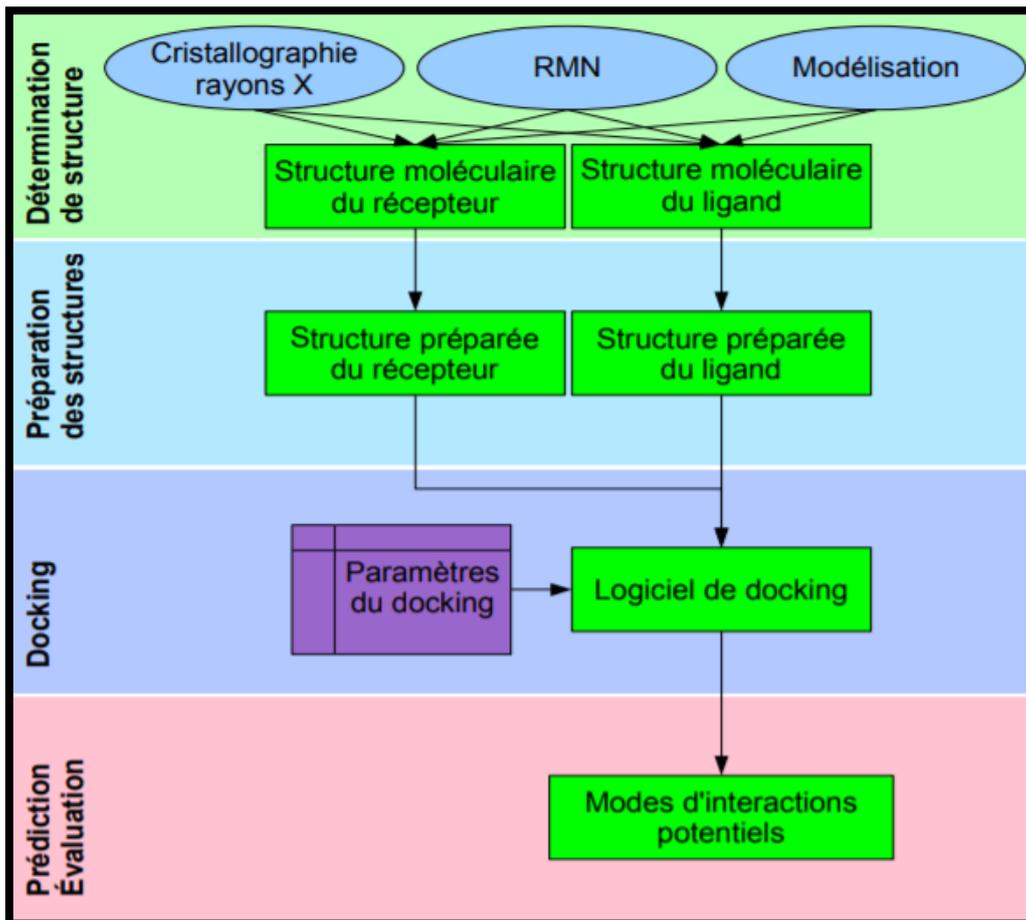


Figure 1. Étapes typiques d'un docking [6].

Une fois identifiés, de tels problèmes doivent être pris en compte lors de la préparation de la structure en vue du docking. Il faut veiller à résoudre les problèmes de clashes stériques, ainsi qu'aux états de protonation. La conformation initiale du ligand est généralement modifiée et optimisée durant le docking, et n'est donc en principe pas très importante. Une fois les deux structures préparées, les paramètres ad hoc sont donnés au logiciel de docking, et ce dernier propose un ou plusieurs modes d'interactions potentiels qui peuvent être ensuite utilisés d'une multitude de façons différentes [6].

2. Les outils du docking moléculaires

2.1. Le récepteur

La première grande voie d'étude et de conception de molécules bioactives par modélisation moléculaire est celle qui se fonde sur la structure des récepteurs. Cette approche est basée sur l'exploitation de la structure moléculaire tridimensionnelle de la protéine cible. Trois méthodes expérimentales permettent aujourd'hui de déterminer la structure des protéines : la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique et la cristallographie par rayons X. Cette dernière technique est responsable de la majorité des structures issues d'une base de données de structures appelée la Protéine Data Bank (PDB).

La PDB est un répertoire mondial de dépôt d'informations sur la structure tridimensionnelle des protéines et des acides nucléiques. Ces molécules proviennent de l'ensemble des règnes biologiques. La PDB est gratuitement accessible par Internet (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Elle contient plusieurs de milliers de structures protéiques obtenues soit par cristallographie aux rayons X, soit par RMN [7]. Si la cible n'est pas encore déposée au niveau de la banque, et cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, la modélisation par homologie intervient afin de construire la structure 3D de la cible souhaitée [8].

2.2 Le ligand

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules.

Pour un docking moléculaire, le ligand doit être également sous forme 3D. A présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné : La première souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de données de structures chimiques appelés chimiothèques ou espaces chimique .Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que chemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl...etc.

2.3. Un programme de docking moléculaire

Le docking moléculaire s'accomplit en deux étapes complémentaires. La première consiste à rechercher les conformations du ligand aptes à établir des interactions idéales avec le récepteur. La deuxième est une fonction de score qui permet d'évaluer ces conformations par un calcul rapide de leur énergie d'interaction avec ce récepteur [9].

3. Autodock

L'étape de docking moléculaire est réalisée grâce au sous-programme AutoDock. Est une suite d'outils de docking automatisés. Il est conçu pour prédire comment de petites molécules, telles que des substrats ou des médicaments candidats, se lient à un récepteur de structure 3D connue. On a utilisé deux logiciels d'autodock :

3.1. Autodock vina

AutoDock Vina est une nouvelle génération de logiciel d'accueil du MGL (Molecular Graphics Laboratory). Il réalise des améliorations significatives de la précision moyenne des prédictions de mode de liaison, AutoDock Vina ne nécessite pas de choisir les types d'atomes et de pré-calculer les cartes de grille pour eux. Au lieu de cela, il calcule les grilles en interne, pour les types d'atomes nécessaires, et il le fait pratiquement instantanément.

3.2 Autodock tools

AutoDockTools, (ADT), permet entre autres de définir quelles liaisons seront traitées comme rotatives dans le ligand et d'analyser les ancrages [10].

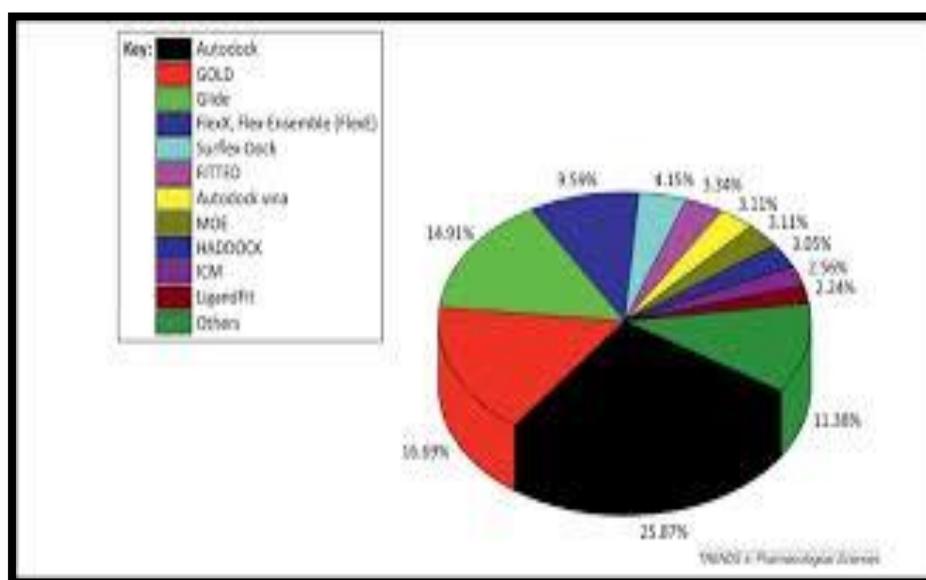


Figure 2. Schéma représente que l'AutoDock est la plus utilisé [11].

4. Le docking : du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité

L'étude du docking est une étape capitale dans la compréhension des réactions biologiques et dans la conception de médicaments. Les tentatives de docking ont longtemps été basées sur le concept « clé-serrure », considérant le récepteur et le ligand rigides. C'est sans aucun doute la catégorie la plus simple et rapide du docking moléculaire.

L'approche la plus utilisée dans le traitement de la flexibilité, considère la cible protéique comme corps rigide tandis que le ligand est flexible. Ce type de docking (semi-flexible) permet d'obtenir des résultats plus précis. Aujourd'hui, la puissance de calculs des ordinateurs permet, pour certains logiciels de docking, de traiter la flexibilité du ligand et de façon partielle le récepteur [12].

5. Fonction de score

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe [13].

6. Le Redocking

Le processus par lequel un ligand est pris de la structure d'un complexe de celui-ci avec un récepteur, et ancré à la forme "induite-fit" du récepteur. Ceci est souvent effectué pour vérifier que les paramètres du docking spécifiés dans le fichier d'entrée pour la méthode du docking sont raisonnables et capables de récupérer la structure et les interactions d'un complexe connu [14].

La technique de simulation du docking moléculaire est validée en utilisant les paramètres suivants :

- **Énergie de liaison:** La méthode de simulation du docking moléculaire est initialement validée sur la base de l'énergie de liaison obtenue. La plage prédéfinie d'énergie de liaison doit être comprise entre -5 et -15 kcal / mol.

- **Méthodes de superposition ou similarité des acides aminés:** Une validation supplémentaire de la méthode du docking moléculaire est effectuée par la méthode de superposition. La conformation ancrée du ligand lié doit être impeccablement superposée en référence à la conformation bioactive du ligand présent dans la structure cristalline de la protéine téléchargée.

- **RMSD** La déviation quadratique moyenne si le ligand ancré affiche $<2.0\text{\AA}$ ° Valeur RMSD (root-mean-square derivation) avec le ligand cristallographique, il est considéré comme un amarrage réussi [15].

Chapitre 2 : Aspect biologique de l'inflammation

1. L'inflammation

L'inflammation peut se définir comme un processus biologique de défense de l'organisme contre un agent agresseur. Aussi, supprimer la réaction inflammatoire ne constitue pas forcément un acte thérapeutique bénéfique. Cependant, cette réaction se manifeste par des symptômes plus ou moins pénibles décrits par **Celsius** puis par **Galien** : rougeur, chaleur, douleur, tuméfaction et gêne ou impotence fonctionnelles. Ces manifestations peuvent inciter le praticien à prescrire un anti-inflammatoire [4].

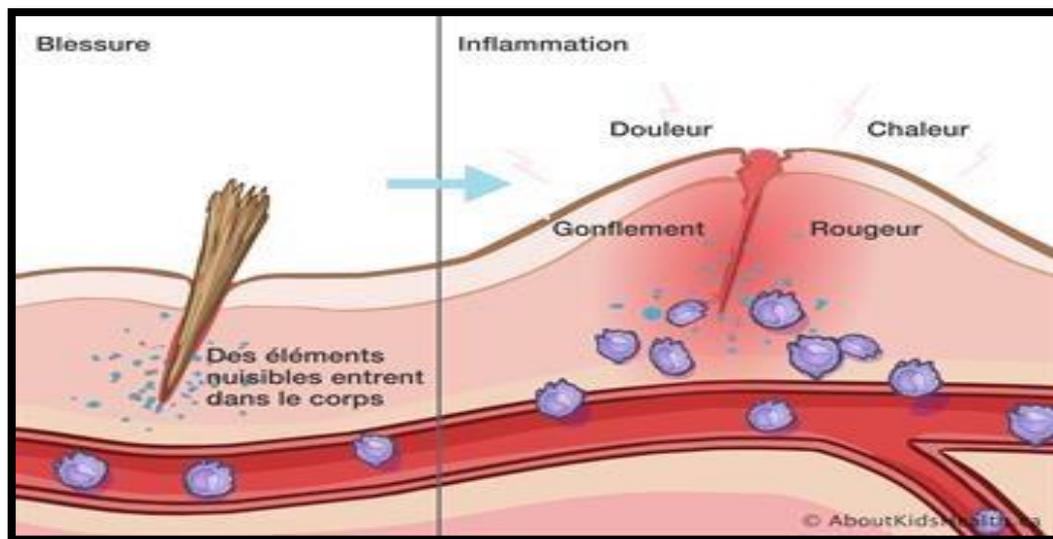


Figure 3. Les signes de l'inflammation [16].

Le processus de l'inflammation comprend :

- **Des phénomènes généraux:** exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent de la fièvre et éventuellement une aléatoire de l'état général.
- **Des phénomènes locaux:** l'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapable de développer une réaction inflammatoire complète.

1.1. Etiologie

Les causes de la réaction inflammatoire sont multiples et représentent les agents pathogènes. Ces causes déterminent des lésions cellulaires et tissulaires qui vont déclencher l'inflammation :

- **Infection** : contamination par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons).
- **Agents physiques** : traumatisme, chaleur, froid, radiations.
- **Agents chimiques** : caustiques, toxines, venins.

