

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



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

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département : Biochimie et Biologie cellulaire et
moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية
والجزيئية

Mémoire

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

Thème

Identification de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme COX-2 par docking moléculaire dans la base de données NPASS

❖ **Présenté et soutenu par :**

- CHELLOUG Maroua
- FERHI Nora

Le : 20/06/2023

❖ **Jury d'évaluation :**

Président de jury : MOKRANI E.H. (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine1)

Rapporteur : CHERIET M. (MRB-Centre de Recherche en Biotechnologie de
Constantine CRBt)

Examineur : BOUHDJAR Kh. (MRA-Centre de Recherche en Biotechnologie de
Constantine CRBt)

Année universitaire : 2022/2023

Remerciement

Au terme de ce travail, on tient à remercier Dieu le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce travail.

J'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Notre encadreur Mme CHERIET MOUNIA qui nous a dirigé avec une grande rigueur scientifique, pour sa précieuse aide, ses conseils et ces orientations et le temps qu'il m'a accordé pour mon encadrement.

Nous remercions par ailleurs vivement les membres du jury de nous avoir fait l'honneur de juger notre travail et d'assister à la soutenance :

Mr MOKRANI EL HASSEN, qui nous fait l'honneur de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.

Mr BOUHDJER KHALID, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à Mme LACHI pour la confiance et l'aide qu'il nous a accordé.

Finalement, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

Dédicace

A ma très chère mère

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi.. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Malheureusement tu n'es plus là. Mais tu es dans mon coeur à tout jamais ma petite maman qu'elle repose en paix .J'ai l'honneur de dédie ce modeste travail tous d'abord à toi mon âme.

A mon très cher père

Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, Et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout puissant te préserve, t'accorde Santé, bonheur et te protège de tout mal.

A mes chères sœurs, Manel, Ghada, Noor et Manar et mes frères Seif El Islam et El Mouaatassim billeh, qui n'ont cessé être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A NORA mon binome, une grande soeur, qui a été a mes côtés, qui a partagé avec moi beaucoup de choses.

A mon fiancé Saddam, qui a toujours été là à me soutenir et m'encourager.

A Toute ma famille en particulier : Ma belle mère Soulef, Mon oncle Karim et sa femme Sihem, ma nièce Sirine.

Maroua

Dédicace

A mon très cher père

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension. Ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

A mon très chère mère

Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Je suis très fière d'être votre fille et de pouvoir enfin réaliser, ce que vous avez tant espéré et attendu de moi.

A mes chères sœurs Fouzia et Selsabil, mes chers frères Saleh, Khaled et Anouar.

A mon cher binôme MAROUA, pour sa entent et sa sympathise, et Pour leur indéfectible soutiens et leur patiences infinies.

A mon fiancé Oussama, qui m'a inculqué le courage, l'espoir, et la tendresse.

A Toute ma famille en particulier: Mon oncle Kamel et ses fils Sadjed et Abde El Rahmen, ma belle mère Samira, mes cousines Meriem et Nabila.

Nora

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....1

Partie Bibliographique

Chapitre I: Docking moléculaire

I. Introduction.....	2
1. Docking moléculaire.....	2
2. Principe.....	3
3. Types de docking moléculaire.....	3
4. Algorithme de docking	4
4.1. Méthodes systématiques.....	4
4.2. Méthode stochastique (génétique).....	4
4.3. Méthodes de Simulation.....	4
5. Fonctions de scores.....	4
5.1. Les fonctions de scoring empiriques.....	4
5.2. Fonctions de score basées sur les champs de force.....	5
5.3. Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based »	5
5.4. Fonctions de score consensus.....	5
6. Les outils de docking moléculaire.....	5
6.1. Récepteurs.....	5
6.2. Ligands.....	6
6.3. Programmes de docking.....	6
7. Criblage Virtuel.....	7
7.1. Les approches ligand-based	7
7.2. Les approches Structure-based.....	7

Chapitre II : Cyclooxygénase

1. Cyclooxygénases.....	9
2. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des COX.....	9

2.1.	La Cyclo-Oxygénase-1 (COX-1).....	9
2.2.	La Cyclo-Oxygénase-2 (COX-2).....	10
3.	Rôle de la cyclooxygénase dans l'inflammation.....	11
4.	Différences entre les COX-1 et COX-2.....	12
4.1	Expression dans les tissus.....	12
4.2.	Fonctions et implications pathologiques.....	12
5.	Site actif des COX.....	14
5.1.	Site actif des COX-1.....	14
5.2.	Site actif des COX-2.....	15
6.	Inhibiteurs de COX-2.....	16
6.1.	Prpriétés pharmacologiques et utilisations cliniques.....	17
6.2.	Limitations et effets secondaire.....	17
7.	NPASS.....	19

Partie Pratique

Chapitre III : Matériels et méthodes

I.	Introduction.....	20
II.	Matériels et méthodes.....	20
II.1.	Matériels.....	20
1.	Logiciels.....	20
2.	Banques de données.....	20
2.1.	Protein Data Bank (PDB).....	20
2.2.	Natural Product Activity and Species Source (NPASS).....	21
II. 2	Méthodes.....	21
1.	Test de fiabilité du programme	21
1.1.	Test du RMSD.....	21
1.2.	L'analyse visuelle.....	22
2.	Criblage virtuel	22
2.1.	Préparation de la protéine.....	22
2.2.	Préparation de ligand.....	22
2.3.	Génération de la grille tridimensionnelle (grid box).....	22

Chapitre IV : Résultats et discussions

I. Résultats et discussions.....	23
I.1. Validation de protocole de docking	23
1. Test RMSD.....	23
2. Analyse visuelle	23
I.2. Criblage virtuel	24
1. Interaction protéine-ligand co-cristallisé	27
2. Analyse du mode d'interaction des complexes.....	28
I.3. Les propriétés ADME.....	32
1. Propriétés physicochimiques.....	32
2. Propriétés pharmacocinétiques.....	33
Conclusion.....	35
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
Å	Angström
AA	Acide Aminé
ADT	Autodock tools
ADMET	Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion et Toxicité
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien.
BBB	Blood Brain Barrier.
BFGS	Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
COX	Cyclooxygénase.
COX-1	Cyclo-oxygénase -1
COX-2	Cyclo-oxygénase -2
CYP	famille de Cytochrome P450.
ΔG	Delta G
GI	Gastro Intestinal.
ID	Identifiant
LogP	Logarithme du coefficient de partage eau/octanol.
n.LF	Nombre de liaison flexible.
n.ON	Nombre d'accepteur d'hydrogène.
n.OHNH	Nombre de donneur d'hydrogène.
NPASS	Natural Product Activity and Species Source
PDB	Protein Data Bank
Pdbqt	Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)
PG	Prostaglandine.
PGE2	Prostaglandin vasoactive
PGI2	Prostaglandines anti-thrombogéniques
PM	Poids moléculaire.
POX	Péroxydase
PTGS	Prostaglandine-endoperoxyde synthase
QSAR	Relation quantitative structure-activité
RE	Réticulum endoplasmique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD	Root-Mean-SquareDeviation
TPSA	Surface polaire topologique.

Acides Aminés

ALA	Alanine
ARG	Arginine
GLN	Glutamine
GLU	Acide glutamique
GLY	Glycine
HIS	Histidine
ISO	Isoleucine
LEU	Leucine
LYS	Lysine
SER	Sérine
TYR	Tyrosine
VAL	Valine

Liste des figures

Figure 01 : Représentation schématique du docking moléculaire.....	2
Figure 02 : Représentation schématique des étapes du docking moléculaire.....	3
Figure 03 : Illustration schématique des approches ligand-based et structure-based.....	8
Figure 04 : Structure de la Cyclooxygénase-1.....	10
Figure 05 : Structure de la Cyclooxygénase-2.....	11
Figure 06 : Représentation du site actif de la COX-1.....	15
Figure 07 : Représentation du site actif de la COX-2.....	16
Figure 08 : Synthèse des prostaglandines et inhibition par AINS.....	18
Figure 09 : Informations relatives à la protéine « 5IKR ».....	21
Figure 10 : Diagramme circulaire représente le pourcentage des RMSD obtenus par AutoDock Vina.....	23
Figure 11 : Superposition de la conformation cristalline (coloré en bleu) et celle simulée par Vina (coloré en vert).....	24
Figure 12 : Les structure des 10 composés obtenues après criblage par le PyRx.....	27
Figure 13 : Interactions entre le ligand co-cristallisé et les résidus de site actif de 5IKR.....	28
Figure 14 : Interactions entre le composé NPC473178 et les résidus de site de 5IKR.....	29
Figure 15 : Interactions entre le composé NPC473177 et les résidus de site actif de 5IKR.....	30
Figure 16 : Interactions entre le composé NPC471943 et les résidus de site actif de 5IKR.....	31
Figure 17 : Interactions entre le composé NPC473189 et les résidus de site actif de 5IKR.....	32

Liste des tableaux

Tableau 01: Adresses des principaux programmes de docking moléculaire.....	6
Tableau 02: Différences Cyclooxygénase-1 / Cyclooxygénase-2.....	13
Tableau 03: Classification des inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygenase.....	17
Tableau 04: Résultats d'affinité des 10 meilleurs ligands avec le 5IKR.....	25
Tableau 05: Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition du COX2 (5IKR) avec le ligand co-cristallisé.....	26
Tableau 06: Propriétés physicochimiques des 10 meilleurs composés à partir de serveur SwissADME.....	33
Tableau 07: Propriétés pharmacocinétiques des 10 meilleurs composés à partir de serveur SwissADME.....	34

Introduction générale

Introduction générale

La cyclooxygénase est une enzyme clé impliquée dans la synthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Cette voie enzymatique est importante sur le plan clinique car elle est principalement ciblée par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), qu'ils sont utilisés pour soulager l'inflammation. Cependant, les AINS synthétiques actuellement disponibles présentent des effets secondaires variés. Par conséquent, de nombreuses études sont en cours pour découvrir de nouvelles molécules d'origine naturelle ayant des effets anti-inflammatoires, dans le but de remplacer les molécules synthétiques.

Pour faciliter ce processus de recherche et de développement, des programmes performants ont été développés et mis à la disposition de la communauté scientifique. Ces programmes utilisent des méthodes de conception de médicaments *in silico*, telles que le docking moléculaire. Le docking moléculaire est une technique de criblage basée sur la structure qui permet de prédire la structure d'un complexe formé par des petites molécules appelées ligands et une cible biologique, généralement une protéine. Cette méthode de modélisation moléculaire offre un complément aux méthodes expérimentales traditionnelles, ce qui permet de gagner du temps et de l'argent dans la découverte de nouveaux médicaments [1].

Dans cet objectif, cette étude a été réalisée afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la COX2 (5IKR), pour ce faire le docking moléculaire a été réalisé à l'aide du logiciel AutoDock Vina 1.5.6. Notre travail est organisé en trois chapitres:

Le premier chapitre présente l'état de l'art de la modélisation moléculaire et son rôle dans la recherche et le développement de nouveaux inhibiteurs, suivi par une introduction au docking moléculaire. Dans le deuxième chapitre, des généralités sont abordées concernant les cyclooxygénases (COX): leur structure, leur rôle, leur localisation tissulaire, ainsi que la similitude structurelle entre la cyclooxygénase 1 et 2. Le troisième chapitre (partie pratique) détaille le matériel utilisé pour obtenir les structures des cibles étudiées à partir de la Protein Data Bank, ainsi que celles des ligands provenant de la base de données Natural Product Activity and Species Source. Ce chapitre décrit également le protocole de docking moléculaire effectué à l'aide du logiciel AutoDock Vina, suivi d'une analyse et d'une discussion des résultats obtenus au cours de cette étude. Enfin, les résultats essentiels sont exposés et une discussion est menée. A la fin, une conclusion générale résume l'ensemble du travail réalisé.

CHAPITRE I

Docking moléculaire

I. Introduction

Le docking moléculaire *in silico* vise à prédire la structure d'un complexe moléculaire à partir des molécules isolées, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation des méthodes expérimentales *in vitro*. Les logiciels de docking sont donc des outils très utiles en biologie, pharmacie et médecine, car la plupart des principes actifs sont de petites molécules (ligands) qui interagissent avec une cible biologique d'intérêt thérapeutique, généralement protéique (récepteur), afin d'influencer le mécanisme dans lequel cette protéine est impliquée [1].

1. Le docking Moléculaire

C'est une méthode *in silico* qui permet d'étudier les interactions entre des biomolécules et de prédire la structure d'un complexe formé par un ligand et son récepteur [2]. Cette méthode implique la simulation des différentes interactions moléculaires entre les deux entités biologiques, en utilisant des approches informatiques et des algorithmes sophistiqués pour déterminer les conformations les plus stables et les plus énergétiquement favorables pour le complexe ligand-récepteur, **Figure 01**.

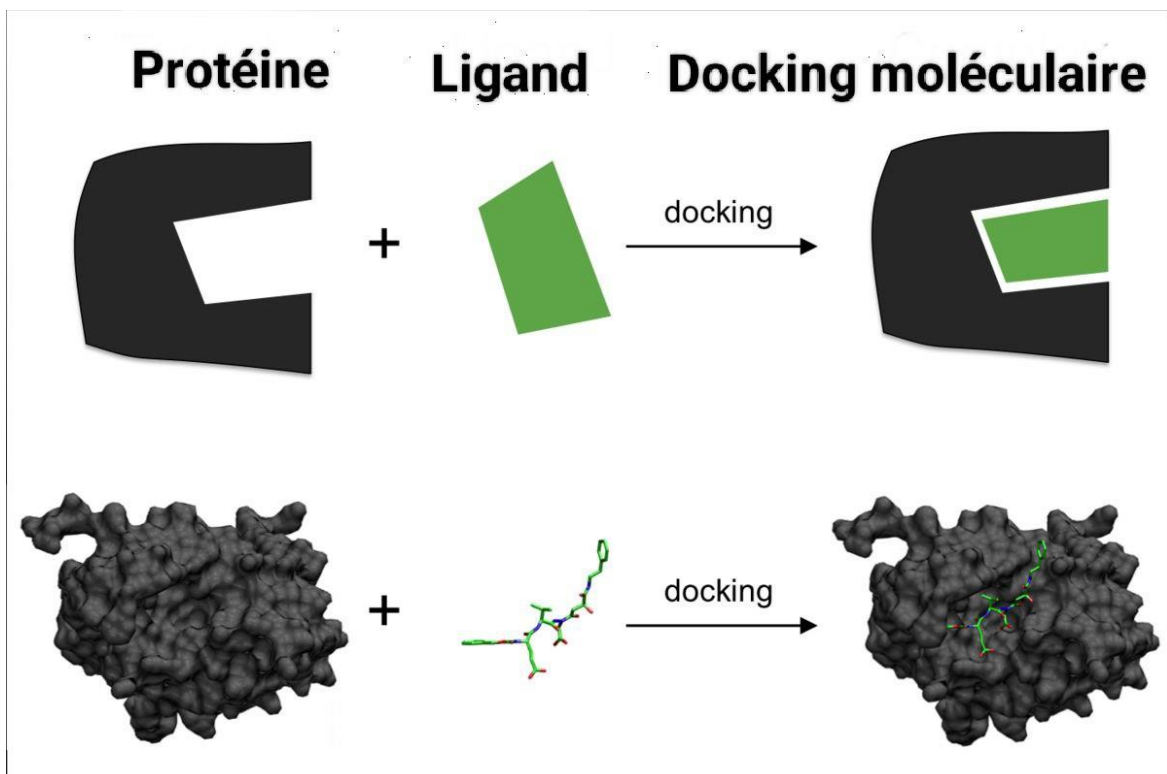


Figure 01 : Représentation schématique du docking moléculaire.