- **Corps étrangers** : exogènes ou endogènes.
- **Défaut de vascularisation** : réaction inflammatoire secondaire à une nécrose par ischémie.
- **Agression dysimmunitaire** (anomalie de la réponse immunitaire, allergies, auto-immunité).

On doit souligner que :

- l'agent pathogène peut être endogène ou exogène.
- les micro-organismes infectieux ne constituent qu'une partie des causes de l'inflammation. Une réaction inflammatoire n'est donc pas synonyme d'infection.
- un même agent pathogène peut entraîner des réactions inflammatoires différentes selon l'hôte, en particulier selon l'état des défenses immunitaires.
- plusieurs causes peuvent être associées dans le déclenchement d'une réaction inflammatoire.

1.2. Acteurs et déroulement de la réaction inflammatoire

L'inflammation fait intervenir des cellules, des vaisseaux, des modifications de la matrice extracellulaire et de nombreux médiateurs chimiques qui peuvent être pro ou anti-inflammatoires et qui peuvent modifier ou entretenir la réponse inflammatoire. Quelle que soit son siège, et la nature de l'agent pathogène, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères morphologiques généraux et des mécanismes communs. Néanmoins, les différentes étapes présentent des variations liées à la nature de l'agent pathogène, à l'organe où se déroule la réaction inflammatoire, au terrain physiologique de l'hôte. Tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel.

1.3. Notions d'inflammation aiguë et d'inflammation chronique

1.3.1. Inflammation aiguë :

L'inflammation aiguë représente la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines), d'installation souvent brutale et caractérisée par des phénomènes vasculo-exsudatifs intenses. Les inflammations aiguës guérissent spontanément ou avec un traitement, mais peuvent laisser des séquelles si la destruction tissulaire est importante. En savoir plus : Les médiateurs chimiques.

1.3.2. Inflammation chronique :

L'inflammation chronique correspond à une inflammation n'ayant aucune tendance à la guérison spontanée et qui évolue en persistant ou en s'aggravant pendant plusieurs mois ou plusieurs années. On peut distinguer deux types de circonstances de survenue des inflammations chroniques :
- les inflammations aiguës évoluent en inflammations prolongées subaiguës et chroniques lorsque l'agent pathogène initial persiste dans les tissus, ou lorsqu'une inflammation aiguë récidive de façon

répétée dans le même organe en entraînant à chaque épisode des destructions tissulaires de moins en moins bien réparées.

- les inflammations peuvent parfois se manifester d'emblée sous une forme apparemment chronique. La phase aiguë vasculo-exsudative est passée inaperçue car brève ou asymptomatique. C'est souvent le cas de maladies auto-immunes et d'affections pour lesquelles les mécanismes dysimmunitaire sont prépondérants (ex : hépatite auto-immune) [5].

2. Les réactions immunitaires du corps

2.1. La fièvre

Une des premières réponses adaptées de l'organisme est la fièvre. Elle est un des signes majeurs de l'inflammation systémique. La fièvre participe à la lutte contre l'infection notamment car elle stimule la prolifération des cellules de l'immunité tout en inhibant la prolifération de nombreux organismes pathogènes [17].

2.2. Rhumatisme

Les rhumatismes inflammatoires chroniques appartiennent au groupe des maladies systémiques et auto-immunes. Elles sont caractérisées par des douleurs articulaires d'horaires inflammatoire [18].

2.3. L'Alzheimer

L'inflammation au cours de la maladie d'Alzheimer présente un caractère particulier puisqu'elle se situe au sein du système nerveux central et n'implique que très peu les lymphocytes et les monocytes. Ainsi, les études immunologiques dans la maladie d'Alzheimer se sont concentrées sur les réponses humorales [19].

2.4. Le Cancer

L'inflammation est impliquée à plusieurs niveaux dans le cancer. Elle crée un terrain favorable à certains cancers, elle prend une part active dans leur développement, mais elle peut aussi les combattre [20].

3. Traitement pharmacologique

Substance utiliser pour lutter contre l'inflammation processus de défense de l'organisme face à une agression. On distingue classiquement les anti-inflammatoire stéroïdes (AIS) et anti-inflammatoire non stéroïdes (AINS) [21].

3.1. Anti-inflammatoire stéroïdien

Les anti-inflammatoires stéroïdiens ou (gluco) corticoïdes sont des dérivés synthétiques des hormones naturelles, cortisol et cortisone dont elles se distinguent par un pouvoir anti-inflammatoire plus marqué et, à l'inverse, un moindre effet minéralocorticoïde [22].

3.2. Anti-inflammatoire non stéroïdien

Les AINS sont composés de molécules liées aux pyrazolés et divers comme l'aspirine, les oxycams, les dérivés carboxyliques, les indoliques, l'acide propionique.

Les AINS sont des médicaments qui ont un effet anti-inflammatoire, antalgique, antipyrétique et antiagrégant plaquettaire. Ils sont utilisés de façon très grande, dans un grand nombre de maladies, et plus spécifiquement en présence d'inflammation comme en rhumatologie.

Les AINS sont particulièrement efficaces au moment de la phase aiguë, du processus inflammatoire, c'est la raison pour laquelle ils sont utilisés en rhumatologie, en cas de poussées inflammatoires, survenant au cours d'une arthrose, d'une arthrite, d'une tendinite, ou en traumatologie, en gynécologie (dans les dysménorrhées), en urologie dans les coliques néphrétiques [23].

4. Les structures mises en jeu

4.1. Cyclooxygénase (COX)

Les COX permettent l'oxydation de l'acide arachidonique(AA) en prostaglandine G2 (activité cyclooxygénase proprement dite), dérivé instable, puis la peroxydation de la prostaglandine G2 en prostaglandine H2 (activité peroxydase). La prostaglandine H2 est ensuite transformée en prostaglandine E2 grâce à une PGE2 isomérase. On distingue deux enzymes : la COX-1 et la COX-2

4.2. COX-1

La COX-1 est constitutionnel, fabriquée dans différents types de cellules, y compris les plaquettes, et impliquée dans diverses fonctions de protection, en particulier celle de la muqueuse gastrique.

4.3. COX-2

La COX-2 est inductible. Sa production est strictement limitée aux cellules inflammatoires et induite par des stimuli pro-inflammatoires, aboutissant à la libération des prostaglandines, elle-même associée à l'inflammation, à la douleur et à la fièvre. Les AINS et l'AIS exercent leurs effets cliniques en inhibant les COX-1 et -2. Cette inhibition est donc essentielle pour leur efficacité en tant qu'anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques, mais est aussi, en ce qui concerne l'inhibition de la COX-1, responsable des effets secondaires gastro-intestinaux [24].

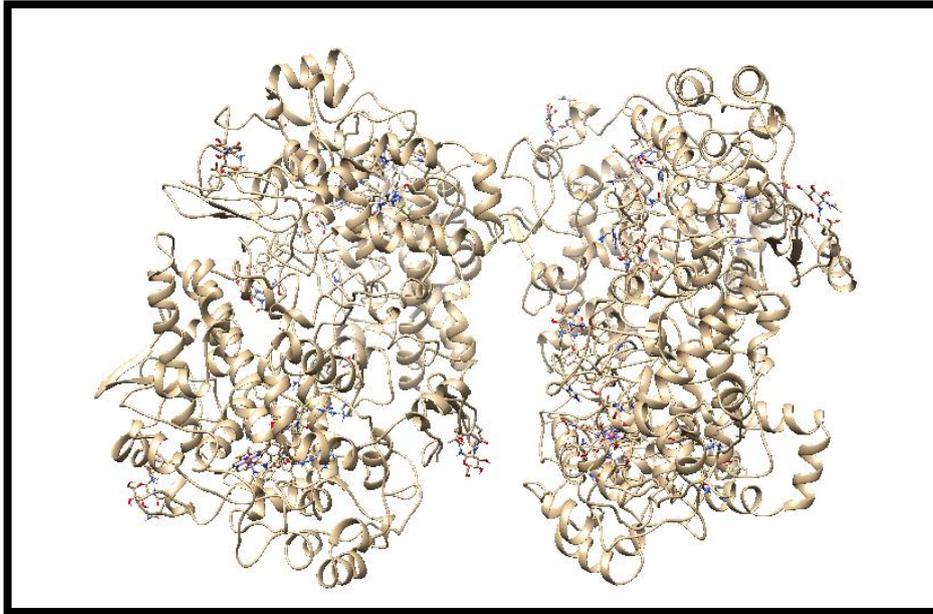


Figure 4.Modèle tridimensionnel de la structure de COX-2.

4.4. Lipo-oxygénase (LOX)

Les LOX sont une famille d'enzymes peroxydantes lipidiques qui catalysent la peroxydation de l'acide arachidonique et impliquées dans la pathogenèse de diverses maladies inflammatoires dont les cancers. Il a été rapporté que les LOX favorisaient la survie des cellules cancéreuses et amélioreraient les métastases de plusieurs cancers en modulant les cibles en aval. Les analogues les plus courants sont : 8-LOX, 12-LOX, 15-LOX et 5-LOX [25].

4.5. 5-LOX

La 5-LOX appartient à une famille d'enzymes peroxydantes lipidiques, qui sont exprimées à la fois dans les règnes végétal et animal. Ces dioxygénases catalysent l'oxygénation d'acides gras polyinsaturés contenant un fragment 1,4-cis, cis-pentadiène pour produire des dérivés hydroperoxy. Ils nécessitent un atome de fer non hémique par molécule, qui oscille entre Fe² (enzyme inactive) et Fe³ (forme active) pendant le cycle catalytique. Bien que le mécanisme détaillé de la réaction LOX reste encore controversé, sa nature radicale est communément admise [26].

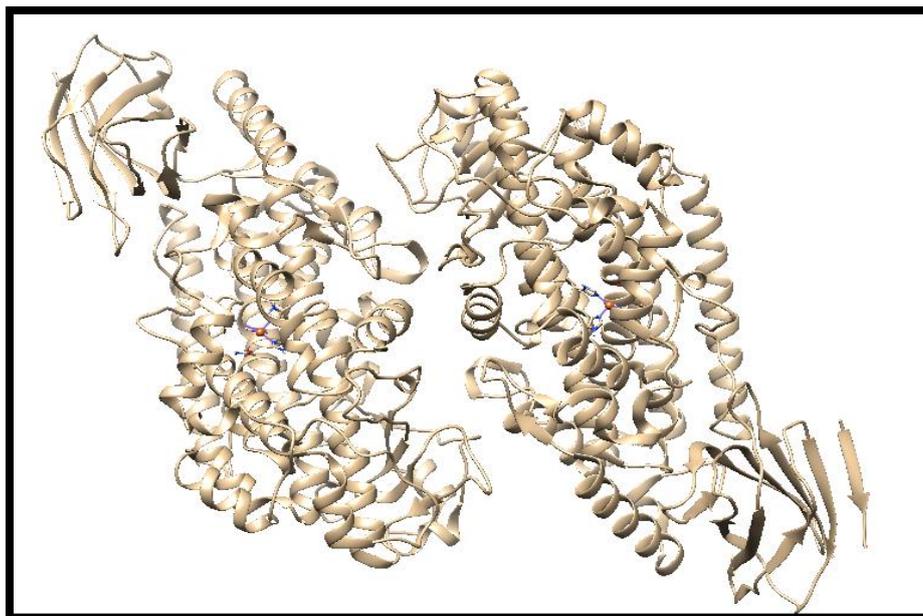


Figure 5. Modèle tridimensionnel de la structure de 5-LOX.

5. Inhibiteur double COX / LOX

Actuellement, les LOX sont des cibles potentielles dans le traitement de maladies telles que l'asthme, l'athérosclérose, le cancer et une variété de conditions inflammatoires. Il a été émis l'hypothèse que le blocage du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) via l'inhibition de la COX par des AINS traditionnels ou des inhibiteurs sélectifs de la COX-2 pourrait conduire à la génération de leucotriènes et de lipoxines pro-inflammatoires via la voie LOX **Figure 6**.

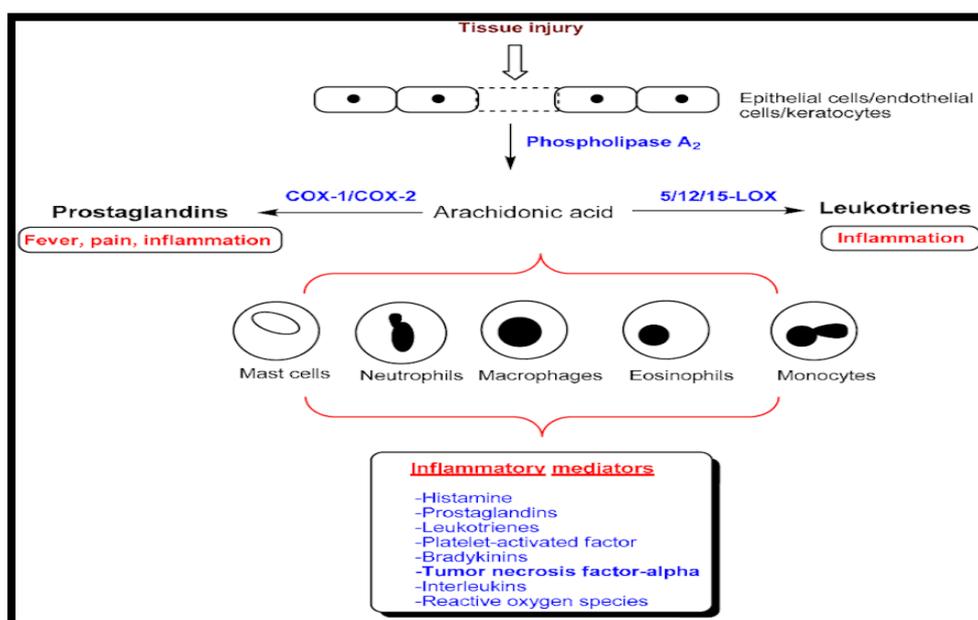


Figure 6. Un schéma simplifié de la voie inflammatoire et de ses médiateurs [27].