2. Principe

Tout programme de docking repose sur la réalisation de deux étapes principales : la première (searching) et la seconde (scoring). L'étape de docking implique la sélection de la conformation la plus favorable et de l'orientation relative du ligand au sein de son récepteur, en plaçant le ligand dans le site actif de la protéine et en évaluant les conformations, positions et orientations possibles. Cette étape est automatisée à l'aide d'algorithmes de docking qui améliorent la vitesse et la précision des simulations [3]. L'étape de scoring consiste à classer les poses obtenues lors du docking en estimant mathématiquement l'affinité entre le ligand et la protéine [4]. Cette tâche est réalisée par des fonctions de score qui estiment les différentes contributions énergétiques pour la stabilisation du complexe protéine-ligand et ordonnent les complexes pour identifier les interactions les plus favorables [5-6], la **Figure 02** ci-dessous représente les étapes du docking moléculaire.



Figure 02 : Représentation schématique des étapes du docking moléculaire [7].

3. Types de docking moléculaire

Il existe plusieurs types de docking en fonction de la prise en compte de la flexibilité du ligand.

Le docking rigide, où les récepteurs et les petites molécules sont traités comme ennuyeux, tandis que le docking flexible prend en compte la flexibilité du ligand en effectuant deux étapes : l'exploration de l'espace conformationnel et l'évaluation des conformations proposées [8]. Le docking semi-flexible est utilisé pour les molécules très flexibles, et utilise des

algorithmes de fragmentation pour construire le ligand de façon incrémentielle dans le site actif de la protéine [9].

4. Algorithme de docking

Les algorithmes ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association récepteur-ligand les plus favorables. La prédiction de la conformation du ligand dans le site actif de la protéine est le plus grand défi du design des drogues basé sur la structure [10-11].

Il existe trois types d'algorithmes pour le traitement de la flexibilité du ligand :

4.1. Méthodes systématiques

Le principe général est de couper le ligand en fragments rigides et flexibles. Dans un premier lieu, un ou plusieurs fragments qui doivent être rigides sont placés au sein du site actif et donc mis en interaction avec la cible, puis le ligand est reconstruit en plaçant les fragments flexibles d'une manière successive tout en exploitant les angles de torsion [12].

4.2. Méthode stochastique (génétique)

L'approche stochastique est plus précise, à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand considéré dans son entier explore le site actif étudié par la répétition successive des mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur [13].

4.3. Méthodes de Simulation

Les méthodes de simulation sont basées sur la résolution des équations du mouvement de Newton. Elles comprennent notamment les techniques de dynamique moléculaire et des algorithmes de minimization [14].

5. Fonctions de scores

Les fonctions de score peuvent être classées dans quatre grandes catégories:

5.1. Les fonctions de scoring empiriques

Les termes représentant chacun des types d'interactions connues dans le complexe (liaison hydrogène, contact hydrophobe, interaction ionique et parfois les contributions entropiques) sont additionnées. La plupart des programmes de docking implémentent ce type de fonction de score témoignant de leur efficacité en termes de rapport précision/rapidité [15].

5.2. Fonctions de score basées sur les champs de force

Les fonctions de score basées sur un champ de force qui est une fonction mathématique exprimant l'énergie d'un système par la somme de divers termes issus de la mécanique moléculaire. L'utilisation de champ de force permet de calculer l'énergie d'interaction du complexe récepteur-ligand et l'énergie interne du ligand. Les interactions entre récepteur et ligand comprennent souvent des termes de Van der Waals et électrostatiques [16-17]. Les fonctions de score qui se basent sur les champs de force les plus rigoureux comme AMBER [18-19], CHARMM [20-21].

5.3. Fonctions de score basées sur la connaissance « knowledge-based »

Ces fonctions proviennent de l'analyse des structures tridimensionnelles des complexes ligand-protéine déterminés de manière expérimentale. Des règles définissant la géométrie préférentielle des interactions sont déduites de ces structures grâce à des moyens statistiques [22]. Ces fonctions statistiques permettent d'établir une corrélation entre l'état thermodynamique du complexe protéine-ligand qui forme un système et la probabilité de trouver ce complexe dans un état microscopique donné. Ainsi les fréquences sont converties en enthalpie libre (énergie) grâce à une distribution de Boltzmann, les potentiels sont donc nommés potentiels de force.

5.4. Fonctions de score consensus

Les fonctions de score consensus [23-24], combinent les informations obtenues à partir des différents scores, afin de compenser les erreurs des fonctions de score individuelles. Plusieurs études ont montré que ces fonctions performant le calcul des énergies libres des complexes et ainsi les interactions protéine-ligand mieux que les fonctions individuelles [25-26]. Un exemple de fonction de score consensus est X-CSCORE [27], qui combine un PMF [28-29] et ChemScore [30].

6. Les outils de docking moléculaire

6.1. Récepteurs

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) [31-32].

6.2. Ligand

La structure des ligands est obtenue par deux moyens :

1. Consiste à utiliser des ligands du PDB ou de la littérature avec possibilité de les reproduire par dessin optimiser et enregistrer dans différents formats (pdb, mol, mol2....) grâce à des logiciels de construction moléculaires tels que Titan.
2. Consiste à utiliser des collections de molécules virtuelles commerciales, constituées de bases de données de structures chimiques appelées chimiothèques ou espaces chimiques dont la plus utilisée est PubChem [33].

6.3. Programmes de docking

Dans le domaine de docking moléculaire, plusieurs logiciels ont été utilisés pour étudier les différentes interactions et les conformations les plus favorables du ligand au sein de son récepteur. Actuellement, un grand nombre de logiciels de Docking moléculaire sont disponibles tels que: GOLD, AUTODOCK, AUTODOCK VINA, FLEXX, SURFLEX, MOLEGRO VIRTUAL DOCKER, UCSF CHIMERA [34-35], les principaux programmes de docking moléculaire sont illustrés dans **Tableau 01**.

Tableau 01 : Adresses des principaux programmes de docking moléculaire [36].

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

L'AutoDock : est un programme utilisé pour le docking protéine-ligand. Il s'agit d'un ensemble de procédures, dont le but de prédire l'interaction de petites molécules, telles que des médicaments candidats « ligand » ou des substrats à un récepteur dont la structure 3D est connue.

Les distributions actuelles d'AutoDock se composent de deux générations de logiciels : AutoDock 4 et AutoDock Vina [37].

AutoDock Vina est un nouveau programme de docking moléculaire et le criblage virtuel, ce logiciel a été développé pour augmenter la vitesse d'exécution tout en conservant des résultats de haute qualité, voire meilleurs que son prédécesseur AutoDock 4 [38-39]. Conçu et mis en œuvre par le Dr Oleg Trott du Scripps Research Institute [39], AutoDock Vina calcule les grilles atomiques nécessaires en interne, ce qui élimine la nécessité de pré-calculer les cartes de grille pour chaque type d'atome et accélère le processus.

❖ L'algorithme de positionnement des ligands de Vina est un algorithme d'optimisation locale de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) [38].

❖ Pour l'estimation de l'affinité ligand-récepteur, Vina utilise une fonction de score empirique qui s'inspire de la fonction X-score [39] et comme cette dernière, elle a été calibrée sur "PDBbind" [38], une base de données qui regroupe les valeurs d'affinités expérimentales dont les structures des complexes sont connues dans la PDB [38].

7. Criblage Virtuel

Le criblage virtuel est une approche théorique permettant de simuler l'activité biologique d'un très grand nombre de ligand pour ne sélectionner que les meilleurs. Cette approche est désormais largement utilisée lors des premières phases de conception d'un nouveau médicament. Le criblage virtuel peut être divisé en deux méthodes selon la disponibilité d'informations structurales.

Le criblage virtuel basée sur la structure de la cible « Structure-based » et le criblage virtuel basé sur la structure des ligands « Ligand-based » [40-41].

7.1. Les approches ligand-based

Sont souvent appliquées lorsque les informations structurales sur la protéine cible sont rares et analysent les propriétés biologiques et chimiques d'une panoplie de ligands. Ils comprennent des pharmacophores à base de ligand, des modèles de relation quantitative structure-activité (QSAR) ainsi que des calculs de similitude basés sur les propriétés physicochimiques et les formes moléculaires [42].

7.2. Les approches structure-based

Avec l'identification croissante des cibles biologiques et de leurs structures tridimensionnelles, les approches structure-based sont devenues plus populaires. Elles consistent à estimer la complémentarité structurale de chaque molécule criblée avec le site

actif considéré [41-42]. Bien que ces deux approches soient surtout utilisées de manière exclusive, leur combinaison lors du criblage permet de maximiser les chances de succès pour identifier de nouvelles touches "hits" [40-42], (Voir la **Figure 03**).

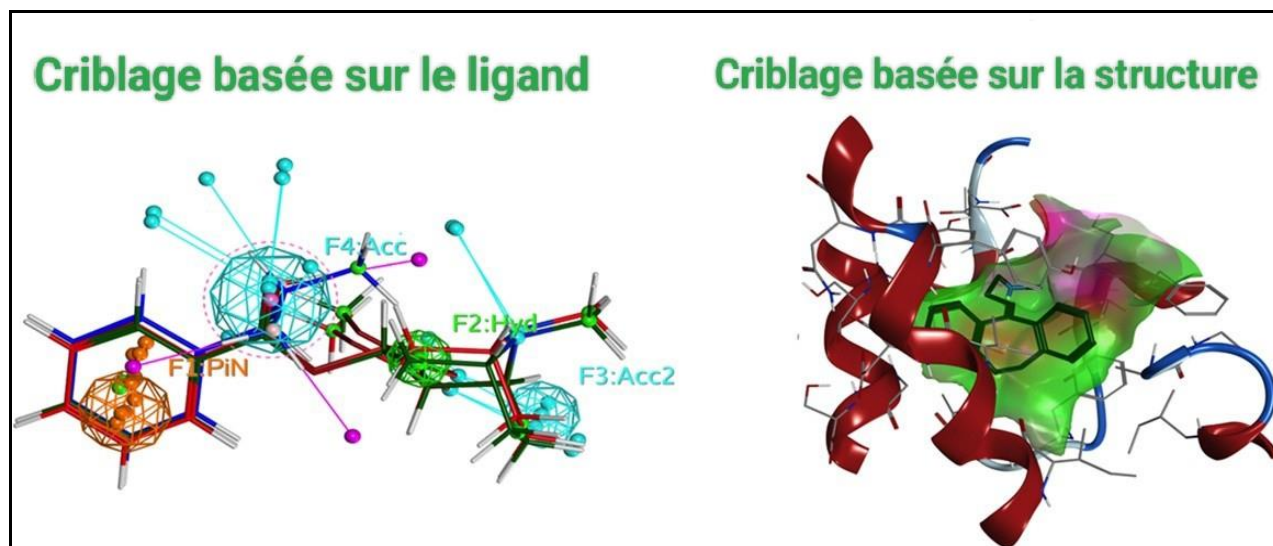


Figure 03 : Illustration schématique des approches ligand-based et structure-based.

CHAPITRE II

Les cyclooxygénases

(COXs)

1. Cyclooxygénases

La cyclooxygénase (COX), membre de la famille des peroxydases de l'hème de type animal officiellement connue sous le nom de prostaglandine-endoperoxyde synthase (PTGS). C'est elle qui est responsable de la formation de prostanoïdes, y compris le thromboxane et les prostaglandines qui sont responsables de la réponse inflammatoire à partir de l'acide arachidonique. La réaction spécifique catalysée est la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ via un agent à courte durée de vie intermédiaire prostaglandine G₂ [43-44]. La COX est connue comme une enzyme limitante car elle sert de voie principale ou de clé pour la formation de ces prostanoïdes, mais elle n'est pas entièrement mauvaise, elle est même nécessaire aux processus cellulaires normaux. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) agissent sur la COX pour réduire l'inflammation [45], bien qu'ils le fassent souvent avec succès, certains peuvent nier certains des effets positifs de COX dans leurs efforts.

2. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des COX

2-1. La Cyclo-Oxygénase-1 (COX-1)

La COX-1 humaine, composée de 576 acides aminés (72 Kilo daltons), est codée par un gène qui se situe sur le chromosome 9. Elle est constitutivement exprimée dans la majorité des cellules et des tissus, notamment dans l'appareil digestif, les reins et les plaquettes sanguines. On la retrouve dans l'estomac, les plaquettes, le foie, les poumons, l'intestin, le système nerveux central de l'humain, du rat, et de chien. La COX-1 est localisée principalement dans le réticulum endoplasmique et dans l'enveloppe nucléaire des cellules endothéliales [46]. La **Figure 04** ci-dessous présente la structure de COX-1.

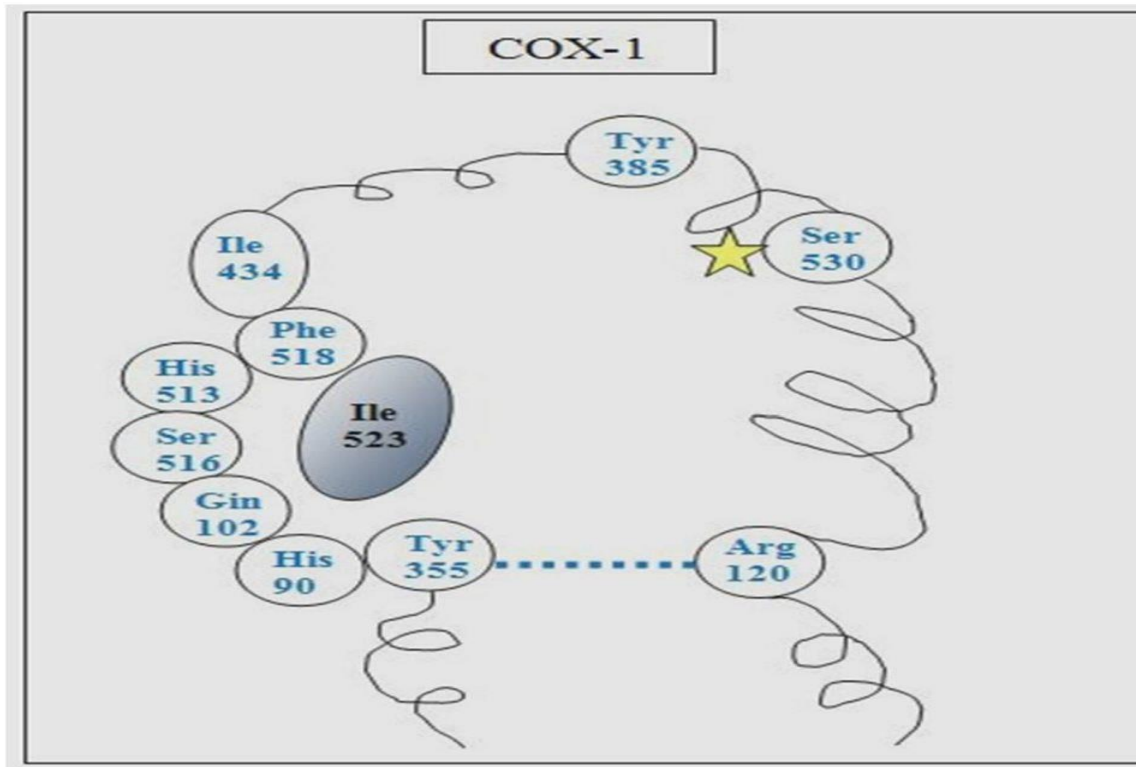


Figure 04 : Structure de la Cyclooxygénase-1.

2-2. La Cyclo-Oxygénase-2 (COX-2)

Elle a été découverte en 1991, la COX-2 humaine est composée de 581 acides aminés (74 Kilo daltons) dont la séquence est homologue à 60% environ à celle de la COX-1. Codée par un gène qui se situe sur le chromosome 1, la COX-2 est une enzyme principalement inductible. Cependant, elle est constitutivement exprimée dans certains tissus tels que le cerveau et le rein. Cette enzyme se retrouve dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans les feuillettes internes et externes de l'enveloppe nucléaire des monocytes, des cellules endothéliales et des fibroblastes. Cependant, COX-2 préfère se localiser dans l'enveloppe nucléaire où son activité est plus importante [47]. La **Figure 05** ci-dessous présente la structure de COX-2.

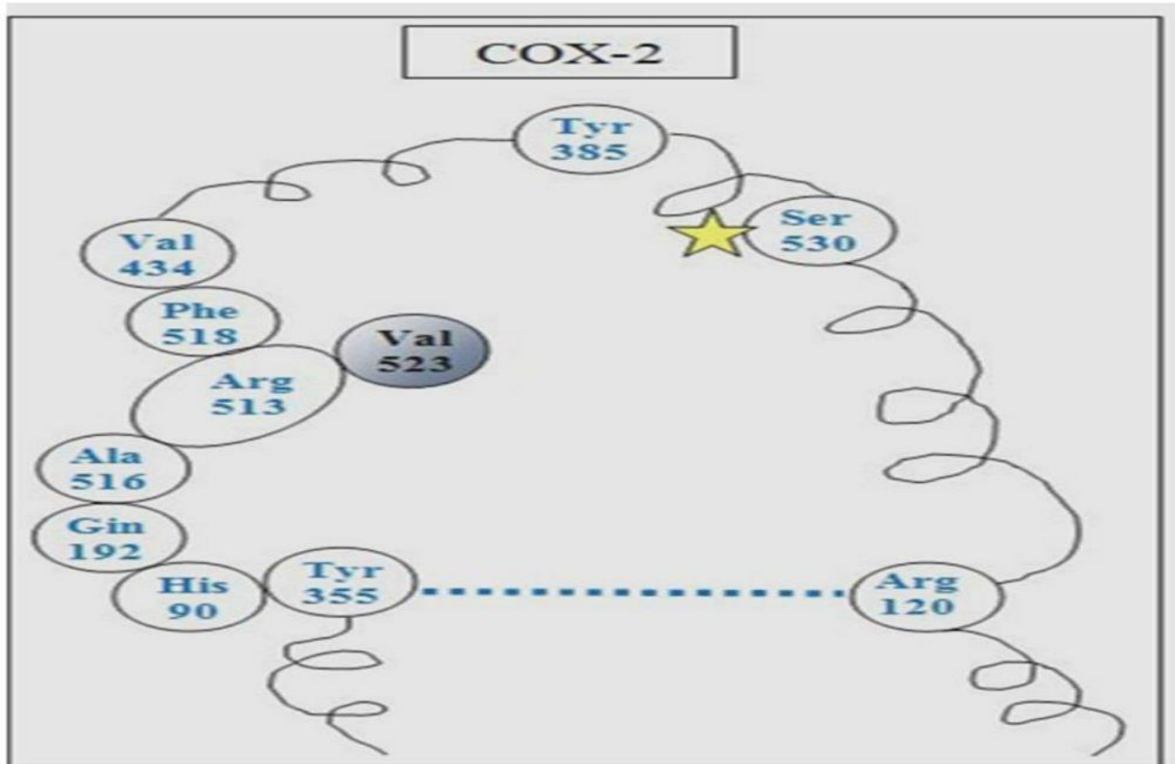


Figure 05 : Structure de la Cyclooxygénase-2.

3. Rôle de la cyclooxygénase dans l'inflammation

L'inflammation est définie comme l'ensemble des modifications vasculaires, tissulaires et produites chez les êtres pluricellulaires par toute atteinte à leur intégrité tissulaire. Des stimuli pro-inflammatoires peuvent induire la COX-2 [48].

La COX-2 permet la synthèse de PGs et la surexpression de la COX-2 augmente considérablement le niveau de PGs dans plusieurs types de cancers. Il est démontré que la PGE2 produite dans plusieurs types de cancers inhibe la prolifération cellulaire des cellules B et T du système immunitaire et la synthèse des cytokines du système immunitaire en plus de diminuer l'activité cytotoxique des cellules NK. Cet effet antiprolifératif contribue à la suppression du système immunitaire associée aux PGs. La PGE2 inhibe la production de TNF- α et induit FIL-10, qui ont des effets immunosuppresseurs [49]. Les PGs produites suite à la surexpression de la COX-2 permettent ainsi aux cellules transformées de déjouer la surveillance immunitaire.

4. Les différences entre COX-1 et COX-2

4-1. Expression dans les tissus

La COX-1 est exprimée de manière ubiquitaire et constitutive dans les tissus et les cellules de mammifères, tandis que la COX-2 est hautement inductible et est généralement présente dans les tissus de mammifères à des niveaux très faibles, à moins qu'elle ne soit augmentée par l'un des nombreux types de stimuli tels que les cytokines et les facteurs de croissance.

Les deux COX sont largement situés du côté luminal de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et de l'enveloppe nucléaire, bien qu'ils aient également été détectés dans certaines situations dans les corps lipidiques, les mitochondries, les structures filamenteuses, les vésicules et dans le noyau [50-51].

4-2. Fonctions et implications pathologiques

La COX-1, présente de manière ubiquitaire, a un rôle de « ménage » dans l'organisme, étant impliquée dans l'homéostasie tissulaire, et elle semble être responsable de la production des prostaglandines impliquées dans la cytoprotection gastrique, l'agrégation plaquettaire, le flux sanguin rénal. L'autorégulation et le déclenchement de la parturition, au maintien de l'intégrité de la muqueuse gastrique, à la production de prostaglandines anti-thrombogéniques PGI₂ dans les cellules endothéliales ainsi qu'à la régulation du flot sanguin aux reins par la production de prostaglandine vasoactive PGE₂ [52-53].

La forme inductible de la COX est la principale responsable de la formation de PGs lors de l'inflammation. Les LPS et les cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 α et l'IL-1 β permettent l'induction de la COX-2, qui synthétise alors des PGs pro-inflammatoires [54]. L'IL-1 α induit l'expression de la cPLA et mobilise l'acide arachidonique, le substrat de la COX-2. En plus d'être la responsable de la synthèse de PGs associées à la douleur et à la fièvre [55], la COX-2 est aussi impliquée dans le développement du système cardiovasculaire [56], l'arthrite rhumatoïde, la reproduction chez la femelle [57], la maladie d'Alzheimer [58], certaines fonctions immunologiques, la régulation de la croissance cellulaire [59], l'angiogenèse [60], l'apoptose [61] et la prolifération, la croissance des cellules normales et cancéreuses [62]. Les différences entre COX-1 et COX-2 sont illustrés dans le **Tableau 02**.

Tableau 02 : Différences Cyclooxygénase-1 / Cyclooxygénase-2 [63].

	COX-1	COX-2
Similitude structurelle	Seulement 60% d'homologie dans la séquence d'acides aminés (COX-1 et COX-2 sont codées par des gènes différents). Le site actif de COX-2 est plus grand que celui de COX-1.	
Régulation	Présence physiologique, multiplication possible de la concentration par un facteur deux à quatre.	Formation induite lors d'inflammation (synthèse multipliée par 10 à 80 en cas de stimulation appropriée : inflammation, hormones)
Expression	Constitutive	Induite
Nom du gene	PTGS1	PTGS2
Localisation du gene	Chr.9 (9q33.2)	Chr.1 (1q31.1)
Poids moléculaire	71kDa	72kDa
Nombre d'acide amine	576	604
Localisation tissulaire	Présente dans la plupart des tissus, surtout abondante dans les thrombocytes, les cellules endothéliales, l'estomac, les reins et les muscles lisses.	Présence : -Physiologique dans la prostate, l'utérus, les testicules et les poumons. -dans tous les tissus après induction
Fonction de l'enzyme	Production de prostaglandines à fonctions protectrices, régulant le fonctionnement rénal, la fonction digestive et la coagulation sanguine.	Activée par une inflammation qu'elle aggrave par la production de prostaglandines pro inflammatoires, mais, rôle physiologique non négligeable pour le maintien de diverses

		fonctions vitales.
--	--	--------------------

5. Site actif des COX

L'enzyme cyclooxygénase possède deux sites actifs : un site COX permettant de catalyser une réaction de cyclo-oxygénation et un site POX (peroxydase) permettant de catalyser une réaction de réduction. Ces deux sites sont localisés sur des côtés opposés du domaine catalytique. Ces zones sont constituées de trois acides aminés, ARG120, GLU524 et TYR355 qui établissent un véritable réseau de liaisons hydrogène[64].

5-1. Site actif des COX-1

Le domaine catalytique est constitué d'un long canal hydrophobe relativement étroit (dimensions : $25 \times 8 \text{ \AA}^2$). Divers acides aminés participent au fonctionnement de l'enzyme, soit par effet électronique, soit par effet stérique :

- L'Arginine 120, située à l'entrée du site actif, possède une chaîne latérale porteuse d'une fonction guanidine, facilement protonable. La charge cationique joue un rôle clé dans l'ancrage du substrat naturel de l'enzyme (interaction électrostatique avec le groupement carboxylate de l'acide arachidonique).
- La Tyrosine 385, située à l'autre extrémité du site, participe à l'activité cyclooxygénase en provoquant l'arrachement stéréospécifique de l'atome d'hydrogène en position 13 de l'AA.
- La Sérine 530, au niveau de la partie centrale du site actif, intervient par sa chaîne latérale à fonction alcool. Ce résidu polaire impose une certaine courbure à la molécule d'AA, nécessaire à l'action de l'enzyme sur son substrat.
- L'Isoleucine 523 est responsable d'un effet stérique en raison de sa chaîne latérale isobutyle. Ce motif ramifié génère une zone d'étranglement dans la partie centrale du site catalytique de la COX-1[65], **Figure 06**.

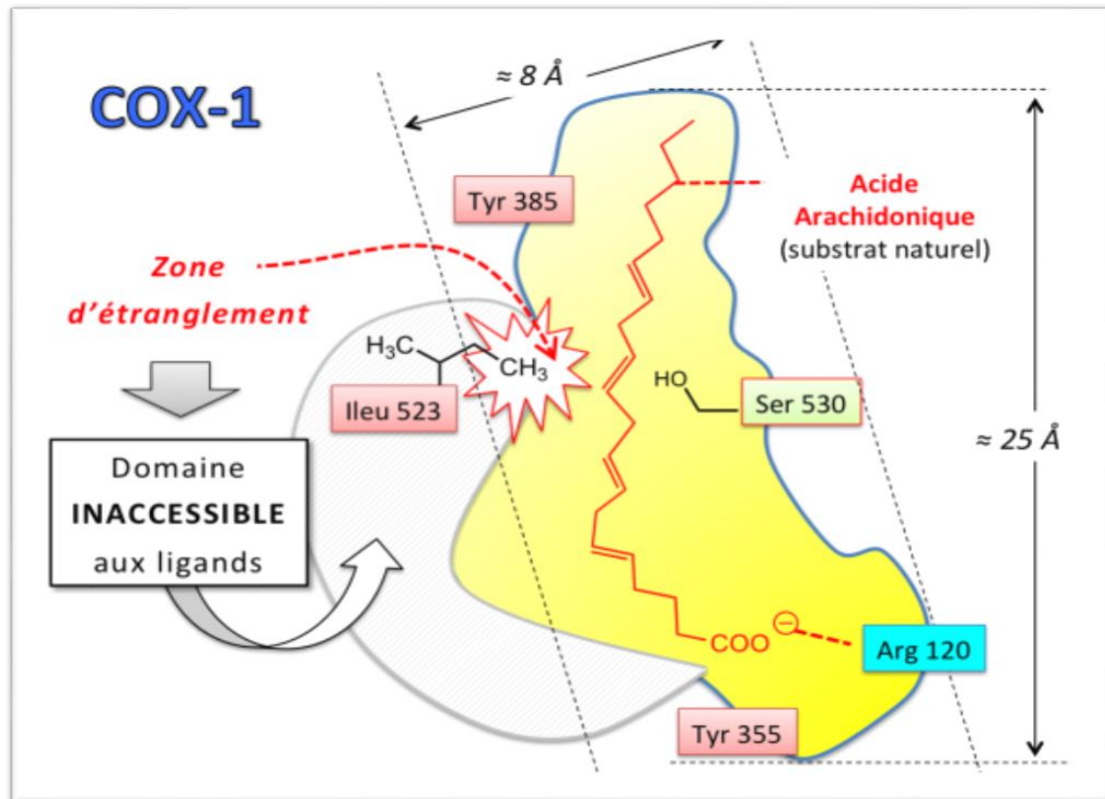


Figure 06 : Représentation du site actif de la COX-1.

5-2. Site actif des COX-2

Les deux isoformes (COX-1 et COX-2) ont une homologie de l'ordre de 61%. Les acides aminés essentiels à la fixation du substrat (Arg120) ou à la réaction d'oxygénation (Tyr385) sont également retrouvés dans la COX-2. Toutefois, des remplacements ponctuels de certains résidus vont entraîner des modifications d'ordre stérique au niveau du site enzymatique :

- Le site actif COX-2 est dépourvu de l'isoleucine 523 et possède à la place une Valine dont le groupement isopropyle est plus petit par rapport à l'isobutyle. La perte d'un groupe CH₃ permet de diminuer l'encombrement stérique : il se crée un passage vers une poche latérale qui devient alors accessible à des molécules relativement volumineuses.
- Cette poche latérale se distingue par certains résidus à caractère polaire : Arginine (Arg.), Glutamine (Gln), Histidine (His) [65], **Figure 07**.