Ce qui explique en partie les effets secondaires observés. Avec les AINS traditionnels et les inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Pour contrer cela, plusieurs inhibiteurs de COX/LOX à deux petites molécules ont été signalés. **Reddy** et ses collègues ont signalé le développement de la classe d'agents racémiques d'indolylpyrazoline en tant qu'inhibiteurs doubles COX/LOX. Un des exemples illustrés à la **Figure 7** (20) avaient un pharmacophore para-SO₂NH₂ COX-2 et présentaient une double inhibition COX et LOX. Les isomères levo présentent une puissance et une sélectivité inhibitrices supérieures de la COX-2.

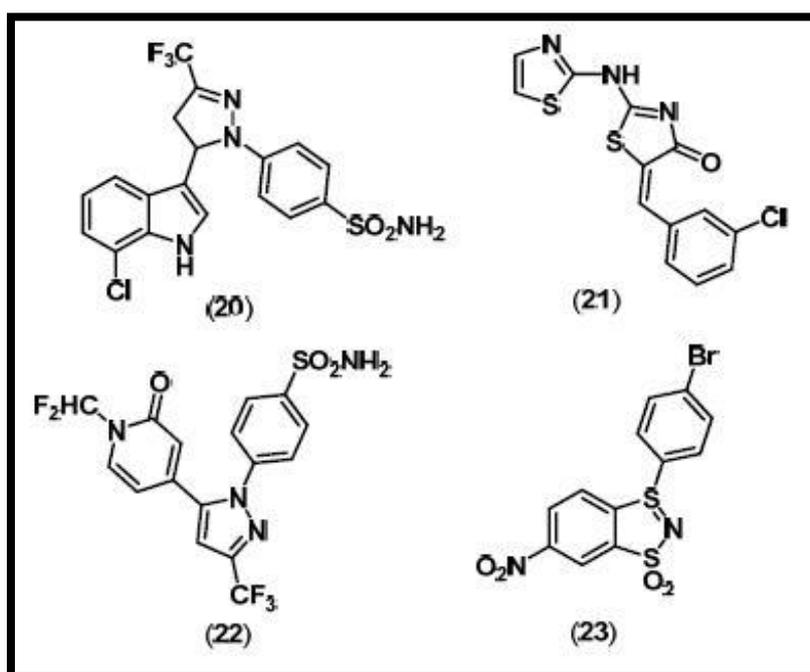


Figure 7. Structures chimiques de certains inhibiteurs représentatifs du double COX/LOX [27].

Cependant, pour cette série de composés, les activités anti-inflammatoires in vivo n'ont pas été rapportées. En outre, **Lagunin** et ses collègues ont récemment utilisé le criblage virtuel basé sur la structure pour identifier les échafaudages en anneau appropriés en tant qu'inhibiteurs doubles COX / LOX. Cette étude a révélé qu'un échafaudage en anneau de thiazolidinone pourrait être utilisé pour développer de nouveaux agents anti-inflammatoires. Le composé (21) **Figure 7** a présenté un faible pouvoir inhibiteur de COX in vitro et de LOX de soja. In vivo (21) a montré une bonne activité anti-inflammatoire lorsqu'il est administré par voie intra péritonéale dans des modèles animaux. Cependant, aucune activité orale n'a été signalée. Un dérivé de célécoxib incorporant le pharmacophore LOX N-difluorométhyl-1,2-dihydropyridine-2-one (22) a présenté une double inhibition de la COX et de la 5-LOX ainsi qu'une activité anti-inflammatoire orale.

Dans une étude élégante, **Chern** et ses collègues ont appliqué un criblage virtuel basé sur la structure et ont découvert un nouvel échafaudage en anneau à base d'ylure de benzodithiazolium en tant qu'inhibiteurs doubles COX / 5-LOX. Le composé de plomb (23) **Figure 7**, possédant un 1,1-dioxyde d'ylure de dithiazolium, a présenté une double inhibition de COX / 5-LOX [27].

Partie 2

Résultats et

Discussion

1. Matériel et Méthode

1.1. Microordinateur

Dans notre étude, nous avons utilisé deux micro-ordinateurs. Les programmes utilisés sont installés sous le système d'exploitation Windows 7.

1.2. Outils informatique

- MarvinSketch (20.1) : <https://chemaxon.com/products/marvin>
- Avogadro (1.0.1) : <https://sourceforge.net/projects/avogadro/>
- Chimera (1.14) : <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/download.html>
- AutoDock tools (1.5.6) : <http://autodock.scripps.edu/resources/adt>
- AutoDock vina (4.2.5.1) : <http://vina.scripps.edu/download.html>
- Pymol (2.3.3) : <https://pymol.informer.com/2.3/>
- Discovery studio (20.1.0.1.9295) : <https://discover.3ds.com/discovery-studio>

1.3. Matériel Biologique

1.3.1. Préparation des protéines

1.3.1.1. COX-2

Pour le docking moléculaire, l'entrée PDB de la COX-2 a été téléchargée via la banque de donnée Protéine Data Bank (PDB). Cette dernière nous a proposé plusieurs structures cristallographiques 3D, parmi lesquelles nous avons choisi le code 1CX2, c'est une structure qui est résolue à 3 Å. Contenant quatre chaînes, seule la dernière a été gardée. Le ligand de référence est séparé de la pdb. Via Autodock tools (ADT) les charges atomiques de type gasteiger et les atomes d'hydrogènes sont ajoutés. Les structures sont ainsi sauvegardées en format PDBQT.

1.3.1.2. 5-LOX

La 5-LOX est téléchargée sous format pdb via la même banque de donnée. Plusieurs structures ont été proposées où la 3O8Y a été retenue. Il s'agit d'une structure définie à une résolution de 2.39 Å. De la même manière et en utilisant le code Chimera, seule la chaîne B a été

retenue. Cette structure n'est pas complexée avec un ligand. Selon le même protocole que la première, cette structure a été sauvegardée en format PDBQT par le code Autodock tools.

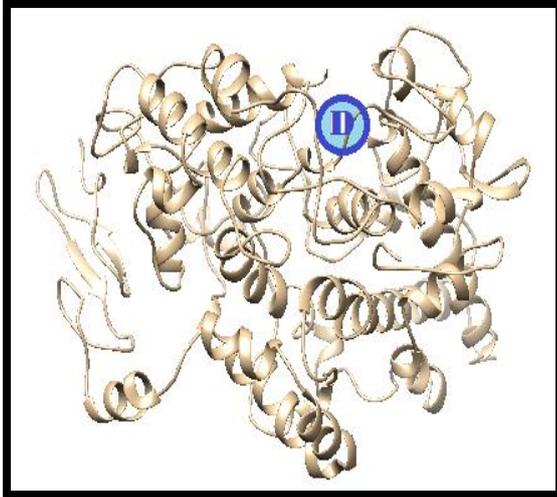


Figure 8. Chaîne D du la COX-2.

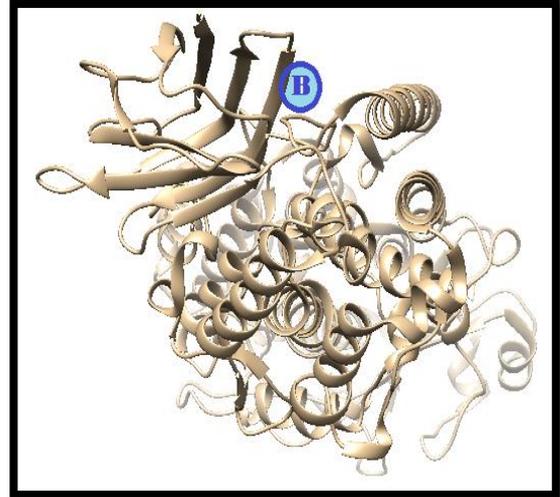


Figure 9. Chaîne B du la 5-LOX.

Tableau 1. Caractéristiques de COX-2/5-LOX.

Protéine	Code PDB	Les chaînes	Ligand réf	Résolution	Classification
COX-2	1CX2	A, B, C et D	SC-558	3 Å	Oxydoréductase
5-LOX	3O8Y	A et B	/	2.39 Å	Oxydoréductase

1.3.2. Préparation des ligands

Tous les ligands dans cette étude ont été modélisés par MarvinSketch et Avogadro. Ces structures ont été optimisées en mécanique moléculaire, et sauvegardées en format pdb. AutoDock tools est ensuite utilisé afin de les sauvegarder sous format pdbqt après avoir ajouté les atomes d'hydrogènes ainsi que les charges de gasteiger.

Les figures 8,9 ainsi que le tableau 1, résument les informations concernant nos structures protéiques. Les figures 10, 11, 12, 13, résument les informations concernant les ligands utilisés lors de cette étude.

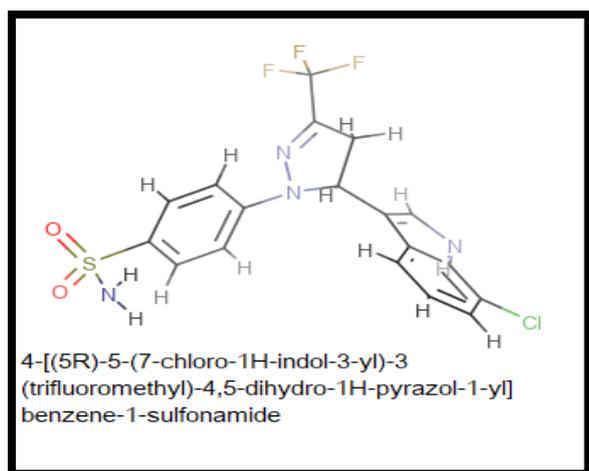


Figure 10. Structure de ligand 1.

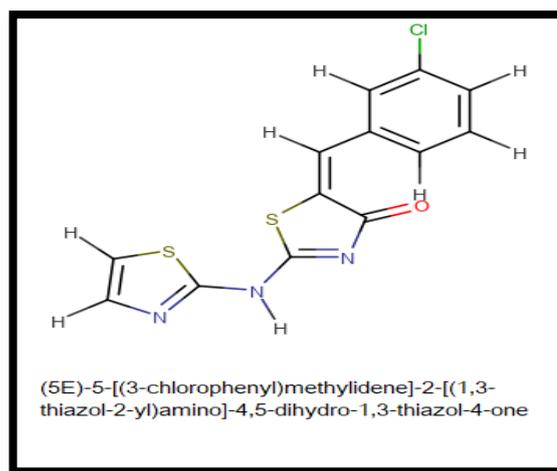


Figure 11. Structure de ligand 2.

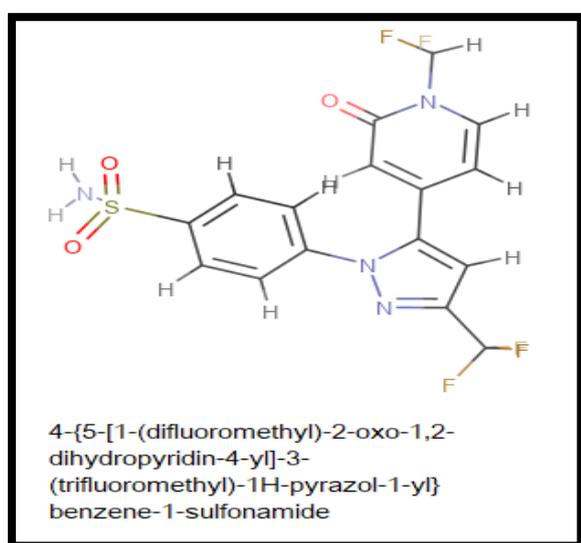


Figure 12. Structure de ligand 3.

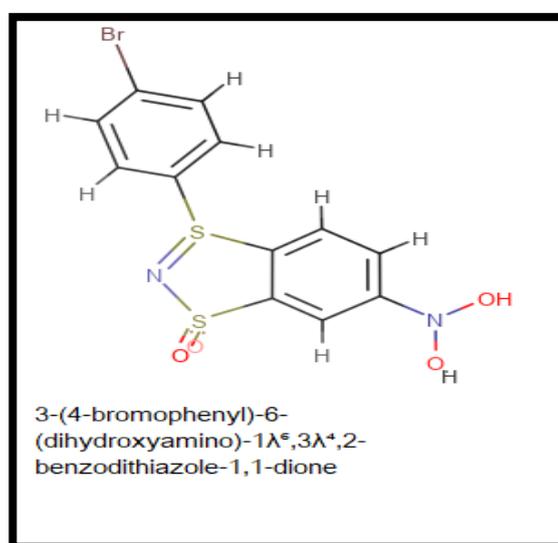


Figure 13. Structure de ligand 4.

2. Grid Box du COX-2 / 5-LOX

2.1. COX-2

Afin d'effectuer une recherche conformationnelle du ligand au sein du site actif d'une structure protéique, les codes de docking moléculaires doivent définir cet espace. C'est ce qu'on appelle le GRID BOX. A partir du ligand de référence, cette boîte est définie avec un volume de 28 Å³ où le centre est déterminé par les coordonnées X = 13.085, Y = 52.413 et Z = 70.43. La boîte est centrée sur le ligand de référence. Ces informations sont ainsi sauvegardées dans un fichier texte qui est nécessaire et obligatoire pour effectuer le calcul de docking. La figure suivante montre bien la boîte où s'effectue l'amarrage (docking) moléculaire.

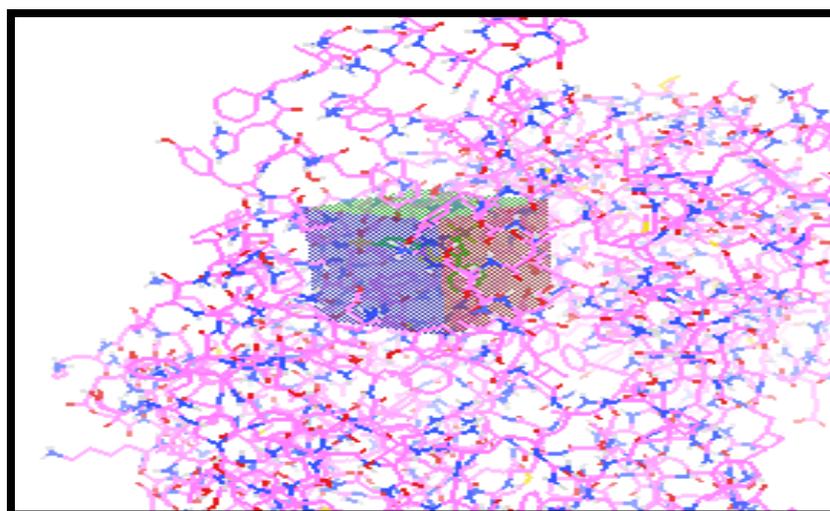


Figure 14. Position de GRID BOX dans le site actif de la 1CX2.

2.2. 5-LOX

Contrairement à la cible précédente, la protéine 5-LOX ne possède aucun ligand de référence. En se basant sur les travaux de Mr **Malose J.** et al [28]. La boîte de simulation a été retenue, voir **figure 15**. Le site actif de l'entrée 3O8Y est définie ainsi par les paramètres suivants : centre de la boîte est déterminé par les coordonnées X =-9.361, Y =75.032, Z =21.629. Les dimensions sont (48*68*74) Å³.

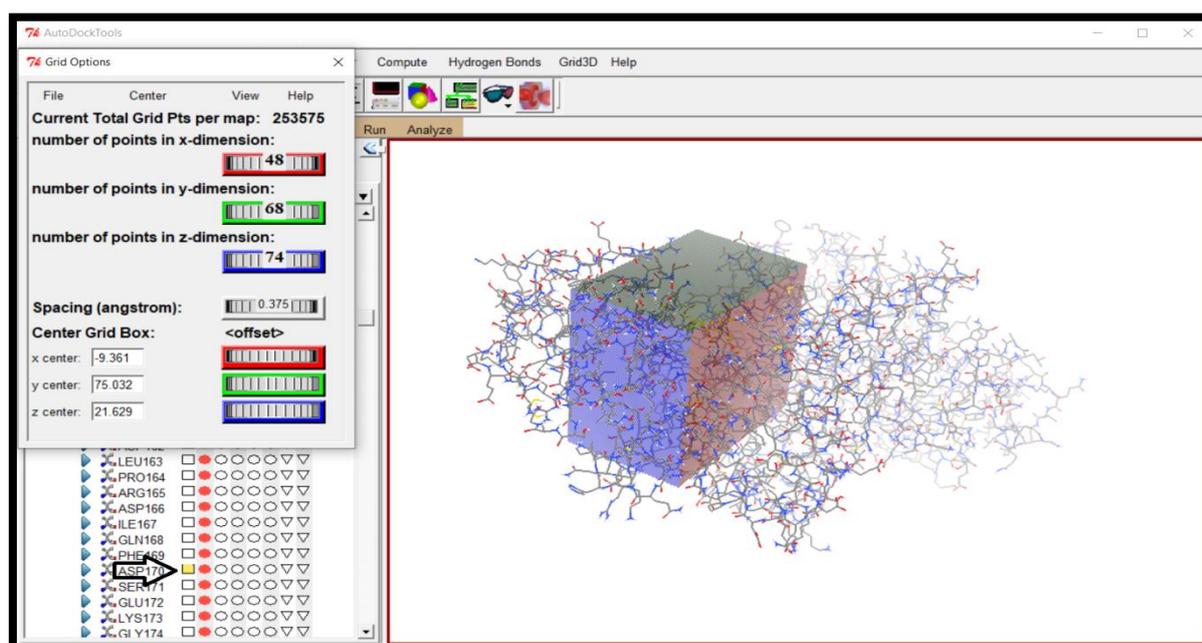


Figure 15. Sélection des acides amines et GRID BOX du 5-LOX.

3. Présentation des résultats

3.1. Validation du logiciel AutoDock vina (Re-dock)

Afin de valider nos calculs et savoir si nos calculs sont correctes d'une part, et est ce que le code utilisé est fiable d'autre part, le Re-Docking du ligand cristallisé (rayons X) SC-558 dans l'entrée 1CX2 est primordialement nécessaire. Pour cela, le redocking nous a aboutit aux résultats suivants :

1- Méthode de simulation de docking moléculaire est validée puisque l'énergie de liaison du ligand lié SC-558 avec le récepteur est de -11,1 kcal / mol. Cette valeur appartient à l'intervalle de -5 à -15 kcal / mol.

2- De même, ce calcul a été validée par le biais du 'root-mean-square déviation' (RMSD ~ 0,0). un calcul Docking est validé si la valeur du RMSD est inférieure à 2Å.

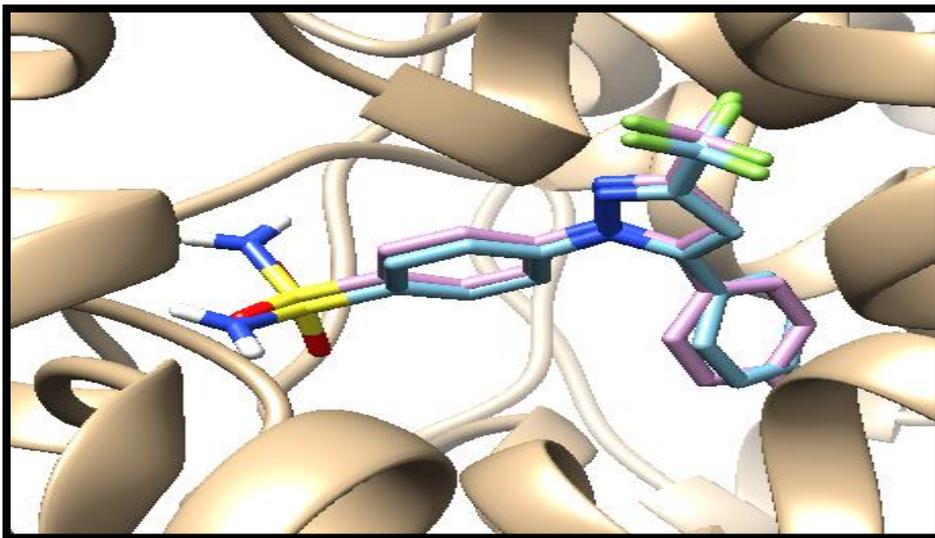


Figure 16. Validation de re-dock la couleur violet X-ray SC-558, la couleur bleu résultat de docking.

Dans cette étape de validation, nous avons également observé que les mêmes résidus du site actif macromoléculaire avaient interagi avec le ligand de référence SC558 tel que VAL523, HIS90 ... et aussi ici nous observons dans le complexe natif une interaction défavorable avec ARG513, **Figure 17.**

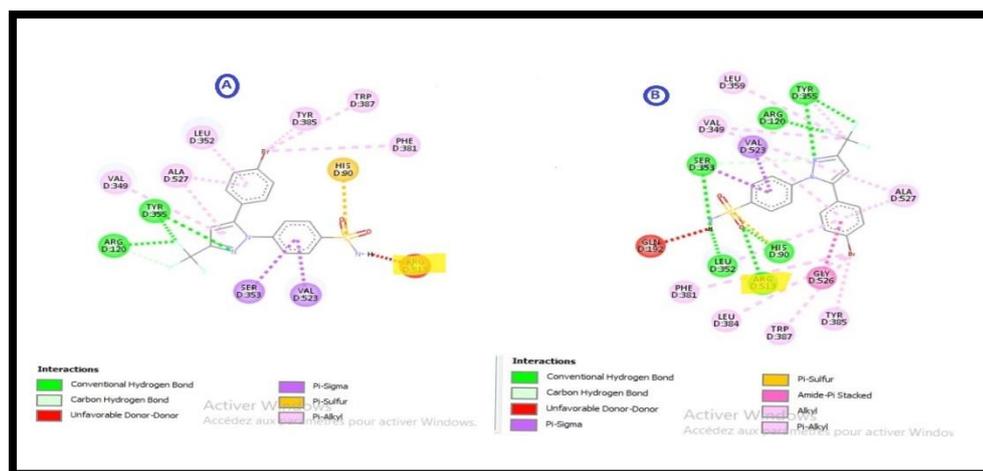


Figure 17. 2D validation de Re-Dock (A) X-ray SC558 dans le site actif, (B) le même résultat de Re-Dock des résidus en interaction.

3.2. Simulation de docking moléculaire

Les quatre ligands ont été ancrées dans les enzymes COX-2 et 5-LOX humaines où leurs énergies de liaison ont été calculées. Lorsque l'énergie de liaison de docking étant la plus faible, l'affinité du ligand pour cette cible étant la plus élevée.

4. Analyses de docking moléculaire

Le tableau ci-dessous résume les valeurs des IC₅₀ μ M ainsi que les énergies obtenues par le code AutoDock Vina.

Tableau 2. Les énergies de docking.

	Code PDB pour les enzymes			
	COX-2 (1CX2)		5-LOX (3O8Y)	
	IC 50 μ M	Energie (kcal/mol)	IC 50 μ M	Energie (kcal/mol)
Ligand 1	3.9	-10.9	94	-7.5
Ligand 2	262	-7.8	125.9	-6.8
Ligand 3	0.86	-12.0	5.0	-8.0
Ligand 4	1.7	-7	1.22	-6.5
Ligand de ref	50 nM	-11.1	/	/

D'après ces résultats, on remarque que le ligand 3 forme le complexe le plus stable avec la COX-2 avec une énergie de -12 kcal/mol. Sur le plan biochimique, l'expérience montre bien que ce ligand possède la plus faible valeur d'IC₅₀ (0.86 μ M). Il est clair qu'il est le meilleur inhibiteur par rapport à ces trois homologues.

Pour 5-LOX ce ligand est aussi le meilleur du point de vue énergétique, (-8.0 kcal/mol). Son IC₅₀ = 5 μ M n'est pas le plus faible. Tandis que le ligand 4 est celui qui a la plus petite valeur de IC₅₀ = 1.22 μ M mais avec une énergie de -6.5 kcal/mol. Nous nous essayons pas de faire une corrélation entre les énergies d'interactions et les valeurs expérimentales des IC₅₀. Dans ce qui suit nous nous intéressons uniquement au ligand 3 qui présente du point de vue théorique et énergétique le meilleur inhibiteur formant les complexes les plus stables. On s'intéresse aux interactions mises en jeu avec les cibles.

Nous avons examinés en premier lieu les interactions entre le ligand 3 et la COX-2 et ensuite celles trouvées avec la 5-LOX.

4.1. 1CX2-Ligand 3

L'analyse de docking du ligand 3 avec la COX-2 permet d'examiner comment cette molécule se positionne dans le site actif de l'enzyme. Ainsi la détermination des résidus du site actif formant des interactions avec cet inhibiteur **Figure 18**.