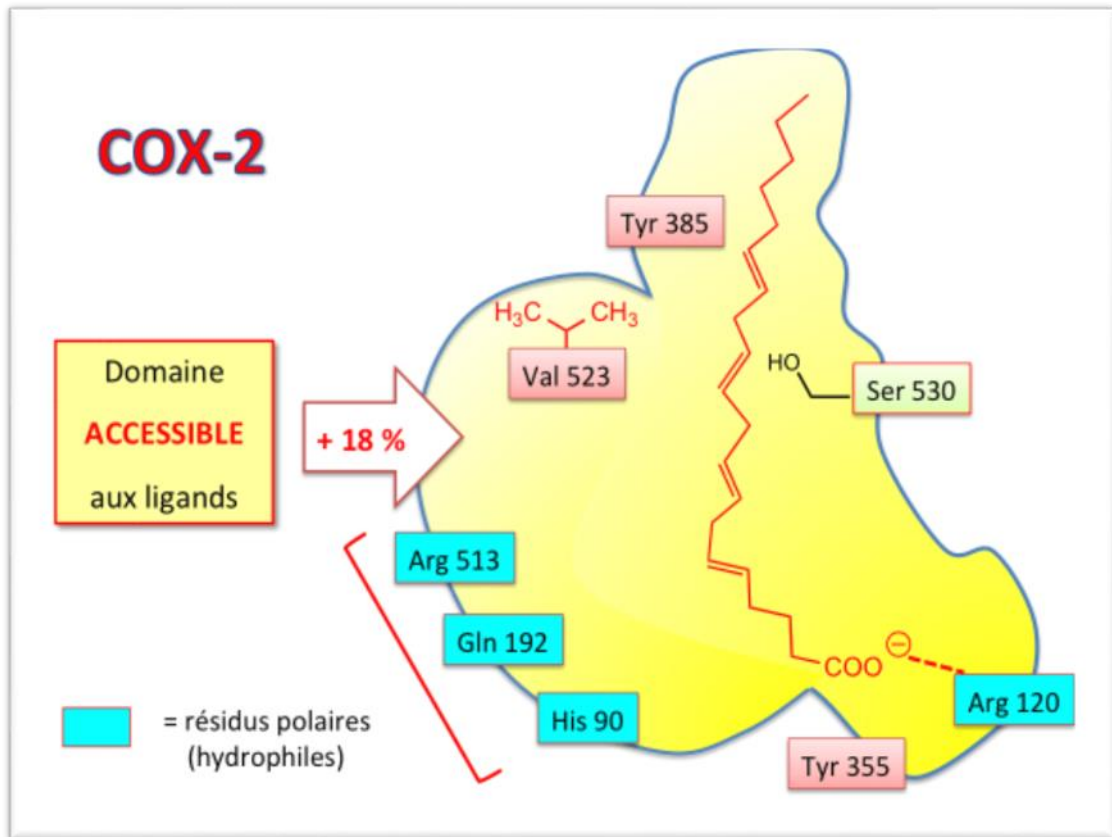


Figure 07 : Représentation du site actif de la COX-2.

6. Inhibiteurs de COX-2

Les inhibiteurs de COX-2 peuvent être séparés en trois catégories. Il y a tout d'abord les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques qui sont capables d'inhiber l'activité de COX-1 et de COX-2. Puis, il y a les inhibiteurs spécifiques de COX-2, qui n'inhibent que l'activité de COX-2. Enfin, il y a le nimésulide et le méloxicam qui sont souvent désignés comme inhibiteurs préférentiels de COX-2 en raison de leur capacité à inhiber COX-1 mais que pour les plus fortes posologies recommandées [66]. Les inhibiteurs spécifique de la cyclooxygénase sont mentionnées dans le **Tableau 03**.

Tableau 03 : Classification des inhibiteurs spécifiques de la cyclooxygénase.

AINS	Inhibiteurs spécifiques de COX-2	Inhibiteurs préférentiels de COX-2
Aspirine	Célécoxib	Meloxicam
Indométhacine	Cay10404	Nimé-sulide
Ibuprofène	Rofécoxib	
Sulindac sulphone	Valdécoxib	
Nabumétone	SC-236	
Sulindac sulphide	N5-398	
Naproxéne	DUP679	
Piroxicam		

6-1. Propriétés pharmacologiques et utilisations clinique

Les inhibiteurs de la COX-2 ciblent la douleur et l'inflammation avec moins d'effets secondaires gastro-intestinaux. Ils ne semblent pas non plus affecter les plaquettes comme le font les AINS non sélectifs, ce qui signifie que les inhibiteurs de la COX-2 peuvent ne pas augmenter autant le risque de saignement que les inhibiteurs de la COX-1 lorsqu'ils sont utilisés avec des anticoagulants, comme la warfarine. Votre fournisseur de soins de santé peut vous prescrire un inhibiteur de la COX-2 au lieu d'un AINS traditionnel si vous avez besoin à la fois d'un soulagement de l'inflammation et de la douleur, si vous prenez des anticoagulants et/ou si vous avez eu des ulcères ou des saignements gastro-intestinaux ou si vous êtes à risque de ces problèmes. Si vous avez simplement besoin d'un soulagement de la douleur, le Tylenol peut être envisagé à la place [67].

6-2. Limitations et effets secondaires

On a constaté que les inhibiteurs de la COX-2 augmentaient le risque d'athérombose même en cas d'utilisation à court terme. Une analyse de 2006 de 138 essais randomisés [68], a montré que les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 sont associés à un risque modérément accru d'événements vasculaires, principalement en raison d'un doublement du

risque d' infarctus du myocarde et aussi que les régimes à forte dose de certains AINS traditionnels (tels que le diclofénac et l'ibuprofène , mais pas le naproxène) sont associés à une augmentation similaire du risque d'événements vasculaires. Il a été démontré aussi que l'inhibition de la COX-2 à l'aide de célécoxib réduit l'expression immunosuppressive du TGFβ dans les hépatocytes atténuant l'EMT dans le carcinome hépatocellulaire humain [69]. (Voir **Figure 08**).

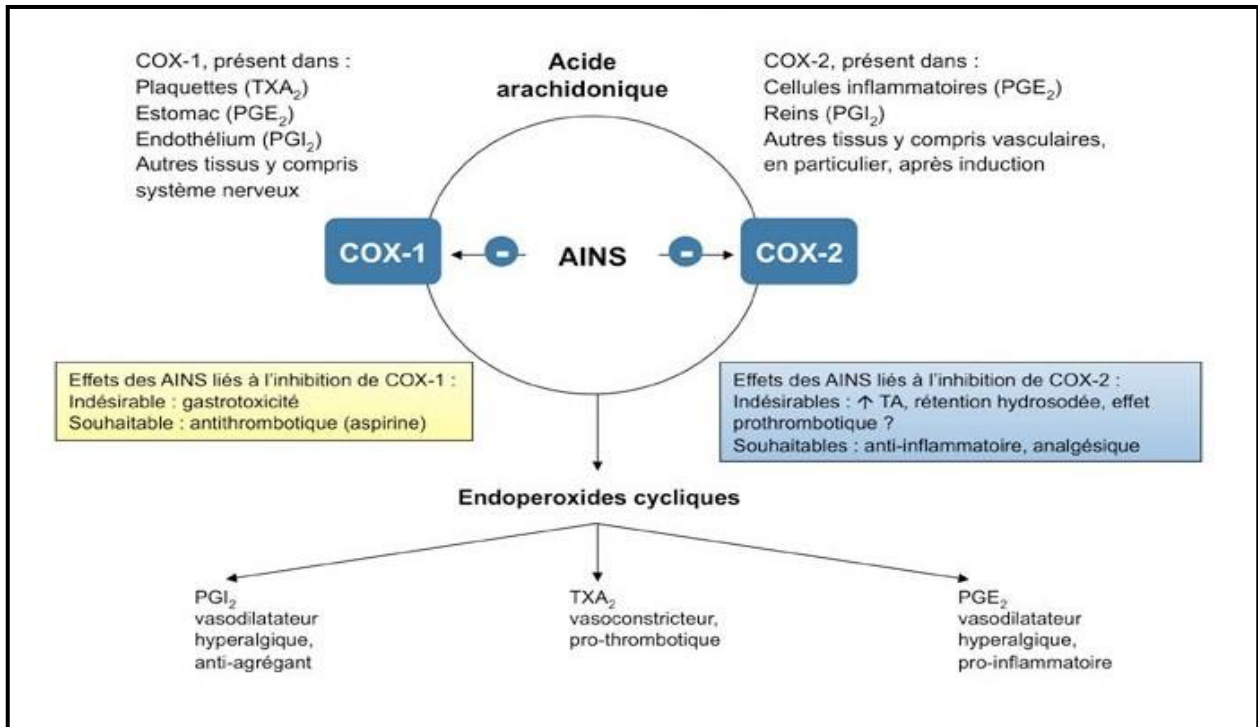


Figure 08 : Synthèse des prostaglandines et inhibition par AINS.

7. La NPASS (Natural Product Activity and Species Source)

La base de données NPASS est une ressource précieuse pour la recherche sur les produits naturels, fournissant des informations sur l'activité, les sources d'espèces et le contenu de ces produits. Elle contient plus de 446 000 enregistrements d'activité quantitative, associés à plus de 222 000 paires de produits naturels-cibles et 288 000 paires de produits naturels-espèces. Les utilisateurs peuvent accéder gratuitement à NPASS et effectuer des recherches en utilisant des mots-clés, des propriétés physico-chimiques, des similitudes structurales, des espèces et des cibles spécifiques.

La base de données compte actuellement plus de 35 000 produits naturels provenant de plus de 25 000 espèces et ciblant plus de 5 800 cibles différentes. Ces produits naturels sont classés en 18 super-classes chimiques distinctes, et les espèces sources appartiennent principalement aux royaumes des viridiplantae, des métazoaires, des champignons et des bactéries.

Bien que NPASS soit une ressource précieuse, il existe un potentiel d'amélioration en augmentant la couverture des données sur l'activité, les sources d'espèces et le contenu pour une plus grande variété de produits naturels et d'espèces. De nombreux produits naturels n'ont pas encore de données d'activité expérimentales disponibles.

La préparation de la base de données implique plusieurs étapes, notamment le téléchargement des molécules et leur conversion en format 2D. Ensuite, les structures chimiques 3D sont générées pour chaque composé en utilisant des logiciels spécialisés, et les structures sont optimisées géométriquement. Les charges atomiques partielles sont également calculées. Les doublons sont éliminés en se basant sur l'InChIKey. Les fichiers préparés de NPASS sont disponibles sur le site www.compchem.net/cc [70-72].

Chapitre III

Matériels et méthodes

I. Introduction

Ce chapitre se concentre sur une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction entre la cyclooxygénase 2 et différents composés issus du criblage virtuel de la base de données NPASS. Nous avons examiné attentivement ces interactions afin de mieux appréhender le rôle de la COX2 dans notre étude. Nous serons en mesure de proposer de nouveaux inhibiteurs de la COX2 qui pourraient être utilisés dans des applications thérapeutiques.

II. Matériels et méthodes

II.1. Matériels

Les outils utilisés pour réaliser la partie pratique sont :

1. Logiciels

- **Chimera** <https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>

Programme pour la visualisation et l'analyse interactives des structures moléculaires et des données associées, y compris les cartes de densité, les trajectoires et les alignements de séquences.

- **Accelrys Discovery Studio** <https://accelrys-discovery-studio.updatestar.com/fr>

Permet de visualiser et de modifier des structures moléculaires, des séquences et des alignements de séquences et des scripts Perl créés avec Discovery Studio et d'autres applications.

- **Auto Dock Tools** <https://autodock.scripps.edu/>

- **AutoDock Vina** <https://vina.scripps.edu/>

Non-commercial d'un programme d'amarrage d'un ligand à une protéine cible, outil précis et rapide.

- **PyRx** <https://pyrx.sourceforge.io/>

Logiciel de criblage virtuel pour la découverte des médicaments par ordinateur qui peut être utilisé pour cribler des bibliothèques de composés par rapport à des cibles médicamenteuses.

2. Banques de données

2.1. Protein Data Bank (PDB)

Les structures des protéines utilisées, ont été téléchargées sous forme PDB à partir de la base de données Protein Data Bank (<http://www.pdb.org>).

Cette dernière nous a proposé plusieurs structures cristallographiques 3D, parmi lesquelles nous avons choisi le code 5IKR, c'est une structure qui est résolue à 2.34 Å, sans mutation et

son ligand de référence est l'acide 2-[(2,3-diméthylphényl) amino] benzoïque (ID8), **Figure 09**.

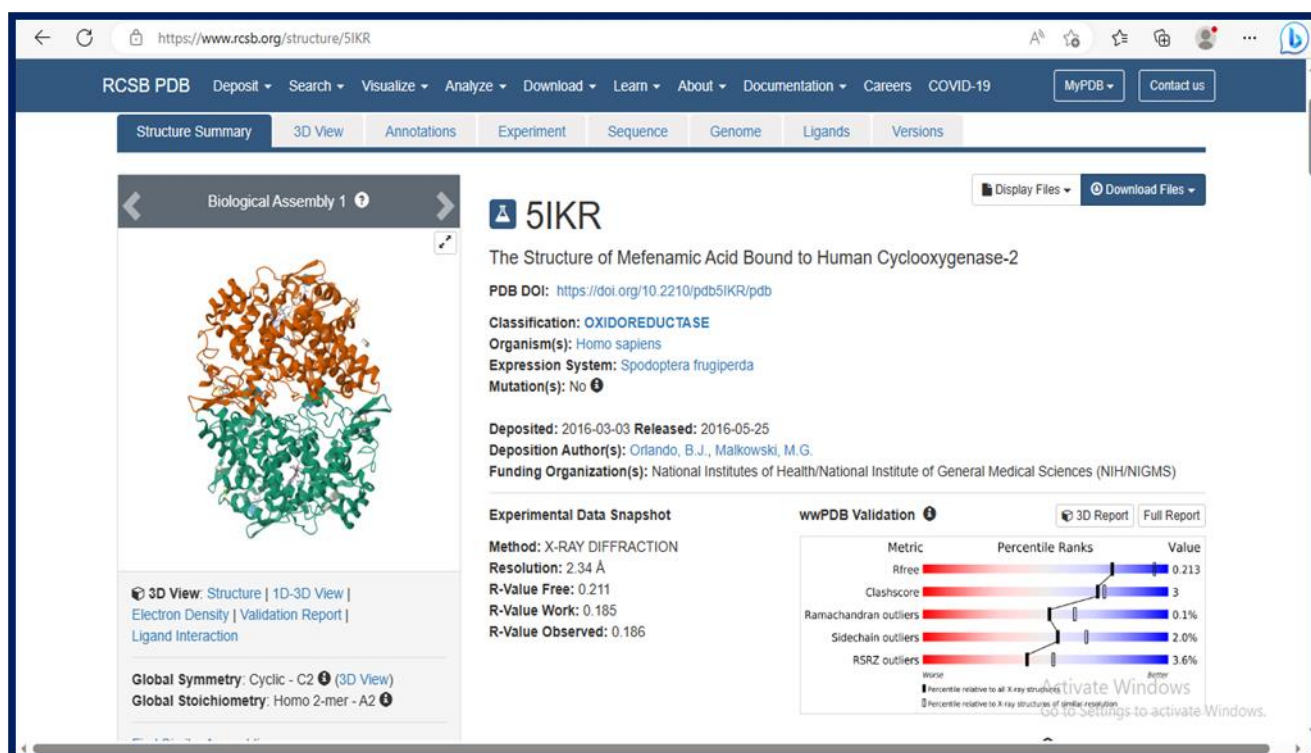


Figure 09 : Informations relatives à la protéine « 5IKR ».

2.2. Natural Product Activity and Species Source (NPASS)

Les structures des ligands étudiés ont été téléchargés sous format sdf de la banque de donnée NPASS (<https://bidd.group/NPASS/downloadnpass.html>), version 2018, elle est librement accessible avec un total de 35 032 de produits naturels uniques.

II. 2. Méthodes

1. Test de fiabilité du programme

Avant d'aborder l'étude de l'inhibition de la cyclooxygénase 2, pour valider le protocole suivi on a jugé utile d'évaluer tout d'abord la performance de l'Auto dock vina 1.5.6 en faisant appel à deux tests de fiabilité, l'écart quadratique moyen ou le RMSD (Root Mean Square Deviation) et l'analyse visuelle.

1.1. Test du RMSD

La fiabilité d'un programme de docking est évaluée en termes de sa capacité à reproduire les complexes protéine-ligand déterminés expérimentalement. La valeur de déviation quadratique moyenne ou RMSD (Root Mean Square Deviation) entre la conformation et l'orientation du ligand déterminée par le programme de docking et sa pose

dans le complexe expérimental ne doit pas dépasser les 2 angströms, au-delà de laquelle la prédiction est considérée comme non adéquate [73].

Le test RMSD a été réalisé sur 100 complexes disponibles dans la PDB. Les codes PDB des complexes et de leurs ligands ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus sont mentionnés dans l'**Annexe 01**.

1.2. L'analyse visuelle

L'analyse visuelle est une étape essentielle pour confirmer les résultats du test par RMSD. Elle permet de montrer si la pose simulée d'un ligand se superpose avec celle de Co cristallisation. Ce test conforte d'avantage la conclusion tirée suite au test de fiabilité par RMSD et confirme la performance du logiciel choisi.

2. Criblage virtuel

Les étapes de criblage sont :

2.1. Préparation de la protéine

La structure 5IKR contient quatre chaînes, seule une chaîne a été gardée. Le ligand de Co cristallisation (ID8) est séparé de son complexe via Autodock tools (ADT), les charges atomiques de type gasteiger et les atomes d'hydrogènes sont additionnées. La structure est ainsi sauvegardée en format PDBQT.

2.2. Préparation de ligand

15000 ligands de la NPASS ont été importés et convertis en format PDBQT grâce à Open Babel intégré dans le PyRx qui permet aussi la minimisation de l'énergie des ligands. Vu que les capacités du ordinateur, on a devisé cette 15000 ligands par 1000 ligands .

2.3. Génération de la grille tridimensionnelle (grid box)

Une grille tridimensionnelle a été définie à partir du ligand de référence, avec un volume de 28 \AA^3 . Le centre de la grille a été déterminé par les coordonnées $X = 38.042$, $Y = 2.131$ et $Z = 61.280$.

Chapitre IV

Résultats et discussions

I. Résultat et discussions

I.1. Validation de protocole de docking

1. Test RMSD

La **Figure 10** ci-dessous présente les résultats du test de déviation quadratique moyenne (RMSD) du modèle conçu par le logiciel vis-à-vis de la structure du cristal ne dépasse pas 2Å dans la plupart des complexes ligand-protéines. Ces résultats sont exprimés en pourcentage (%). Sur un total de 100 modèles testés, 80 d'entre eux ont montré une RMSD inférieure à 2, tandis que les 20 autres modèles ont affiché une RMSD supérieure à 2.

Ces résultats fournissent des informations essentielles sur la fiabilité du logiciel utilisé dans notre étude de docking moléculaire et nous aident à évaluer la validité des modèles générés pour l'analyse des interactions entre la cyclooxygénase 2 et les ligands étudiés.

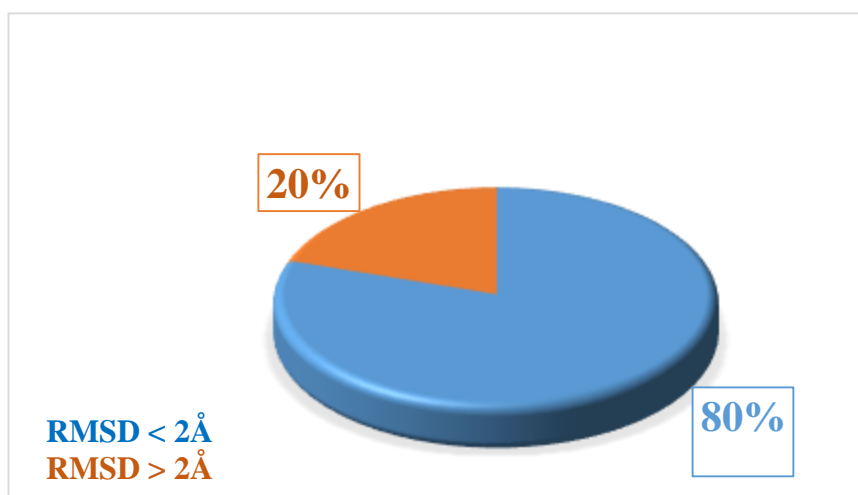


Figure 10 : Diagramme circulaire représente le pourcentage des RMSD obtenus par AutoDock Vina.

2. Analyse visuelle

Les résultats de docking de quelques complexes ayant une RMSD inférieure à 2Å, sont illustrés dans la **Figure 11**. L'analyse visuelle montre la superposition géométrique du ligand simulé (couleur vert) avec le ligand co-cristallisé (couleur bleu).

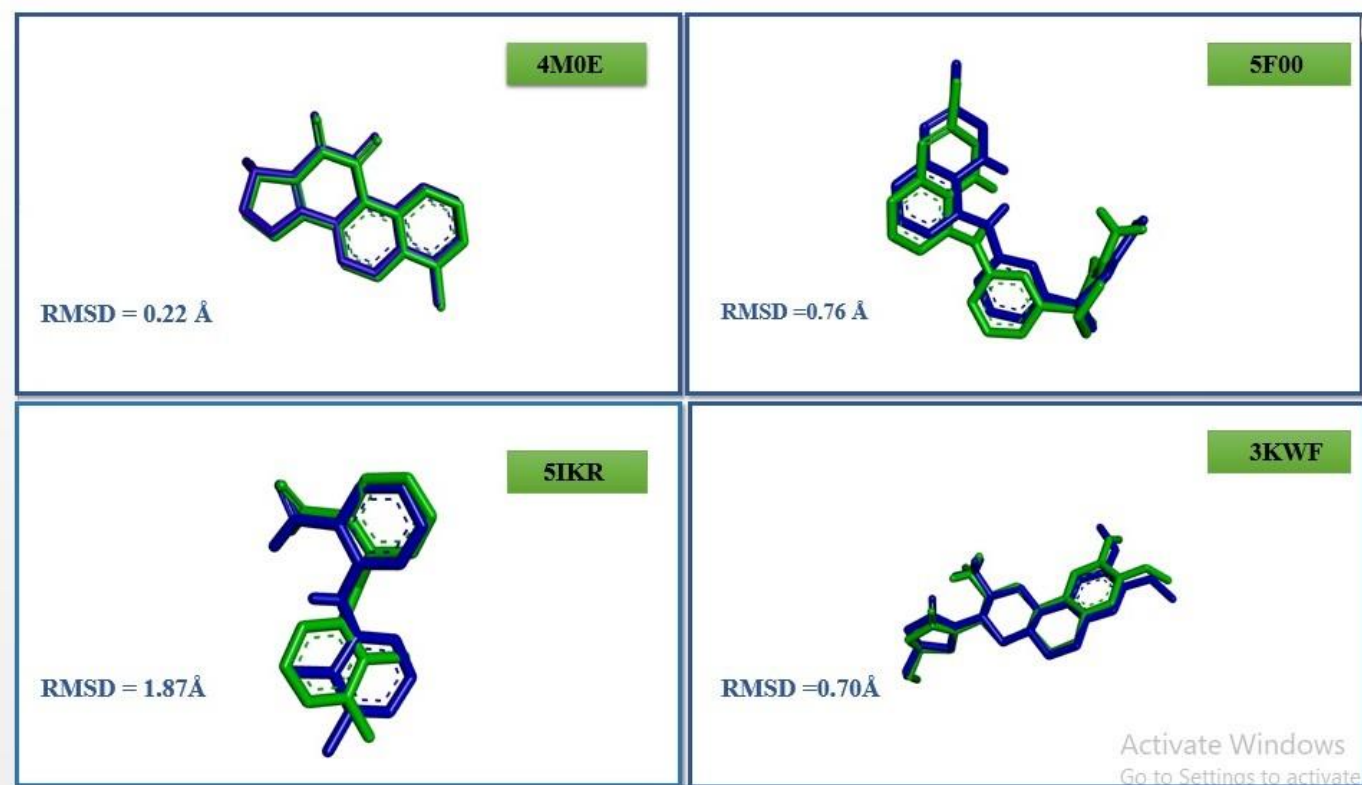


Figure 11 : Superposition de la conformation cristalline (coloré en bleu) et celle simulée par Vina (coloré en vert).

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que le programme “Vina“ est suffisamment performant puisqu’ils reproduisent assez bien les résultats expérimentaux et capable de retrouver la pose cristallisée avec un bon RMSD.

I.2. Criblage virtuel

À la suite du test de RMSD, la structure sélectionnée, 5IKR, a révélé une valeur de RMSD égale à 1.87 Å, ainsi qu’une affinité de -9.1 Kcal/mol. Parmi les 87 produits testés (**Annexe 02**), qui ont tous montré des affinités supérieures à celle du ligand de référence, seuls les résultats présentant une affinité inférieure à -10 kcal/mol ont été pris en compte. Ce filtrage a conduit à l’identification de 10 produits naturels prometteurs, qui sont répertoriés dans le **Tableau 04**.

Tableau 04 : Résultats d'affinité des 10 meilleurs ligands avec le 5IKR.

ID	Formule brute	Affinité (kcal/mol)
Ligand (ID8)	C ₁₅ H ₁₅ NO ₂	-9.1
NPC473178	C ₄₁ H ₃₃ N ₃ O ₃	-12.4
NPC473177	C ₄₂ H ₃₅ N ₃ O ₄	-11.7
NPC471943	C ₁₈ H ₁₀ N ₂ O ₂	-11.1
NPC472060	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₀	-10.9
NPC71372	C ₂₇ H ₂₂ N ₂ O ₂	-10.9
NPC472052	C ₃₀ H ₂₆ O ₄	-10.8
NPC473189	C ₃₂ H ₂₂ O ₁₀	-10.4
NPC473185	C ₂₇ H ₂₂ N ₂ O ₂	-10.4
NPC79372	C ₂₆ H ₃₆ O ₄	-10.1
NPC473181	C ₂₇ H ₂₂ N ₂ O	-10.0

La vérification de l'orientation au sein du site actif a été effectuée en se basant sur une recherche documentaire portant sur la cyclooxygénase 2 (COX2) ainsi que sur l'analyse de sa structure cristalline. Cette recherche a permis de mettre en évidence les résidus Arg120, Ser530, Tyr355, Tyr385, Ala527, Val349, Leu352, Leu531 et Trp387 présents dans le site actif de la COX2.

Ces résidus jouent un rôle crucial dans l'interaction de la COX2 avec ses ligands et sont impliqués dans la catalyse de la réaction enzymatique. Par conséquent, leur orientation et leur positionnement précis sont essentiels pour assurer une interaction efficace entre la COX2 et les composés étudiés. L'identification de ces résidus clés dans le site actif de la COX2 permet de mieux comprendre les mécanismes d'interaction entre la protéine et les ligands, et de guider la conception de nouveaux inhibiteurs de la COX2 avec une plus grande spécificité et une plus grande affinité. Les interactions les plus significatives en termes de liaisons

hydrogènes et d'interactions hydrophobes ainsi que les affinités des complexes étudiés ligand@cox-2 sont mentionnées dans le **Tableau 05**, et leur structures dans la **Figure 12**.

Tableau 05 : Types d'interaction et acides aminés impliqués dans l'inhibition du COX2 (5IKR) avec le ligand co-cristallisé.

Liaisons	Affinité (kcal/mol)	Liaisons hydrogènes	Liaisons hydrophobes
Ligands		Résidues/acides aminés	Résidues/acides aminés
ID8	-9.1	SER530, TYR385	ALA 527, LEU 352, LEU 531, VAL 349
NPC473178	-12.4	ARG120, SER530, TYR 355	ALA111, ALA 527(3), GLY526(3), ILE112(4), LEU93(2), LEU 352(3), PHE518, TYR115, TYR348, VAL89(2), VAL116(2), VAL349(3), VAL523
NPC473177	-11.7	PHE470, SER 530	ALA527(3), GLY526(3), LEU93(2), LEU123(2), LEU352(3), LYS83(2), MET471(3), PHE 518, TYR115, TYR348, VAL89(2), VAL116(2), VAL349(3), VAL523
NPC471943	-11.1	SER 530	VAL349(3), LEU352(3), LEU359, LEU531(2), VAL523, ALA527(3), MET522, PHE518, GLY526(2)
NPC472060	-10.9	ARG120, GLU524, ILE112	ALA111(2), LEU93, VAL 89(2) VAL116,
NPC71372	-10.9		ALA111, ILE112, LEU93(2), LYS83, TYR115, VAL89(3), VAL116
NPC472052	-10.8	ARG120, ILE112(2)	ALA111, LEU93, LEU108, PHE357, TYR115, TYR355, VAL89(3), VAL116(2)
NPC473189	-10.4	ARG120, TYR355	ALA527(3), GLY526(2), LEU93(2), LEU352(2), LEU531, ILE 112, TYR 115, VAL89(2), VAL116(2), VAL349(2), VAL523
NPC473185	-10.4		ILE92, ILE112, LEU93, TRP100, TYR355, VAL89(2), VAL116(2)
NPC79372	-10.1	LYS83	ARG120(2), LEU93, TYR115, VAL89, VAL115
NPC473181	-10.0	ARG120	ILE92, LEU93(2), TRP100(3), TYR115, TYR355, VAL89, VAL ₂₆ 116(3),

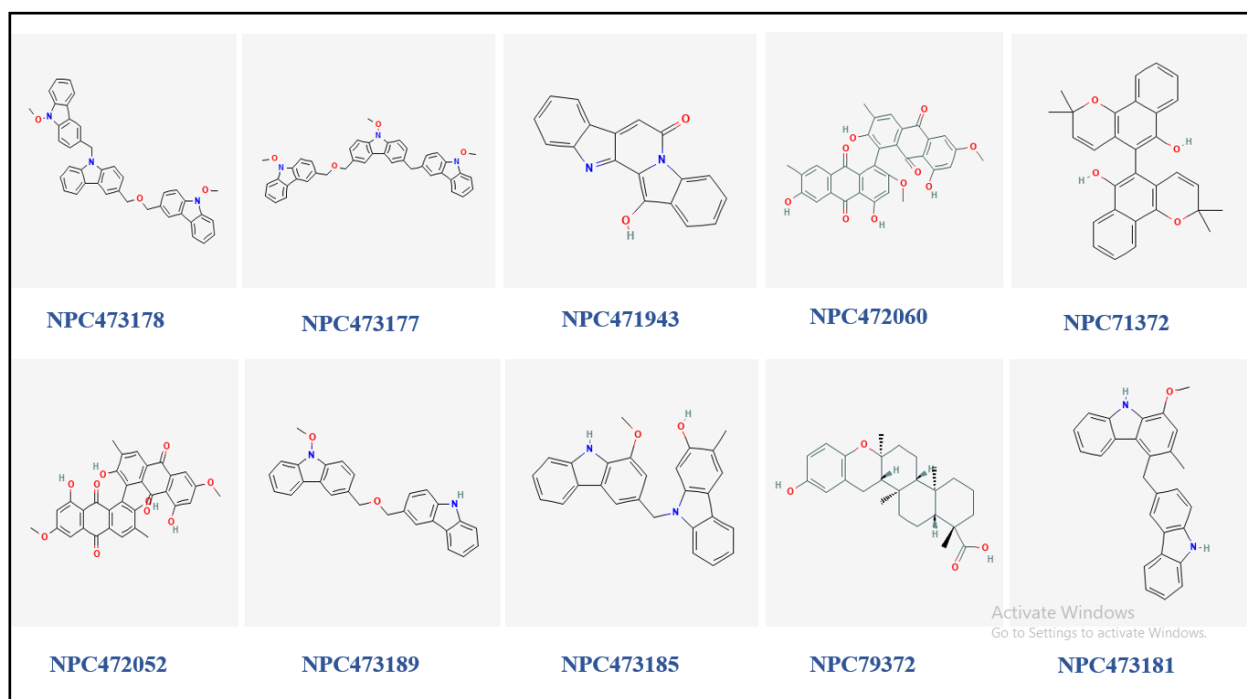


Figure 12 : Les structures des 10 composés obtenues après criblage par le PyRx.