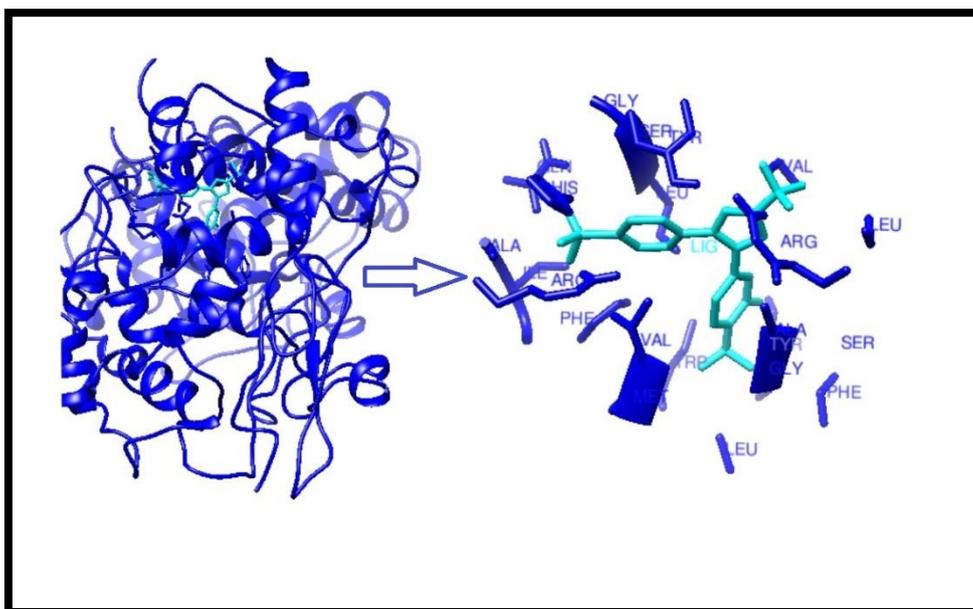


Figure 18. Site actif de la protéine COX-2.

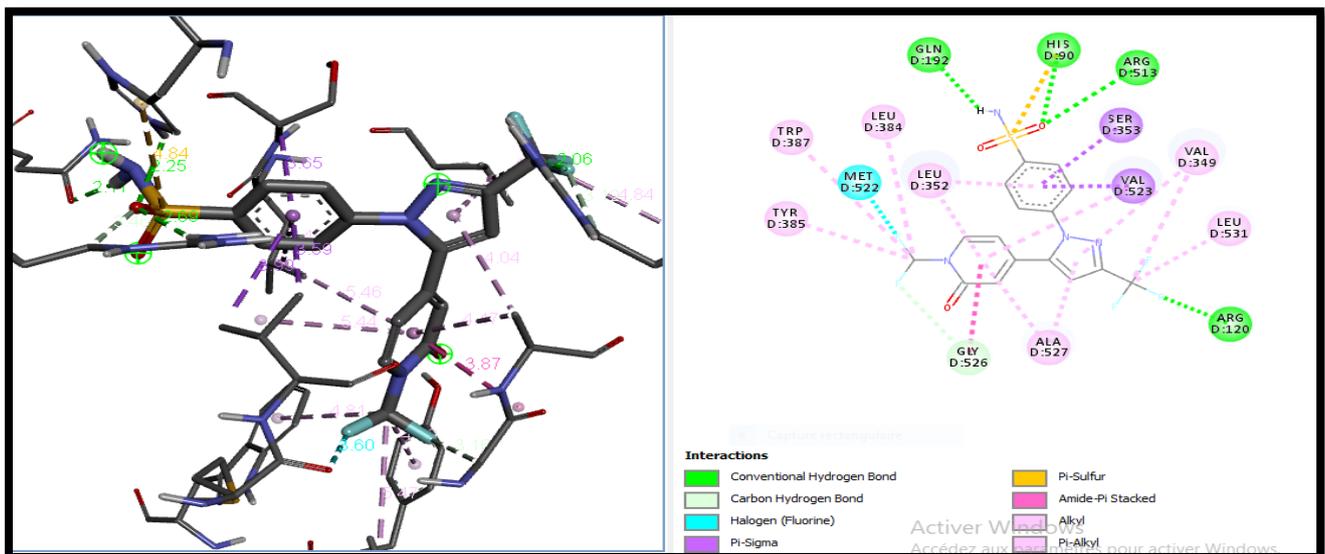
Tableau 3. Les acides aminés du site actif de la COX-2

Protéine	Les acides aminés du site actif de la COX-2
COX-2	Tyr385, Trp387, Phe518, Tyr248, Leu384, Arg120, Ser530, Tyr355, His90 et Val523 et Arg513.

Le tableau ci-dessus résume les différents acides aminés impliqués dans le site actif de la COX-2.

4.1.1. Contacts rapprochés (Close contacts)

Comme nous l'avons mentionné, ce qui nous intéresse est la connaissance des différentes interactions mises en jeu entre les deux entités chimiques. La figure 19 schématise les différentes interactions obtenues lors de la simulation.

**Figure 19.** Les interactions entre le site actif de la COX-2 et le ligand 3.

Avec le logiciel Discovery Studio **Figure 19**, nous avons montré que le ligand 3 pénètre bien dans le site actif de la protéine cible en formant différentes interactions classées comme suit :

1- Liaisons Hydrogènes : Concernant ces interactions qui sont et qui jouent le rôle le plus important en biologie et le domaine du vivant, elles sont classées comme suit :

a- Liaisons hydrogène conventionnelles : H-Bond**Tableau 4.** Interactions H-Bond entre le ligand 3 et la COX-2.

Le ligand	Résidu intervenant dans l'interaction	Distance
3	ARG 513	2.69 Å
	GLN 192	2.11 Å
	HIS 90	2.25 Å
	ARG 120	2.06 Å

Le tableau 4 montre quatre acides aminés du site actif de la protéine COX-2 impliqués dans la formation de quatre liaisons hydrogène. L'acide aminé ARG 120 forme une liaison hydrogène la plus courte.

Il est noté que cet acide aminé ARG 120 forme aussi le même type d'interaction avec le ligand 1 à une distance de 2.21 Å, deux autres avec le second ligand à des distances de 2.89 Å et 2.36 Å voir, **Annexe 1**.

Les acides aminés GLN 192 et HIS 90 forment aussi des liaisons hydrogènes avec le ligand 1 à des distances 2.62 Å et 2.36 Å respectivement. Le premier acide aminé forme également une autre liaison hydrogène avec le ligand 4 à une distance de 2.50 Å respectivement, voir **Annexe 1**.

b- Carbone-Hydrogène bond**Tableau 5.** Carbone H-Bond interaction entre le ligand 3 et la COX-2.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	GLY 526	3.16 Å

Le résidu GLY 526 forme une interaction Carbone -Hydrogène avec le ligand 3.

2-Interactions Hydrophobiques

Les interactions de ce type jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des complexes. Ce sont des interactions non covalentes de type hydrophobique.

a- Pi-Sigma (π - σ)**Tableau 6.** Pi-Sigma interaction entre le ligand 3 et la COX-2.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	VAL 523	3.99 Å
	SER 553	3.65 Å

Le tableau 6 résume et montre que deux acides aminés du site actif de la COX-2 (VAL 523 et SER 553) forment deux interactions de ce type. Ces interactions ne s'ont pas fortes vu leurs distances qui s'approchent de 4 Å. Le premier résidu avec le premier ligand forme cette interaction à la même distance qu'avec le ligand 3, voir **Annexe 1**.

b- Pi-Sulfur (π -sulfure)**Tableau 7.** Pi-Sulfur interaction entre le ligand 3 et la COX-2.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	HIS 90	4.84 Å

Le fait que tous les ligands de cette étude possèdent des atomes de soufre, il est envisageable que ce dernier forme des interactions de type pi-sulfure. L'atome de soufre du ligand 3 forme une telle interaction qui est stabilisante. Cette interaction est formée avec le noyau aromatique de l'acide aminé HIS90 à une distance 4.84 Å. Ce même résidu forme une interaction homologue avec le ligand 1 à une distance de 4.85 Å.

c- Pi-Pi Staked**Tableau 8.** Pi-Pi Staked interaction entre le ligand 3 et la COX-2.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	GLY 526	3.87 Å

Les interactions de type Pi-Pi sont des interactions hydrophobiques qui mentionnent la stabilité des complexes et jouent un très grand rôle dans le domaine du vivant. Seul l'acide aminé GLY526 forme une telle interaction comme le montre le tableau 8.

d- Alkyl

Tableau 9. Alkyl interaction entre le ligand 3 et la COX-2.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	LEU 384	5.47 Å
	VAL 349	4.87 Å
	LEU 531	4.84 Å

Le tableau 9 résume les différents acides aminés impliqués dans la formation des interactions hydrophobiques de type alkyl ainsi que leurs distances. Ces interactions sont de l'ordre de 5 Å.

Nous observons deux interactions de ce type entre le ligand 1 et l'acide aminé VAL 349 à des distances 5.18 Å et 5.07 Å, voir **Annexe 1**.

e- Pi-Alkyl

Tableau 10. Pi-Alkyl interaction entre le ligand 3 et la COX-2.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	TYR 385	4.69 Å
	TRP 387	4.81 Å
	ALA 527	4.47 Å
	ALA 527	4.04 Å
	LEU 352	5.46 Å
	LEU 352	5.49 Å
	VAL 523	5.44 Å
	VAL 349	4.71 Å

De la même manière, nous observons huit interactions de type Pi-Alkyl qui sont de type hydrophobique. Leurs distances varient entre 4.04 Å et 5.49 Å. Voir **Tableau 10**.

Les acides aminés TYR 385 et TRP 387 forme aussi la même interaction avec le ligand 1 à des distances de 3.37 Å et 4.46 Å respectivement.

Le ligand 1 forme aussi quatre autres interactions de ce type. Deux de ces interactions à des distances 4.84 Å et 4.57 Å sont observées avec le résidu ALA 527 tandis que les deux dernières sont observées avec l'acide aminé LEU 325 à des distances de 5.12 Å et 5.22 Å, Voir **Annexe 1**.

3- Interactions électrostatiques : Halogen (flurine)

Ce type d'interactions est quasiment omniprésent dans tout processus de reconnaissance moléculaire. Ces interactions sont dues à la présence de charges électrostatiques de charges opposées et des nuages électroniques. Dans ce complexe nous avons trouvé une seule interaction électrostatique de type Halogène. Ceci est du fait que notre ligand 3 possède des atomes de fluor qui sont des halogènes connus par leur forte électronégativité. Cette interaction de ce type est observée entre un atome de fluor du ligand 3 et l'acide aminé MET 522 de la protéine à une distance de 3.60 Å.

4.2. 3O8Y-Ligand 3

La figure suivante présente le site actif de la cible protéique choisie générée par le code Chimera. Les acides aminés constituant le site actif sont résumés dans le tableau 11.

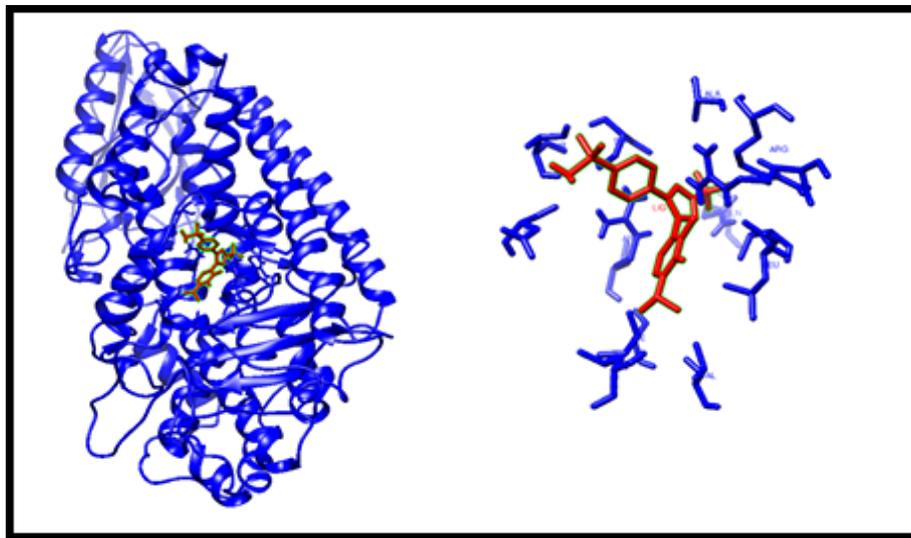


Figure 20. le site actif de la protéine 5-LOX.

Tableau 11. Les acides aminés du site actif de la 5-LOX.

Protéine	Les acides aminés du site actif de la 5-LOX
5-LOX	Tyr100, Arg10, Glu134, Arg138, Asp170, Ala388, Arg401, Glu622.

Après avoir effectué le calcul de docking, nous avons généré les conformations en 2D et 3D avec Discovery studio. Les différentes interactions sont représentées dans la **Figure 21**.