1. Interaction protéine-ligand co-cristallisé

Après la visualisation des interactions de ce composé au sein du site actif de la **COX2 (5IKR)**, On observe que :

Le ligand établit deux liaisons hydrogènes, La première liaison d'interaction avec le TYR385, et la deuxième liaison avec le SER530 et des interactions hydrophobes avec VAL349, ALA527, LEU352, LEU531, (Voir la **Figure 13**).

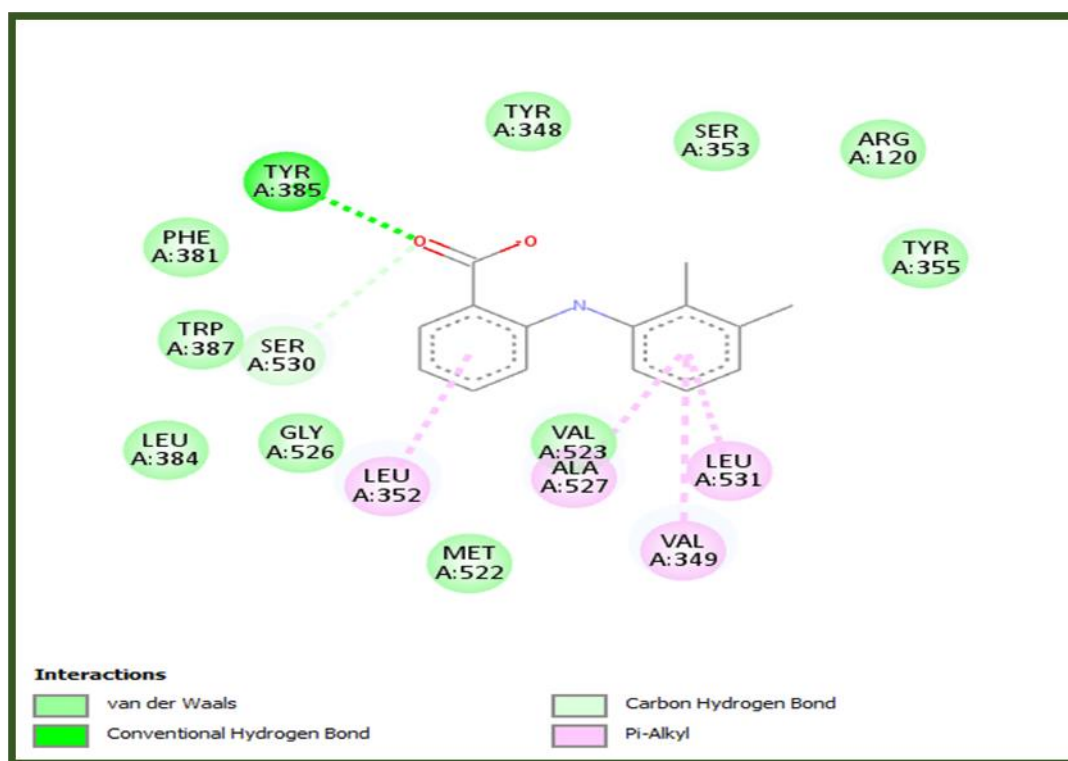


Figure 13 : Interactions entre le ligand co-cristallisé et les résidus de site actif de **5IKR**.

2. Analyse du mode d'interaction des complexes

Dans notre étude, nous avons obtenu les résultats du criblage virtuel par docking moléculaire des dix molécules, traduisant les interactions entre les ligands et la protéine exprimées par le type et le nombre de liaisons. D'après le **Tableau 02**, nous avons constaté la formation de différentes liaisons non-covalentes qui sont présentées ci-dessous :

- **Le composé NPC473178 :**

La **Figure 14** ci-dessous présente les interactions de composé **NPC473178** qui montre la présence de quatre liaisons similaires avec le complexe 5IKR dont l'affinité s'évalue à

(-12.4 kcal/mol) :

- Trois interactions de liaison hydrogène avec SER 530, ARG120, SER530, TYR355.
- Trois interactions hydrophobes avec VAL349, LEU352, ALA527.

Et d'autres interactions :

- Interactions hydrophobes avec ALA 111, ILE 112, VAL 116, VAL 89, LEU 93, TYR 115, GLY 526, PHE 518.

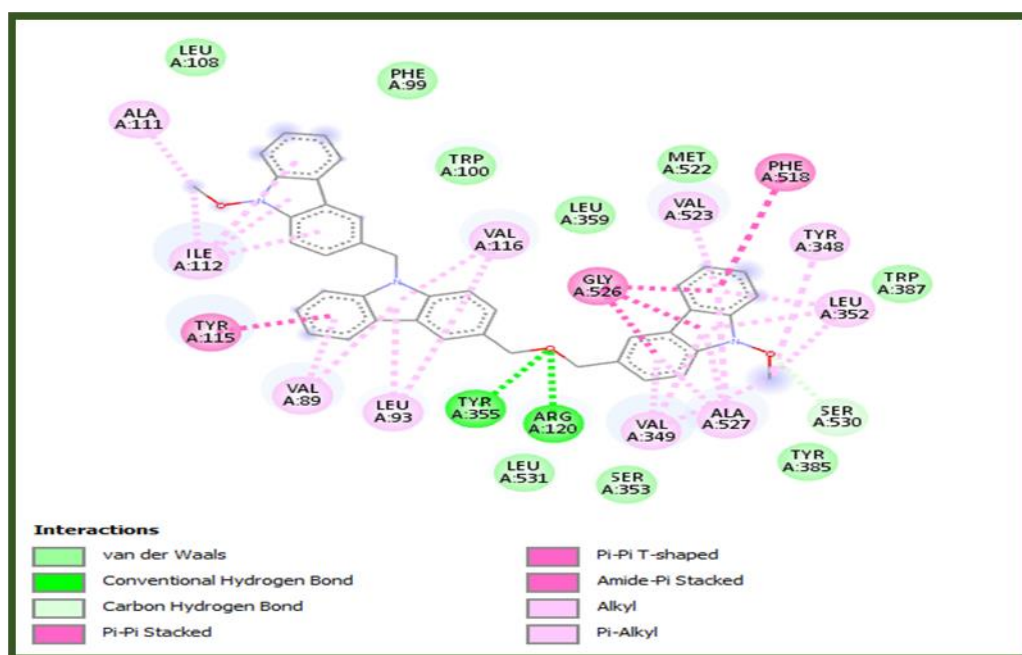


Figure 14 : Interactions entre le composé **NPC473178** et les résidus de site actif de 5IKR.

- **Le composé NPC473177 :**

Le composé **NPC473177** montre la présence de quatre liaisons similaires avec le complexe 5IKR dont l'affinité s'évalue à "-11.7 kcal/mol" (Voir la **Figure 15**) :

- Une seule interaction de liaison hydrogène SER 530.
- Trois interactions hydrophobes avec VAL349, ALA527, LEU352.

Et d'autres interactions :

Interactions de liaisons hydrogène PHE470.

Interactions hydrophobe avec VAL89, LEU93, VAL116, MET471, LEU123, TYR348, VAL523, PHE518, GLY526, TYR115, LYS83.

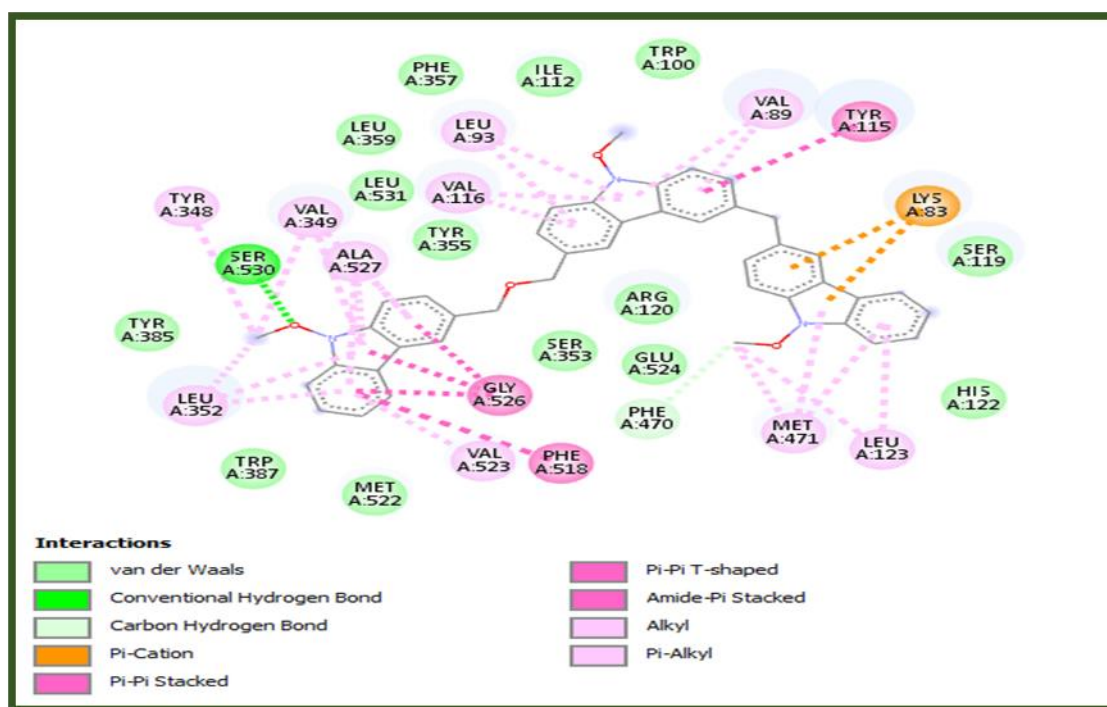


Figure 15 : Interactions entre le composé **NPC473177** et les résidus de site actif de 5IKR.

- **Le composé NPC471943 :**

Le composé **NPC471943** montre la présence de cinq liaisons similaires avec le complexe 5IKR dont l'affinité s'évalue à "-11.1" kcal/mol, **Figure 16 :**

- Une seule interaction de liaison hydrogène SER530
- Quatre interactions hydrophobes avec VAL349, LEU352, LEU531, ALA527.

Et d'autres interactions :

- Interactions de liaisons Pi-sulfur : MET522.
- Interactions Pi-Pi stacked avec PHE518, GLY526.

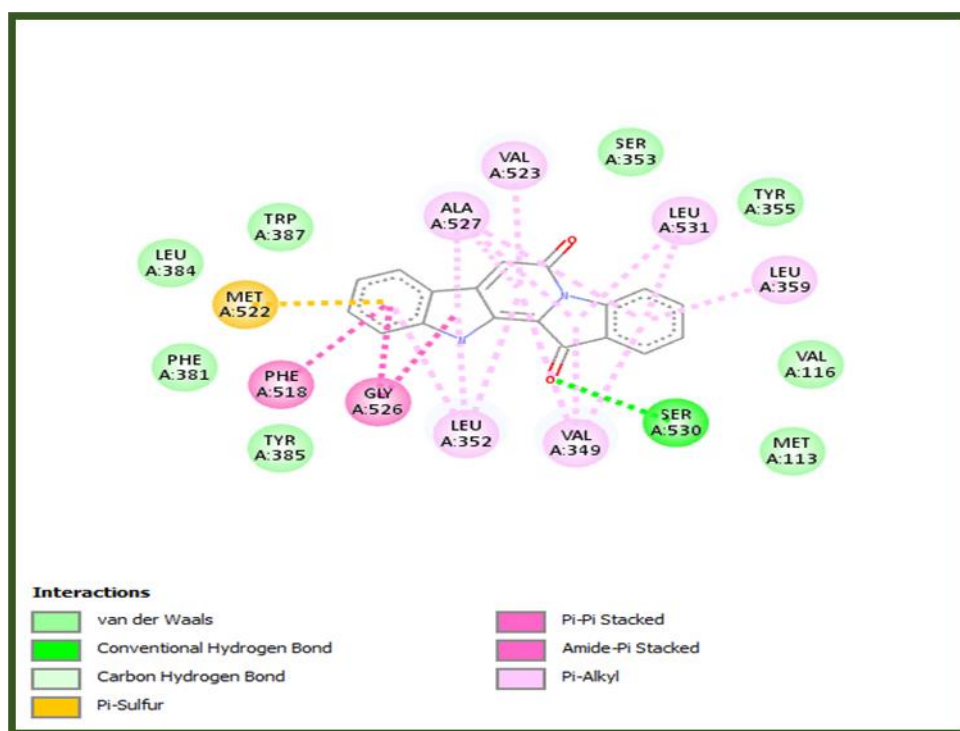


Figure 16 : Interactions entre le composé **NPC471943** et les résidus de site actif de 5IKR.

• **Le composé NPC473189 :**

La **Figure 17** ci-dessous présente les interactions de composé **NPC473189** qui montre la présence de six liaisons similaires avec le complexe 5IKR dont l'affinité s'évalue à "-10" kcal/mol :

- Deux interactions de liaison hydrogène avec ARG120, TYR355.
- Quatre interactions hydrophobes avec VAL349, LEU352, LEU531, ALA527.

Et d'autres interactions :

- Interactions de liaisons hydrogène ARG120,
- Interactions hydrophobes avec VAL89, ILE112, VAL523, LEU93, VAL116, TYR115, GLY526.