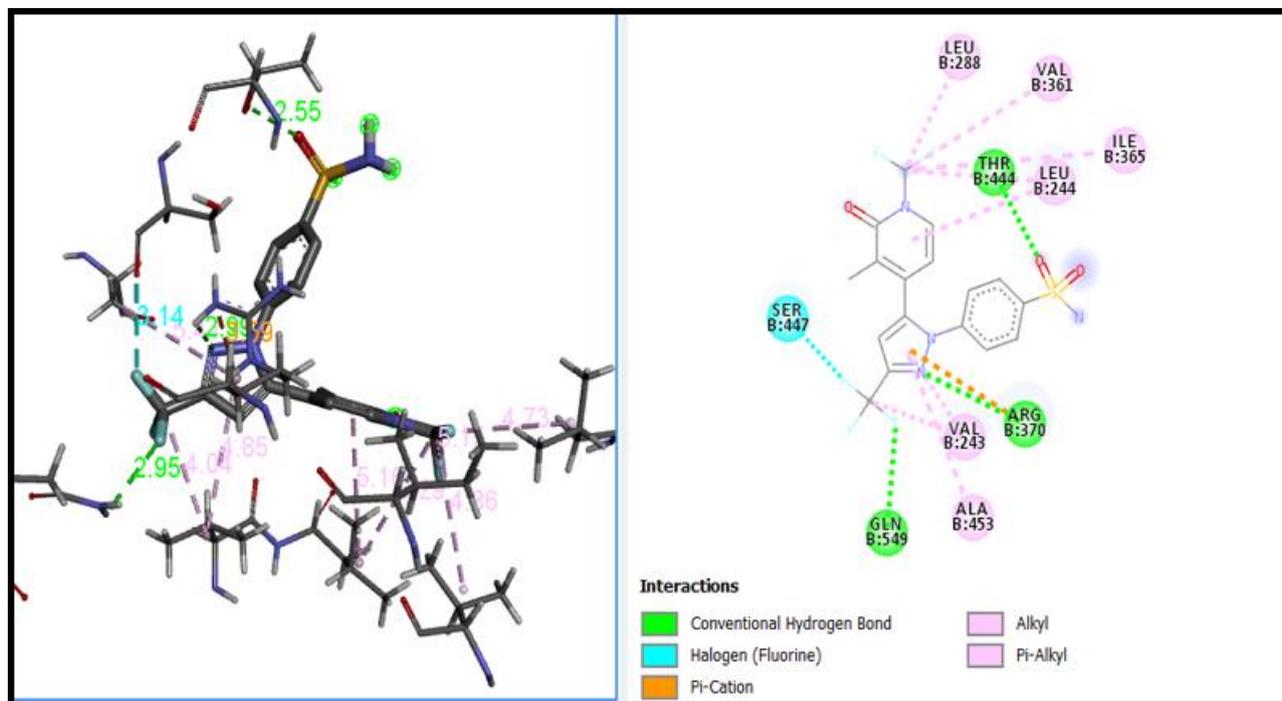


Figure 21. Les interactions entre le site actif de la 5-LOX et le ligand3.

1- Liaisons hydrogène

a- Liaisons hydrogène conventionnelles : H-Bond

Tableau 12. Hydrogène-Bond intermoléculaire entre les molécules et la 5-lipoxygénase.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	THR 444	2.55 Å
	ARG 370	2.99 Å
	GLN594	2.55 Å

Le tableau 12 montre que trois acides aminés du site actif de la protéine 5-LOX forment trois interactions de type liaisons hydrogène avec le ligand 3. Ces acides aminés sont THR 444, ARG 370 et GLN 594 à des distances de 2.55Å, 2.99 Å, et 2.55 Å respectivement.

2- Interactions hydrophobiques

a- Alkyl

Tableau 13. Alkyl intermoléculaire entre les molécules et la 5-lipoxygénase.

Le ligand	Résidu interaction	Distance
3	LEU 288	4.73 Å
	VAL 361	4.86 Å
	VAL 243	5.04 Å
	ILE 365	5.15 Å
	LEU 244	5.29 Å

Nous observons que ce type d'interaction contribue largement dans la stabilité du complexe formé entre le ligand 3 et la cible 5-LOX. Les acides aminés impliqués dans ces interactions sont mentionnés dans le tableau 13, leurs distances varient entre 4.73 Å et 5.29 Å.

b- Pi-Alkyl

Tableau 14. Pi-Alkyl intermoléculaire entre les molécules et la 5-lipoxygénase.

Le ligand	Residue interaction	Distance
3	VAL 243	4.85 Å
	LEU 244	5.16 Å
	ALA 453	5.44 Å

Le tableau 14, montre les trois acides aminés du site actif impliqués dans la formation des interactions hydrophobiques de type pi-Alkyl avec le ligand 3. Le ligand 3 interagit avec ces acides aminés à des distances supérieures à 4,50 Å.

3- Interaction électrostatiques

Comme nous l'avons déjà mentionné, ce type d'interaction est d'une grande importance dans la reconnaissance moléculaire et la stabilité des complexes protéine-ligand. Concernant le complexe 5-LOX-ligand 3 nous avons observé deux types d'interactions électrostatiques qui sont :

a- Halogen (flurine)

Une seule interaction de ce type est observée entre un atome de fluor du ligand 3 et l'acide aminé SER447 de la protéine à une distance de 3.14 Å.

b- Pi-Cation

D'une manière similaire, seul l'acide aminé ARG 370 forme une interaction électrostatique de type Pi-Cation avec le ligand 3. Cette interaction est à une distance de 3.59 Å.

Conclusion

Ce travail qui est axé sur la modélisation moléculaire par docking avec AutoDock, à pour but essentiel d'étudier *in silico* des interactions de nouveaux inhibiteurs sur les COX-2/5-LOX, cibles enzymatiques impliquées dans les phénomènes de l'inflammation.

On a testé la performance du programme AutoDock utilisé dans cette étude. La première étape consiste à valider le protocole de simulation. Ceci est déterminé par le calcul du RMSD du SC-558 ligand de référence de la pdb: 1CX2 (COX-2). Avec un RMSD de 0.0 Å inférieur à 2 Å le protocole suivi est bien validé.

A partir des résultats obtenus, nous sommes arrivés à conclure que le ligand 3 présente le meilleur inhibiteur vis à vis de la cyclo-oxygénase avec une énergie de = -12, kcal/mol. De même ce ligand présente la meilleure molécule qui pourrait interagir avec la 5=LOX du point de vue énergétique. Il est clair que cette molécule n'est pas le meilleur inhibiteur *in vivo*. Afin de corréler les deux paramètres énergétique et expérimental, une étude par dynamique moléculaire est fortement souhaitée.

Ces simulations montrent bien que la plupart des interactions trouvées entre les cibles et les ligands sont de type liaisons hydrogène qui constituent et présentent les interactions les plus importantes dans les processus biologiques. Des interactions hydrophobiques stabilisantes qui sont aussi d'une grande importance sont observées. Finalement des interactions électrostatiques sont présentes et contribuent dans la formation de ces complexes protéine-ligand.

Dans ce travail, nous nous sommes familiarisés avec différentes techniques de modélisations moléculaire, voir l'optimisation de géométrie des molécules, la visualisation des structures enzymatiques. En second lieu, nous nous sommes focalisés sur le docking moléculaire qui représente un outil essentiel dans la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives.

Les références **bibliographies**

[1] Hoffer L. Développement et validation du logiciel S4MPLE: Application au docking moléculaire et à l'optimisation de fragments assistée par ordinateur dans le cadre du Fragment-Based Drug design. Thèse de doctorat d'université: chimoinformatique. Strasbourg: Université de Strasbourg. France. 2013. 149p.

[2] Meslamani J. Développement de nouvelles méthodes de criblage in silico en chémogénomique. Thèse de doctorat d'université:chimoinformatique. Strasbourg : Université de Strasbourg. France. 2012. 250p.

[3] Logiciels libres pour le criblage moléculaire [En ligne] http://www.researchgate.net/profile/Jerome_Pansanel/publications

[4] <https://doi.org/10.1016/j.emcsto.2005.01.005> (Consulté le 25/03/2020).

[5] Collège Français des Pathologistes (CoPath) La réaction inflammatoire. Les inflammations Date de création du document 2011_2012 (consulté le 18/04/2020).

[6] Aurélien Grosdidier .Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives.THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE .Le 27 juin 2007. 90P

[7] Fortuné A. Techniques de Modélisation Moléculaire Appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance. Thèse de doctorat d'université : Sciences du médicament. Grenoble : Université Joseph Fourier - Grenoble I. France. 2006. 168p

[8] Krid A. Modélisation de nouvelles molécules biologiques actives liées au stress oxydant. Thèse de magister d'université : chimie theorique. Constantine: Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2008. 75p

[9] Bensegueni A. Etude théorique des métabolites secondaires des végétaux et des composés de synthèse sur le plan de l'activité biologique : simulation par docking (arrimage) moléculaire sur la lipoxygénase et la cyclooxygénase. Thèse de doctorat d'université :Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2007. 76p.

[10] http://autodock.scripps.edu/index_html/?searchterm=autodock

[11] <https://www.google.com/search?q=autodock>

[12] Mokrani E. H. Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique. Thèse de magister d'université : Technologie des explorations biochimiques. Constantine : Université Mentouri Constantine. Algérie. 2012. 75p.

[13] Arrault A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. Orléans : Université d'Orléans. France. 2007. 176p.

[14] <http://autodock.scripps.edu/faqs-help/glossary/redocking>.

[15] Shah et al., 'Molecular Docking and In Silico Cogitation Validate Mefenamic Acid Prodrugs as Human Cyclooxygenase-2 Inhibitor'.

[16] https://www.google.com/search?q=les+signes+de+l%27inflammation&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiv6C42_LoAhWcXRUIHRLADAQ_AUoAXoECA0QAw&biw=1366&bih=657#imgsrc=IWRwiUVj37GLM (Consulté le 18/04/2020).

[17] Dinel A. Impact de l'inflammation à bas bruit associée à l'obésité sur l'établissement des troubles de l'humeur et de la cognition. Thèse de doctorat d'université : Les Sciences et les Technologies au service de l'Homme et de l'environnement : Université Bordeaux 1. France. 2008. 287p. (consulté le 14/05/2020).

[18] Peigné S. Contact de bon usage et arrêts des traitements par immunothérapie : état des lieux dans le service de rhumatologie du centre hospitalier du mans. Thèse de doctorat d'université : Département Pharmacie : Université D'Angers. France. 2013. 107p. (consulté le 14/05/2020).

[19] Arbez N. Etude des effets des peptides amyloïdes : du fonctionnement de la synapse aux modifications du cytosquelette dans l'apoptose neuronale. Thèse de doctorat d'université : Biologie de vieillissement. Paris : Université René Descartes.France. 2005. 181p. . (consulté le 14/05/2020).

[20] <https://www.planetesante.ch/Magazine/Actualites-et-recherche/Recherche-anticancer/Le-role-de-l-inflammation-dans-le-cancer>. (consulté le 14/05/2020).

[21] <https://www.doctissimo.fr/sante/dictionnaire-medical/anti-inflammatoire>. (Consulté le 25/05/2020).

[22] COFER, Collège Français des Enseignants en Rhumatologie Item 174 : Prescriptions et surveillance des anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens. (Consulté le 25/05/2020).

[23] <https://sante.lefigaro.fr/sante/traitement/anti-inflammatoires-non-steroidiens/definition>. (Consulté le 10/06/2020).

[24] Clinique des maladies respiratoires, hôpital A.-Calmette, CHRU, 1, rue du Professeur-Leclerc, 59037 Lille cedex, France b Service des urgences, CHU du Sart-Tilman, domaine du Sart-Tilman B35, 4000 Liège, Belgique Reçu le 3 juillet 2003 ; accepté le 16 juillet 2003. (consulté le 20/06/2020).

[25] <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/lipoxygenase> (consulter le 20/08/2020).

[26] Caroline Charlier *, Catherine Michaux Lab. de Chimie Moleculaire Structurale, Faculte's Universitaires N.-D. de la Paix, Rue de Bruxelles 61, B-5000 Namur, Belgium Received 9 May 2003; accepted 9 May 2003 (consulté le 21/08/2020).

[27] Saad N. Kabir and Tarek Mohamed School of Pharmacy, Health Sciences Campus, University of Waterloo, 200 University Avenue W. Waterloo, ON, N2L 3G1 Canada Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Progress in Small Molecule Drug Development (**consulté le 21/08/2020**).

[28] In Vitro Evaluation and Docking Studies of 5-oxo-5H-furo[3,2-g]chromene-6-carbaldehyde Derivatives as Potential Anti-Alzheimer's Agents. 2019. 24p.

Annexe

Annexe 1. Les tableaux d'interaction de la COX-2 avec les 4 ligands.

Le ligand	Résidu interaction H-bond	Distance
1	ARG 120	2.21 Å
	TYR 355	2.91 Å
	HIS 90	2.36 Å
	SER 353	2.09 Å
	GLN 192	2.62 Å
	ARG 53	2.67 Å
	LEU 352	2.53 Å
2	TYR 115	2.90 Å
	LYS 85	2.53 Å
	ARG 120	2.89 Å
	ARG 120	2.36 Å
3	ARG 513	2.69 Å
	GLN 192	2.11 Å
	HIS 90	2.25 Å
	ARG 120	2.06 Å
4	GLN 192	2.50 Å
	GLY 354	3.27 Å
	HIS 356	2.78 Å

Le ligand	Résidu interaction : Pi-Sigma	Distance
1	SER 353	3.56 Å
	VAL 523	3.46 Å
2	/	/
3	VAL 523	3.99 Å
	SER 553	3.65 Å
4	THR 94	3.86 Å
	THR 94	3.48 Å

Le ligand	Résidu interaction Pi-Sulfur	Distance
1	HIS 90	4.85 Å
2	TYR 122	5.42 Å
3	HIS 90	4.84 Å
4	/	/

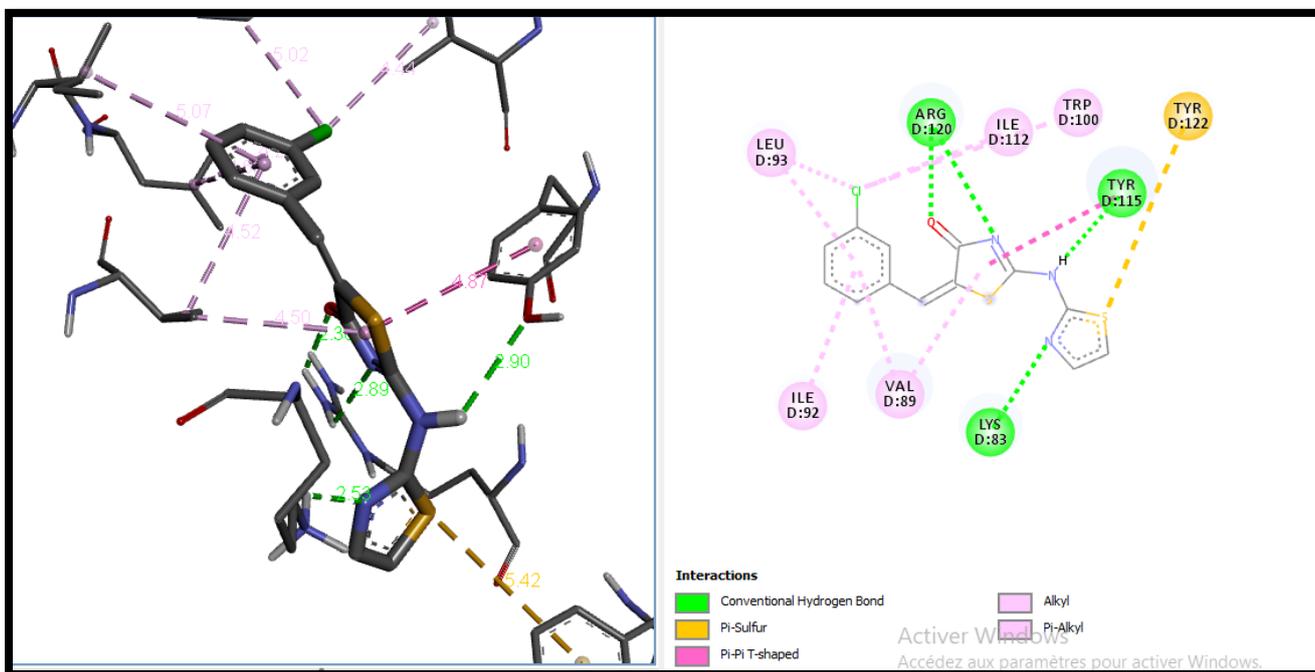
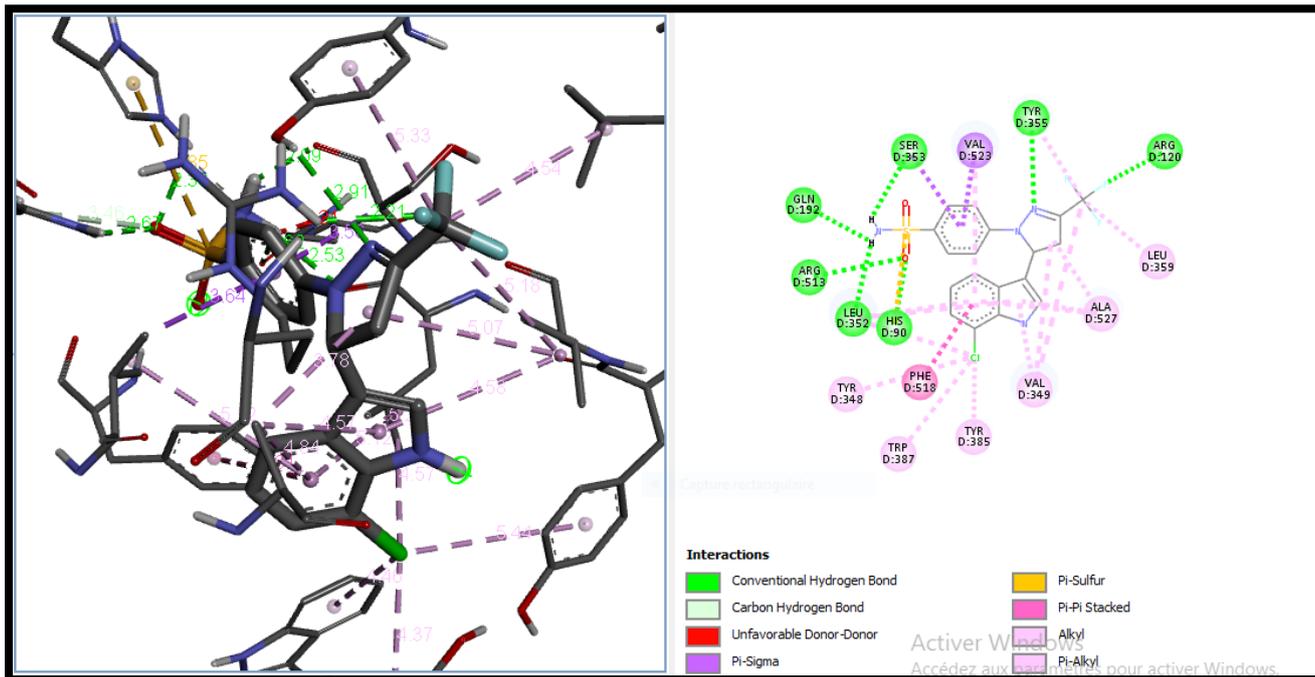
Le ligand	Résidu interaction Carbone H-Bond	Distance
1	ARG 513	3.46 Å
2	/	/
3	GLY 526	3.16 Å
4	HIS 356	3.69 Å

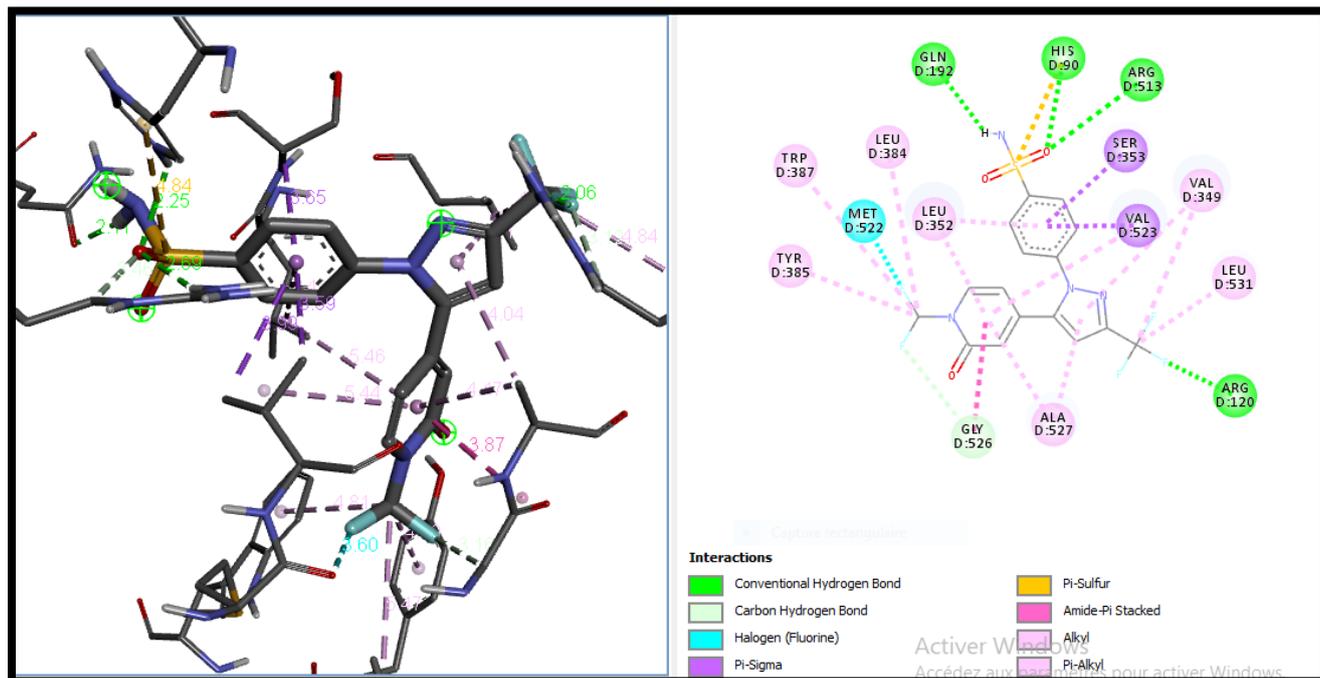
Le ligand	Résidu interaction Pi-Pi staked	Distance
1	PHE 518	5.81 Å
2	TYR 115	4.87 Å
3	GLY 526	3.87 Å
4	HIS 356	5.75 Å

Le ligand	Résidu interaction Alkyl	Distance
1	ALA 527	3.78 Å
	LEU 352	4.57 Å
	LEU 359	4.54 Å
	VAL 349	5.18 Å
	VAL 349	5.07 Å
2	LEU 93	4.20 Å
	TRP 100	5.02 Å
	ILE 112	4.44 Å
3	LEU 384	5.47 Å
	VAL 349	4.87 Å
	LEU 531	4.84 Å
4	PRO 514	5.18 Å

Le ligand	Résidu interaction Pi- Alkyl	Distance
1	ALA 527	4.84 Å
	ALA 527	4.57 Å
	LEU 349	4.58 Å
	LEU 352	5.12 Å
	LEU 352	5.22 Å
	TRP 387	4.46 Å
	TYR 385	3.37 Å
	TYR 348	5.44 Å
	TYR 355	5.33 Å
2	VAL 89	4.50 Å
	VAL 89	4.52 Å
	ILE 92	5.07 Å
	LEU 93	4.63 Å
3	TYR 385	4.69 Å
	TRP 387	4.81 Å
	ALA 527	4.47 Å
	ALA 527	4.04 Å
	LEU 352	5.46 Å
	LEU 352	5.49 Å
	VAL 523	5.44 Å
VAL 349	4.71 Å	
4	HIS 90	4.67 Å
	HIS 95	4.65 Å
	TYR 91	5.30 Å
	PRO 514	4.49 Å

Annexe 2. Les images d'interaction entre la COX-2 et le ligand 1, 2 et 4.





Annexe 3. Les tableaux d'interaction de la 5-LOX avec les 4 ligands.

La molécule	Résidu interaction H-Bond	Distance
Ligand 1	ASN613	1.78 Å
Ligand 2	LYS133	2.46 Å
Ligand 3	THR444	2.55 Å
	ARG370	2.99 Å
	GLN594	2.55 Å
Ligand 4	BHIS130	2.94 Å

La molécule	Résidu interaction Halogen	Distance
Ligand 1	GLU16	2.99 Å
Ligand 2	/	/
Ligand 3	SER447	3.14 Å
Ligand 4	/	/

La molécule	Résidu interaction C H-Bond	Distance
Ligand 1	GLU614	2.61 Å
Ligand 2	/	/
Ligand 3	/	/
Ligand 4	GLU134	2.65 Å
	HIS130	2.69 Å

La molécule	Résidu interaction Pi-Cation	Distance
Ligand 1	ARG401	4.11 Å
Ligand 2	/	/
Ligand 3	ARG370	3.59 Å
Ligand 4	LYS133	3.30 Å
	LYS133	4.34 Å

La molécule	Résidu interaction Pi-door H	Distance
Ligand 1	/	/
Ligand 2	/	/
Ligand 3	/	/
Ligand 4	HIS130	3.74 Å

La molécule	Résidu interaction Pi-Sigma	Distance
Ligand 1	PHE402	5.80 Å
Ligand 2	/	/
Ligand 3	/	/
Ligand 4	/	/