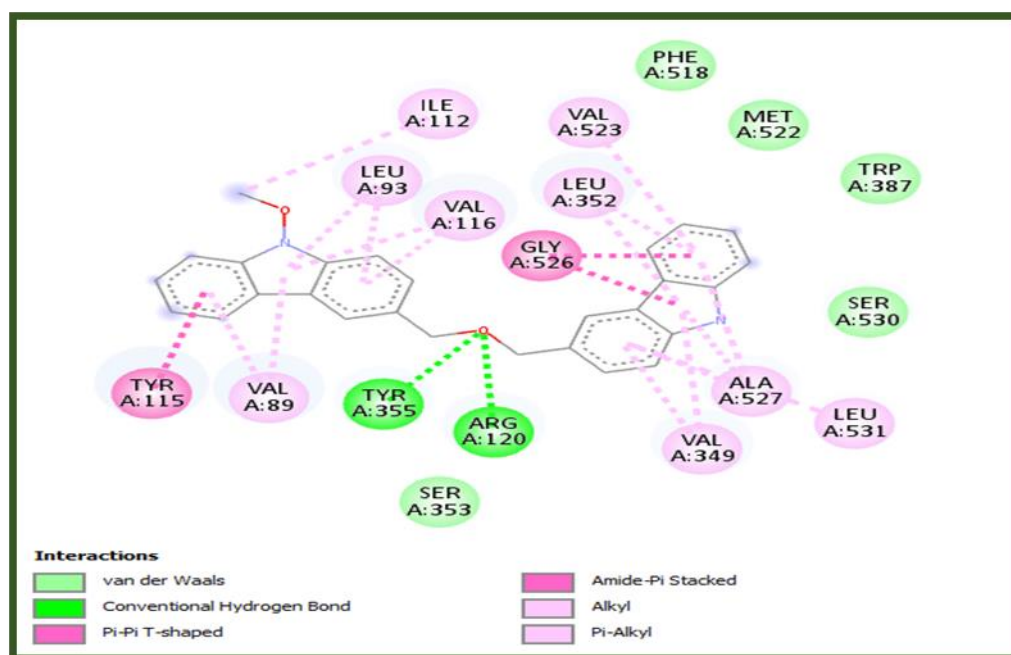


Figure 17 : Interactions entre le composé **NPC473189** et les résidus de site actif de 5IKR.

I.3. Les propriétés ADME

Nous avons prédit *in silico* les propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques de 10 composés de base de données NPASS à l'aide de serveur SwissADME qui joue un rôle important dans la filtration des molécules selon leur absorption, distribution, métabolisme, excrétion et toxicité au niveau du corps.

1. Propriétés physicochimiques

Les résultats obtenus indiquent que 7 composés d'NPASS répondent à tous les critères de la règle de cinq de Lipinski et la règle de Veber, ceci indique que ces composés peuvent être administrés par voie orale sans aucun problème. En effet, ils ont tous un poids moléculaire < 500 g/mol, et les valeurs de la surface polaire topologique (la polarité) TPSA < 140 Å² les plus basses donnent toujours de bons résultats, et le nombre de liaisons flexibles, d'accepteur et donneur d'hydrogène sont respectés pour tous les composés. En observant les valeurs de lipophilie (LogP) de nos composés, nous remarquons qu'ils ont tous des valeurs inférieures à 5 donc ils peuvent être facilement absorbés dans le corps.

D'autre part, les composés testés peuvent être facilement synthétisés car ils présentent des scores d'accessibilité synthétique (SA) qui sont compris entre 1 et 10 comme stipulé par [74]. Toutes nos molécules sont peu solubles dans le milieu aqueux ce qui rend leurs solubilités dans le sang un peu difficile, à l'exception le composé **NPC471943** est très soluble.

On peut observer que les composés **NPC473178**, **NPC473177**, **NPC472060** ne respectent pas les règles de Lipinski et Veber. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 06**.

Tableau 06 : Propriétés physicochimiques des 10 meilleurs composés à partir de serveur SwissADME.

Propriétés Ligand	PM (g/mol)	LF	HA	HD	Log P	TPSA Å ²	Solubilité dans l'eau	Accessibilité à la synthèse	Lipinski	veber
NPC473178	615.72	8	3	0	7.66	42.48	Peu soluble	4.02	Non	Oui
NPC473177	645.74	9	4	0	7.93	51.71	Insoluble	4.28	Non	Oui
NPC471943	286.28	0	2	1	2.77	54.34	Soluble	2.38	Oui	Oui
NPC472060	566.51	3	10	4	3.95	167.66	Peu Soluble	4.21	Oui	Non
NPC71372	450.53	1	4	2	5.94	58.92	Peu soluble	4.40	Oui	Oui
NPC472052	566.51	3	10	4	3.86	167.66	Peu soluble	4.17	Oui	Oui
NPC473189	406.48	5	2	1	5.28	39.18	Peu soluble	2.98	Oui	Oui
NPC473185	406.48	3	2	2	5.34	50.18	Peu soluble	2.74	Oui	Oui
NPC79372	412.56	1	4	2	4.93	66.76	Peu soluble	4.94	Oui	Oui
NPC473181	390.48	3	1	2	5.90	40.81	Peu soluble	2.77	Oui	Oui

2. Propriétés pharmacocinétiques

Lorsque le composé test absorbé par le système, il rencontre plusieurs barrières membranaires telles que des cellules épithéliales, gastro-intestinales, membrane hépatocytaire, paroi capillaire sanguine, organe restrictif barrières, glomérule et cible cellule. Une molécule est dite moins de peau permanent si la valeur de log K_p est plus négatif, d'après les résultats

ADME (**Tableau 06**), tous les composés sont moins pénétrant dans la peau a part les composés **NPC471943**, **NPC473189**, **NPC473185**.

L'absorption de la molécule dans l'intestin s'explique par le paramètre gastro-intestinal (GI), elle est élevée ce qui signifie que les composés **NPC471943**, **NPC71372**, **NPC473189**, **NPC473185**, **NPC79372** sont fortement absorbés dans l'intestin HIA. Tous les composés montrent une réponse négative pour Blood Brain Barrier (BBB) a l'exception de **NPC471943**, **NPC473189**, **NPC473185**.

Dans la famille des enzymes CYP, le CYP3A4 était le plus importante en raison de la métabolisation de 50% de tous médicaments et l'enzyme CYP2C9 métabolise principalement plusieurs médicaments utilisés en clinique. Donc dans les résultats des propriétés d'ADME le composé **NPC473189** a donné de bons résultats. Les résultats obtenus sont illustrés dans le, **Tableau 07**.

Tableau 07 : Propriétés pharmacocinétiques des 10 meilleurs composés à partir de serveur SwissADME.

Propriétés Composés	GI absorption	BBB perméabilité	CYP1A2 inhibition	CYP2C19 inhibition	CYP2C9 inhibition	CYP2D6 inhibition	CYP3A4 inhibition	Log Kp (cm /s)
NPC473178	Faible	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	-3.15cm/s
NPC473177	Faible	Non	Non	Non	Non	Non	Oui	-2.82cm/s
NPC471943	Elevée	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	-6.50cm/s
NPC472060	Faible	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-5.64cm/s
NPC71372	Elevée	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	-3.95cm/s
NPC472052	Faible	Non	Non	Oui	Oui	Non	Non	-5.64cm/s
NPC473189	Elevée	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	-4.27cm/s
NPC473185	Elevée	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	-4.25cm/s
NPC79372	Elevée	Non	Oui	Non	Oui	Non	Non	-4.31cm/s
NPC473181	Faible	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	-3.63cm/s

Conclusion

Conclusion

Ce travail a pour but d'évaluer le potentiel inhibiteur de molécules naturelles pour les enzymes par docking moléculaire, ce qui permet de modéliser et de mieux comprendre les interactions entre enzymes et inhibiteurs. L'objectif essentiel de notre travail est de proposer de nouveaux inhibiteurs potentiels du COX-2 (5IKR) contre l'inflammation. Pour cela, nous avons fait appel aux approches par docking moléculaire avec AutoDock Vina.

Au préalable, nous avons testé la performance du programme utilisé dans cette étude au moyen de deux critères différents. Le premier test consiste à calculer le RMSD entre la meilleure conformation du ligand à docker et celle déterminée expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB. Les calculs ont donné un RMSD parfaitement dans les normes (inférieur à 2 Å) pour 80% de ces complexes. L'analyse visuelle après le test RMSD a confirmé la fiabilité de la procédure en montrant une bonne superposition des modèles de ligand simulés et expérimentaux.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé un criblage virtuel « docking moléculaire) via l'AutoDock Vina intégrés dans PyRx sur 35032 composés de la banque de donnée NPASS, ce que nous a permis de sélectionner certains composés avec une bonne affinité que le ligand de référence (5IKR).

Les 10 composés obtenus après criblage ont une énergie de liaison variée entre -10 et -12.4. Ces ligands forment des complexes stables avec la cible COX-2 au sein de site actif de 5IKR, suggérant une inhibition sélective de ce dernier par des liaisons hydrogènes avec les acides aminés tels que : Arg120, Ser530, Tyr355, Tyr385, Ala527, Val349, Leu352, Leu531 et Trp387.

Bien que les résultats du docking aient révélé que les quatre composés NPC473178, NPC473177, NPC471993, NPC473189, se présentent comme des inhibiteurs de COX2 (PDB : 5KIR) en raison de leur similitudes des interactions majoritairement hydrogènes avec les résidus du site actif de 5IKR.

Dans un dernier temps, nous avons opté pour la prédiction des paramètres physicochimiques et pharmacocinétiques (ADME) de ces dix composés inhibiteurs de la protéine cible COX2. Les résultats de la prédiction des propriétés physicochimiques ont révélé que sept molécules présentent un bon profil ADME en répondant à la règle de Lipinski et celle de Veber. Le seul composé " NPC473189 " indique une bonne biodisponibilité par voie orale avec une facilité d'absorption ou de perméabilité dans le corps sans poser de

Conclusion

problèmes acceptables et peuvent se présenter comme meilleure candidat de COX-2 et développé comme un médicament anti-inflammatoires potentiel.

Les résultats théoriques obtenus *in silico* doivent ensuite être confirmés par des études expérimentales *in vitro* et/ou *in vivo*. Ces expériences visent à fournir de nouveaux inhibiteurs de la cyclooxygénase 2 pour la chimie de synthèse, permettant de réaliser ce travail de manière plus pratique et industrielle.

Références bibliographiques

- [1]: Grosdidier, A.; Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. **2007**.
- [2]: Thiriot, E.; Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. **2009**, 10-291.
- [3]: De Oliveira, E. B.; Simulations moléculaires appliquées à l'acétylation de flavonoïdes catalysée par des lipases : Influence des structures de la lipase et du flavonoïde et sur la régiosélectivité de la bioconversion. **2018**, 207.
- [4]: Elhadj said, K. ; Contribution à étude de l'inhibition d'enzyme par des tripodes pyrazoliques par modélisation moléculaire. **2016**.
- [5]: Quiroga, R.; Villarreal, M. A.; Vinardo: A scoring function based on autodock vina improves scoring, docking, and virtual screening. **2016**, 11(5), 1–18.
- [6]: Weidenhammer, E.; G. J.; "An overview of molecular genetics," *Mol. Diagnostics Clin.* **2005**, 4, 259–266.
- [7]: Merzoug, A.; Recherche de nouvelles molécules bioactives par criblage virtuel et applications à l'inhibition de la peptide déformylase. **2018**.
- [8]: Alexandre, Beau trait.; thèse doctorat en Chimie Informatique, et Théorique Développement et validation de la plateforme de criblage virtuel VSM-G et étude du Domaine fat de la kinase d'adhérence focale FAK. Université Henri Poincaré. **2008**.
- [9]: Mahmoud, Dar. A.; Sharia, Mir.; Molecular Docking: Approaches, Types, Applications and Basic Challenges. *J Anal Bio Anal Tech.* **2017**.
- [10]: Sharp, K. A.; Honig, B.; Structural Determinants of Promiscuous and Specific Binding in Protein—Protein Complexes Using Component Analysis Techniques. **2019**, 19, 301-332.
- [11]: Kramer, B.; Rarey, M.; Lengauer, T.; *Proteins Supplement.* **1997**, 1, 221-225.
- [12]: Bouchrit,H.; Thèse de magister université Mentouri. Algérie. **2012**, 70.
- [13]: Brut, M.; Thèse de doctorat. Université pierre et marie curie France. **2009**, 123.

- [14]: Vieth, M.; Hirst, J.D.; Kolinski, A.; Brooks, C.L. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1612.
- [15]: 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 en Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. France : Universités d'Orléans. **2007**, 190.
- [16]: Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J.; Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Drug discovery.* **2004**, 3, 935.
- [17]: Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D.; Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases. 1. Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4759.
- [18]: Weiner, P. K.; Kollman, P. A.; AMBER-assisted model building with energy refinement-a general program for modeling molecules and their interactions. *J. Comput. Chem.* **1981**, 2, 287.
- [19]: Weiner, S. J.; Kollman, P. A.; Nguyen, D. T.; D. A.; Case, An all-atom force field for simulations of protein and nucleic acids., *J. Comput. Chem.* **1986**, 7, 230.
- [20]: Brooks, B. R.; Bruccoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M.; CHARMM-a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, 4, 187.
- [21]: Nilsson, L.; Karplus, M.; Empirical energy functions for energy minimization and dynamics of nucleic acids. *J. Comput. Chem.* **1986**, 7, 591.
- [22]: Alban, A.; Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Other. Universités d'Orléans. France. **2007**, 191.
- [23]: Halperin, I.; Ma, B.; Wolfson, H.; Nussinov, R.; Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions., *Proteins.* **2002**, 47, 409.
- [24]: Charifson, P. S.; Corkery, J. J.; Murcko, M. A.; Walters, W. P.; Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 5100.

- [25]: Bissantz, C.; Folkers, G.; Rognan, D.; Protein-based virtual screening of chemical databases. 1. Evaluation of different docking/scoring combinations. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 4759.
- [26]: Terp, G. E.; Johansen, B. N.; Christensen, I. T.; Jørgensen, F. S.; A new concept for multidimensional selection of ligand conformations (MultiSelect) and multidimensional scoring (MultiScore) of protein-ligand binding affinities. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2333.
- [27]: Wang, R. X.; Lai, L. H.; Wang, S. M.; Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2002**, 16,11.
- [28]: Muegge, I.; PMF scoring revisited. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 5895.
- [29]: Muegge, I.; Effect of ligand volume correction on PMF scoring. *J. Comput. Chem.* **2001**, 22, 418.
- [30]: Eldridge, M. D.; Murray, C. W.; Auton, T.R.; Paolini, G. V.; Mee, R. P.; Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **1997**, 11, 425.
- [31]: 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**, 168.
- [32]: 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**, 75.
- [33]: 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**, 75.
- [34]: Corbeil, C. R.; N, Moitessier.; "Docking ligands into flexible and solvated macromolecules.3.Impact of input ligand conformation, protein flexibility, and water molecules on the accuracy of docking programs. *Journal of chemical information and*

modeling. **2009**, 49(4), 997-1009.

[35]: Bitencourt-Ferreira, G.; W. F. Azevedo.; Docking with SwissDock. Docking Screens for Drug Discovery, Springer: 189-202.