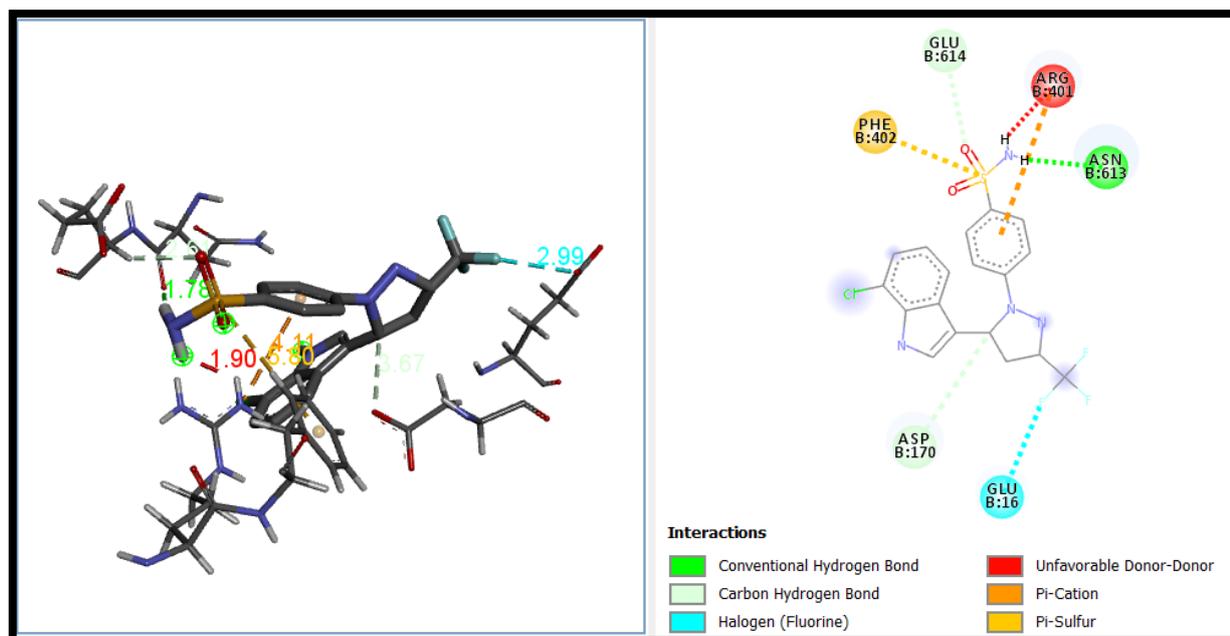
La molécule	Résidu interaction Pi-Anion	Distance
Ligand 1	/	/
Ligand 2	GLU108	4.96 Å
Ligand 3	/	/
Ligand 4	/	/

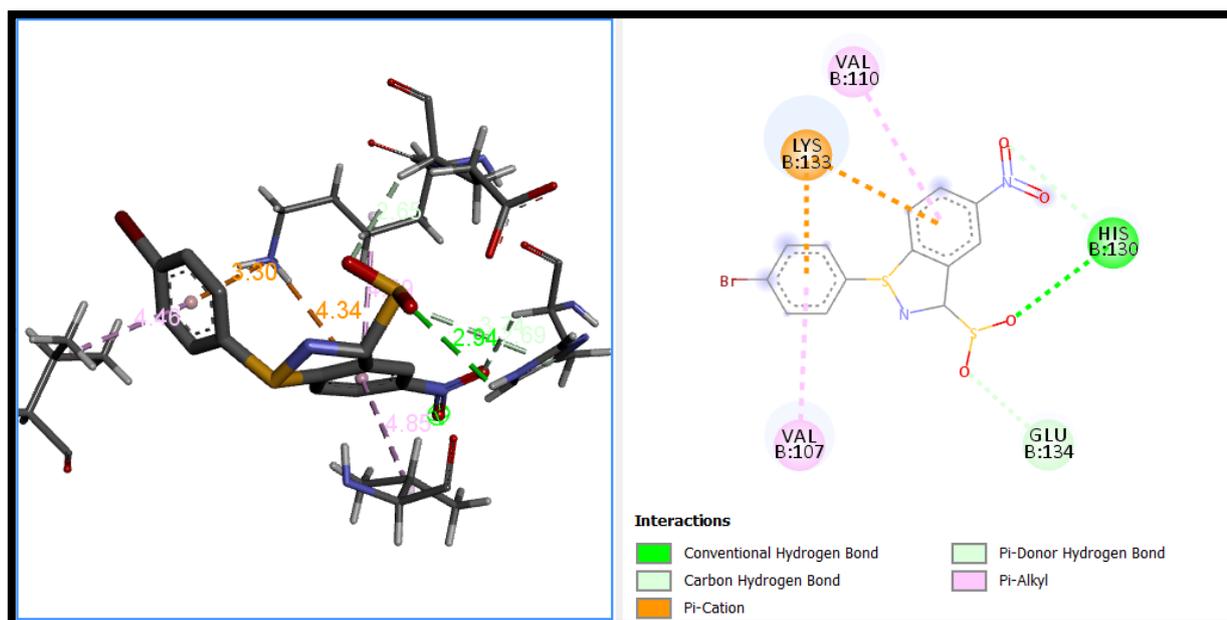
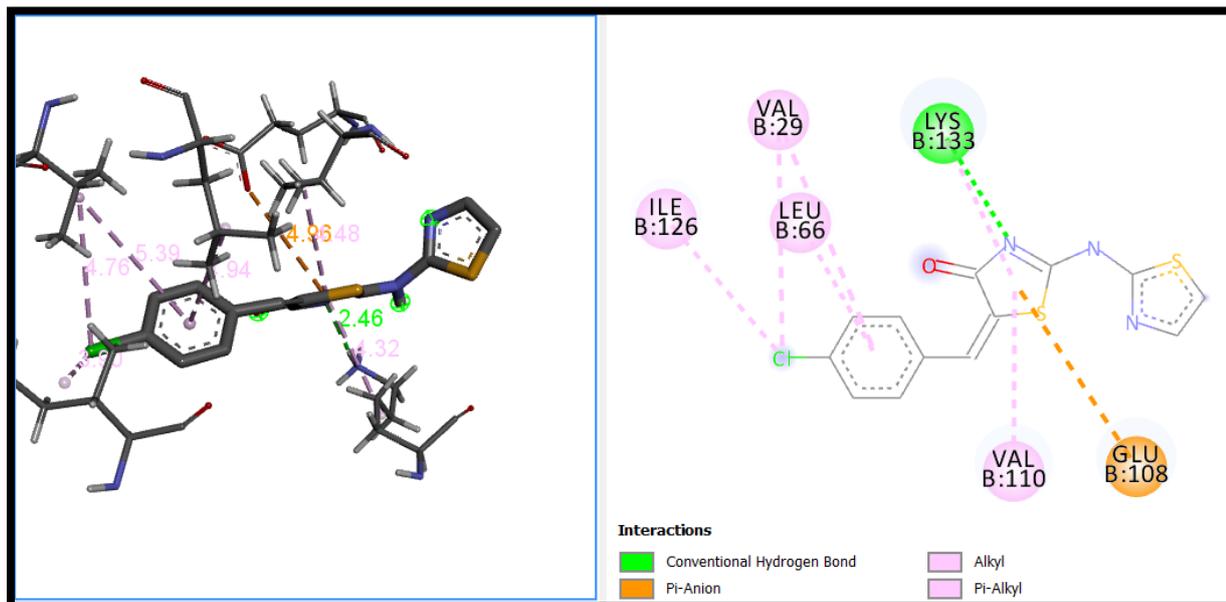
La molécule	Résidu interaction Donor-Donor	Distance
Ligand 1	ARG401	1.90 Å
Ligand 2	/	/
Ligand 3	/	/
Ligand 4	/	/

La molécule	Résidu interaction Alkyl	Distance
Ligand 1	/	/
Ligand 2	ILE126	3.90 Å
Ligand 3	LEU288	4.73 Å
	VAL361	4.86 Å
	VAL243	5.04 Å
	ILE365	5.15 Å
	LEU244	5.29 Å
Ligand 4	/	/

La molécule	Résidu interaction Pi-Alkyl	Distance
Ligand 1	/	/
Ligand 2	LYS133	4.32 Å
	VAL110	4.48 Å
	LEU66	4.94 Å
	VAL21	5.39 Å
Ligand 3	VAL243	4.85 Å
	LEU244	5.16 Å
	ALA453	5.44 Å
	VAL107	4.46 Å
Ligand 4	LYS133	4.59 Å
	VAL110	4.85 Å

Annexe 4. Les images d'interaction entre la 5-LOX et le ligand 1, 2 et 4.





Annexe 5. Les énergies obtenues par le docking du ligand 3 avec la protéine COX/LOX.

```

CA Invite de commandes
#####
WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 4 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: 1773734348
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
done.
Refining results ... done.

mode |  affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
  1   |    -8.0   |    0.000   |    0.000
  2   |    -7.3   |   43.667   |   45.296
  3   |    -7.0   |    1.483   |    2.101
  4   |    -6.9   |   32.236   |   34.813
  5   |    -6.8   |   29.516   |   31.795
  6   |    -6.8   |   32.116   |   34.758
  7   |    -6.7   |   27.397   |   29.337
  8   |    -6.6   |   30.366   |   33.205
  9   |    -6.4   |   42.216   |   44.400
Writing output ... done.

C:\Users\benma\Desktop\5-lox_docking22>

```

```

CA Invite de commandes
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461 #
# #
# DOI 10.1002/jcc.21334 #
# #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information. #
#####
Detected 2 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -2105868724
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
*****
done.
Refining results ... done.

mode |  affinity | dist from best mode
      | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
  1   |   -12.0   |    0.000   |    0.000
  2   |   -11.7   |    0.613   |    1.352
Writing output ... done.

C:\Users\ASUS\Desktop\mémoire\cox2\mol22>

```

Résumé

Afin de contourner les limites du criblage expérimental, une nouvelle méthode alternative basée principalement sur la technologie informatique a été envisagée: le criblage virtuel par docking moléculaire. Cette méthode peut modéliser les interactions entre les protéines et des milliers de candidats moléculaires. Dans nos travaux, nous avons utilisé le programme, AutoDock pour concevoir un nouveau type d'inhibiteurs doubles de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et de la 5-lipo-oxygénase (5-LOX), qui sont utilisés dans diverses pathologies inflammatoires.

L'évaluation de l'énergie d'interaction de re-dock de la COX-2 avec son ligand de référence SC-588, avec une énergie d'interaction égale à -11,1 kcal/mol, par la suite, nous avons fait le docking avec 4 composées,

À la fin du docking le composé 3 est le meilleur inhibiteurs théoriquement plus sélectifs et affins envers la COX-2 et la 5-LOX avec des valeurs d'énergie d'interaction s'évaluant à -12 Kcal/mol et -8 Kcal/mol respectivement.

In order to circumvent the limits of experimental screening, a new alternative method based mainly on computer technology has been considered: virtual screening by molecular docking. This method can model the interactions between proteins and thousands of molecular candidates. In our work, we used the AutoDock program to design a new type of dual inhibitors of cyclooxygenase 2 (COX-2) and 5-lipo-oxygenase (5-LOX), which are involved in various inflammatory pathologies.

The evaluation of the interaction energy of re-dock of COX-2 with its reference ligand SC-588, with an interaction energy equal to -11.1 kcal / mol, subsequently, we have docked with 4 compounds,

At the end of docking, compound 3 is the best inhibitor theoretically more selective and affine towards COX-2 and 5-LOX with interaction energy values estimated at -12 Kcal / mol and -8 Kcal / mol respectively.

من أجل التحايل على حدود الفحص التجريبي ، تم النظر في طريقة بديلة جديدة تعتمد بشكل أساسي على تكنولوجيا الكمبيوتر: الفحص الافتراضي عن طريق الالتحام الجزيئي. يمكن لهذه الطريقة نمذجة التفاعلات بين البروتينات وآلاف الجزيئات المرشحة. في عملنا ، استخدمنا Autodock لتصميم نوع جديد من مثبطات إنزيمات الأكسدة الحلقية 2 (COX-2) و 5-lipo-oxygénase (5-LOX) ، المتورطة في العديد من الأمراض الالتهابية.

تقييم طاقة التفاعل لإعادة COX-2 مع الرابط المرجعي SC-588 مع طاقة تفاعل تساوي 11.1- كيلوكالوري/ مول و بالتالي لدينا راسية مع 4 إرساء مراكب.

في نهاية الإرساء، يعتبر المركب 3 هو أفضل مثبط نظريًا وأكثر انتقائية وتناغمًا مع COX-2 و 5-LOX مع قيم تفاعلية تقدر ب 12-

كيلو كالوري / مول و 8- كيلو كالوري / مول على التوالي.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Option :

Bio-Informatique

Thème Modélisation moléculaire et docking moléculaire de l'inhibiteur double COX/LOX

Résumé

Afin de contourner les limites du criblage expérimental, une nouvelle méthode alternative basée principalement sur la technologie informatique a été envisagée: le criblage virtuel par docking moléculaire. Cette méthode peut modéliser les interactions entre les protéines et des milliers de candidats moléculaires. Dans nos travaux, nous avons utilisé le programme, AutoDock pour concevoir un nouveau type d'inhibiteurs doubles de la cyclooxygénase 2 (COX-2) et de la 5-lipo-oxygénase (5-LOX), qui sont utilisés dans diverses pathologies inflammatoires.

L'évaluation de l'énergie d'interaction de re-dock de la COX-2 avec son ligand de référence SC-588, avec une énergie d'interaction égale à -11,1 kcal/mol, par la suite, nous avons fait le docking avec 4 composées,

À la fin du docking le composée 3 est la meilleur inhibiteurs théoriquement plus sélectifs et affins envers la COX-2 et la 5-LOX avec des valeurs d'énergie d'interaction s'évaluant à -12 Kcal /mol et -8 Kcal/mol respectivement.

Mots clés :AutoDock, Docking Moléculaire, Cyclo-oxygénase, Lypo-oxygénase, Energie d'interaction

Présenté et soutenu par : SAYEH MEDDOUR Iméne

BENMAGHSOULA Yacine

Soutenu le 28 septembre 2020 devant le jury :

Président : Dr. M. TAMAGHOULT

Promoteur : Dr. A. KRID

Examineur : Dr. K. KELLOU

Année Universitaire : 2019/2020