[36]: Taylor, R. D.; Jewsbury, P. J.; Essex, J. W.; FDS: flexible ligand and receptor docking with a continuum model and soft-core energy function. *J Comput Chem*. **2003**, 24, 1637–1656.

[37]: <http://autodock.scripps.edu/>

[38]: Trott, O.; A. J.; Olson "AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading." *Journal of computational chemistry*. **2010**, 31(2), 455-461.

[39]: Quiroga, R.; M. A, Villarreal.; "Vinardo: A scoring function based on autodockvina improves scoring, docking, and virtual screening." **2016**.

[40]: A, Tripathi.; K, Misra.; « Molecular Docking: A Structure-Based Drug Designing Approach », JSM Bioinformatics, Genomics and Proteomics. **2017**, 2, 1015.

[41]: F, Louacheni.; « D'éveloppement d'un portail web pour le criblage virtuel sur la grille de calcul », Mémoire de Master en Informatique : Institut de la Francophonie pour l'Informatique, Vietnam. **2014**.

[42]: M. N, Drwal.; R, Griffith.; « Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening », Drug Discovery Today: Technologies. **2013**, 10, 395-401.

[43]: Litalien, C. Beaulieu, P. Mécanismes moléculaires de l'action des médicaments : des récepteurs aux effecteurs. 2011, 1553–1568.

[44]: Liu, J.; Seibold, SA.; Rieke, CJ.; Song, I.; Cukier, RI. ; Smith, WL.; Prostaglandine endoperoxyde H synthases : spécificité de l'hydroperoxyde de peroxydase et activation de la cyclooxygénase. *Le Journal de chimie biologique*. **2007**, 282 , 25 , 18233–44.

[45]: Ghlichloo, I. Gerriets, V. Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) . Dans : StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Disponible sur : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>

- [46]: Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M.; The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature*. **1994**, 367(6460), 243-249.
- [47]: Knights, K. M.; Mangoni, A. A.; Miners, J. O.; Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert review of clinical pharmacology*. **2010**, 3(6), 769-776.
- [48]: García, A.; Guillamon, E.; Villares, A.; Rostagno, M. A.; Martinez. J. A.; *Inflammation Research* . **2009**, 58 (9), 537-552.
- [49]: Huang et al.; Huang, ME et al.; Identification of ACT4, a novel essential actin-related gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **1996**, 839-48.
- [50]: Bozza, PT.; Yu, W.; Penrose, JF.; Morgan, ES.; Dvorak, AM.; Weller, PF.; Corps lipidiques éosinophiles : sites intracellulaires spécifiques et inductibles pour la formation améliorée d'eicosanoïdes. *J Exp Méd*. **1997**, 186, 909-920.
- [51]: Liou, JY.; Shyue, SK.; Tsai, MJ.; Chung, CL.; Chu, KY. ; Wu, KK.; Colocalisation de la prostacycline synthase avec la prostaglandine H synthase-1 (PGHS-1) mais pas la PGHS-2 induite par l'ester de phorbol dans des cellules endothéliales cultivées. *J Biol Chem*. **2000**, 275, 15314-15320.
- [52]: Fosslien, Egil.; “Adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the gastrointestinal system. ” *Annals of clinical and laboratory science*. **1998**, 67-81.
- [53]: Ghosh, N.; Chaki, R.; Mandal, V.; Mandal, SC.; COX-2 as a target for cancer chemotherapy. *Pharmacol Rep*. **2010**, 62(2), 233-44.
- [54]: Mervis, C. B.; Morris, C. A.; Bertrand, J.; Robinson, B. F.; Williams syndrome: Findings from an integrated program of research. In H. Tager-Flusberg (Ed.), *Neurodevelopmental disorders*. 65–110.
- [55]: Larry, M.; Bush, MD.; Facp.; Charles, E.; Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University.
- [56]: Hermans, C. ; Bénéfices, risques et indications des anti-inflammatoires COX-2 sélectifs revisités : focus sur le Célécoxib *louvain med*. **2017**, 136 (5), 302-309.

[57]: Delphine, Jourdan.; Polyarthrite rhumatoïde : étude de l'évolution et des thérapeutiques médicamenteuses chez la femme enceinte. Sciences pharmaceutiques.

[58]: Breitner, J. C.; The role of anti-inflammatory drugs in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Annu Rev Med.* **1996**, 47:401-11.

[59]: Mitchell, JA.; Warner, TD.; Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol.* **1999**, 128(6), 1121-32.

[60]: Tsujii, M.; Kawano, S.; Tsujii, S.; Sawaoka, H.; Hori, M.; DuBois, RN.; Cyclooxygenase

regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **1998**, 705-716.

[61]: Tsujii, M.; DuBois, RN.; Alteration in the cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **1995**, 493-501.

[62]: Howe, LR.; Subbaramaiah, K.; Brown, AMC.; Dannenberg, AJ., Cyclooxygenase 2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocrine Related Cancer.* **2001**, 8:97-114.

[63]: Chandrasekharan, N. V.; Simmons, D. L.; The cyclooxygenases. *Genome Biol.* **2004**, 5(9), 241.

[64]: Lagrade, N.; thèse « Méthodes de criblage virtuel in silico : importance de l'évaluation et application à la recherche de nouveaux inhibiteurs de l'interleukine », Ecole doctorale Abbé Grégoire. **2014**.

[65]: Untori2.crihan.fr/unspf/2015_bordeaux_nuhrich.../ains_a_nuhrich **2015**.

[66]: Sobolewski, C.; Cerella, C.; Dicitom, M.; The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int.J. Cel. Biol.* **2010**, 215, 53-58.

[67]: 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 en Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. France : Universités d'Orléans. **2007**, 190.

[68]: Kearney, PM.; Baigent, C.; Godwin, J.; Halls, H.; Emberson, JR.; Patrono, C.; Les inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénase-2 et les anti-inflammatoires non stéroïdiens traditionnels augmentent-ils le risque d'athérombose ? Méta-analyse d'essais randomisés. *BMJ*. **2006**, 332 . 7553, 1302–8.

[69]: Ogunwobi, OO.; Wang, T.; Zhang, L.; Liu, C. ; La cyclooxygénase-2 et Akt interviennent dans la transition épithéliale-mésenchymateuse induite par plusieurs facteurs de croissance dans le carcinome hépatocellulaire humain . *Journal de gastroentérologie et d'hépatologie*. **2012**, 27 . 3 , 566–78.

[70]: Zeng, X.; Zhang, P.; He, W.; Qin, C.; Chen, S.; Tao, L.; Wang, Y.; Tan, Y.; Gao, D.; Wang, B.; Chen, Z.; Chen, W.; Jiang, YY.; Chen, YZ.; NPASS: natural product activity and species source database for natural product research, discovery and tool development. *Nucleic Acids Res*. **2018**, 4;46, 1217-222.

[71]: Hui, Zhao.; et autres.; mise à jour de la base de données NPASS : base de données quantitative sur l'activité des produits naturels et les sources d'espèces pour la recherche biomédicale. *Nucleic Acids Research*. **2023**, 51, 621–628.

[72]: Ibrahim, MAA.; Abdeljawaad, KAA.; Abdelrahman, AHM.; Jaragh-Alhadad, LA.; Oraby, HF.; Elkaeed, EB.; Mekhemer, GAH.; Gabr, Géorgie.; Shawky, AM.; Sidhom, Pennsylvanie.; et coll.; Exploration de l'activité des produits naturels et des candidats sources d'espèces pour la chasse aux inhibiteurs du transporteur ABCB1 : une étude de découverte de médicaments in silico. *Molécules*. **2022** , 27, 3104.

[73]: Vieth, M.; Hirst, J. D.; Kolinski, A.; Brooks, C. L.; Assessing energy functions for flexible docking. *J Comput Chem*. **1997**, 19, 1612-1622.

[74]: Abdelli, I.; Hassani, F.; Bekkel Brikci, S.; Ghalem, S.; In silico study the inhibition of angiotensin converting enzyme 2 receptor of COVID-19 by *Ammoides verticillata* components harvested from Western Algeria. *J Biomol Struct Dyn*. **2021**, 39(9), 3263-3276.

Annexes

Annexe 01: Valeurs de RMSD des 100 complexes utilisés pour tester le protocole de docking.

Code	Ligand	RMSD
1BNQ	AL4	1,65
1EHK	HAS	1.61
1VYZ	N5B	1.34
1GQS	SAF	3.61
1AX9	EDR	0.76
1N7I	LY1	0.44
1RTI	HEF	1.32
1X7J	GEN	0.56
1YVM	TMG	2.92
1G36	R11	1.62
1ZVX	FIN	1.92
1K1J	FD2	1,68
1K22	MEL	0,55
1YDT	IQB	3,60
1ACJ	THA	3.42
1VOT	HUP	4.22
1ACL	DME	4.64
1DX6	GNT	5.05
1EVE	E20	1.02
1DIY	CHO	2.66
1C1C	612	0.56
1TKT	H12	0.57
1ACK	EDR	0.69
1E3Q	EBW	0.23
1G27	BB1	1.72

1U65	CPO	2.18
2FDU	D1G	1,87
2AI7	SB7	1.97
2P98	YE7	0.69
2Q95	A05	4.73
2Q96	A18	1.19
2FJP	S14	0.60
2PU4	OX7	1.65
2RJQ	BAT	1.26
2VG6	NWB	1.10
2QT9	542	1.25
2I3Z	LIR	1.59
2VQ6	FP1	1.78
2XJ1	XJ1	0,89
2ACE	ACH	1.94
2WOM	ZZE	0.97
2WON	ZZE	0.78
2ABI	1CA	0.42
2ZGX	29U	1,43
2XFO	4UB	5,08
3LN0	52 B	1,11
3S3A	HAS	1,28
3PGH	FLP	1,71
3CHR	4BS	1,63
3PN4	BB2	0,81
3LN1	CEL	0,74
3LNT	MLI	1,28
3ANS	S38	1,20
3ANT	S82	0,93
3F68	91U	0,46
3HY7	097	2,22
3S00	Z60	0.37

3I1Y	33N	1,62
3G0D	XIH	0,36
3I1Y	33N	1.62
3D0K	GWJ	1.27
3DUX	64U	0.43
3CCC	7AC	1.23
3F68	91U	0.46
3KWF	B1Q	0,70
3HY7	O97	2.22
3FMR	TN4	0.90
3G0B	T22	0.48
4CQ0	SXS	1,09
4JPE	1M7	0,95
4DLI	IRG	0.46
4O09	2R6	0.37
4GL7	OXJ	0.51
4GF0	HAS	0,62
4PES	2PJ	1,73
4M0E	1YL	0,22
4GLX	0XS	0.60
4WY1	3VO	0.69
4PNC	7NP	1.70
4EBV	007	0.29
4HOE	18G	0.52
5EIE	7PG	5,34
5IKR	ID8	1.87
5F1V	3VN	5,42
5IX0	6EZ	0.35
5HLP	65A	0.64
5HVT	NVS	0.32
5K1V	6PX	3,86
5W58	HEM	1.22

5F00	5T8	0.76
5SZ7	72H	1.95
6EWE	COW	4.26
6MD7	JE1	1,98
6THZ	NB5	0.78
6MD7	JE1	1.98
6PZR	P7D	2.25
6OHS	MJY	1.50
6SUK	FT8	0.46
6AAH	9T9	1.51
7JRN	TTT	0.45

Annexe 02 : Liste des 87 composés extraits du NPASS et leurs affinité obtenues après criblage par le PyRx.

ID	Affinité (Kcal/mol)	ID	Affinité (Kcal/mol)
NPC473178	-12.4	NPC78335	-9.4
NPC473178	-12.3	NPC471944	-9.3
NPC471993	-11.7	NPC471975	-9.3
NPC473177	-11.7	NPC473145	-9.3
NPC471943	-11.1	NPC473180	-9.3
NPC473178	-11	NPC473253	-9.3
NPC472060	-10.9	NPC473413	-9.3
NPC473178	-10.9	NPC473413	-9.3
NPC71372	-10.9	NPC76647	-9.3
NPC472052	-10.8	NPC77000	-9.3
NPC473178	-10.8	NPC78058	-9.3
NPC473178	-10.8	NPC471993	-9.2
NPC472052	-10.7	NPC473145	-9.2
NPC75315	-10.7	NPC473183	-9.2
NPC471994	-10.5	NPC473186	-9.2
NPC473185	-10.4	NPC473189	-9.2
NPC473189	-10.4	NPC70136	-9.2
NPC472027	-10.3	NPC75141	-9.2
NPC79372	-10.1	NPC75315	-9.2
NPC473181	-10	NPC75315	-9.2
NPC71372	-10	NPC75724	-9.2
NPC302661	-9.9	NPC77903	-9.2
NPC472060	-9.9	NPC78058	-9.2
NPC473178	-9.8	NPC79375	-9.2
NPC471944	-9.7	NPC471968	-9.1
NPC472027	-9.7	NPC471975	-9.1
NPC472060	-9.7	NPC471980	-9.1
NPC473181	-9.7	NPC473180	-9.1
NPC71205	-9.7	NPC473180	-9.1

NPC472052	-9.6	NPC473278	-9.1
NPC473178	-9.6	NPC473436	-9.1
NPC473180	-9.6	NPC75135	-9.1
NPC473180	-9.6	NPC77310	-9.1
NPC473189	-9.6	NPC79372	-9.1
NPC715	-9.6	NPC471973	-9
NPC77310	-9.6	NPC75141	-9
NPC471994	-9.5	NPC76931	-9
NPC471994	-9.5	NPC77101	-9
NPC69101	-9.5	NPC77196	-9
NPC71465	-9.5	NPC77555	-9
NPC79372	-9.5	NPC78159	-9
NPC471984	-9.4	NPC78609	-9
NPC473181	-9.4	NPC79579	-9
NPC473185	-9.4		

Résumé

Résumé

Le docking moléculaire fait partie des méthodes de modélisation des interactions moléculaires. Dans le cadre de notre mémoire de master, nous avons utilisé le programme AutoDock Vina pour développer *in silico* des inhibiteurs potentiellement plus puissants et plus affins de la COX-2 (5IKR), une cible thérapeutique impliquée dans le traitement de l'inflammation. Avant de procéder, nous avons réalisé une évaluation pour vérifier la fiabilité du programme "AutoDock Vina". Cette évaluation a été effectuée en utilisant à la fois un test RMSD et une analyse visuelle. Plus précisément, nous avons appliqué le test RMSD à un total de 100 complexes provenant de la Protein Data Bank (PDB). Nous avons constaté que 80 % de ces complexes présentaient un RMSD inférieur à 2 Å, ce qui indique une bonne concordance entre les prédictions du programme et les structures expérimentales.

Ensuite, nous avons effectué un criblage d'une collection de 35 032 composés provenant de la base de données NPASS sur le site actif de la COX-2 (5IKR). À la suite de ce criblage, nous avons identifié 10 composés présentant les meilleurs scores par rapport au ligand de référence. Ces composés ont été étudiés plus en détail et ont démontré une activité supérieure envers la COX-2, avec des énergies d'interaction nettement inférieures à celles du ligand de référence, atteignant -9,1 kcal/mol. De plus, en appliquant les règles de Lipinski et Veber, ainsi qu'en vérifiant la solubilité dans l'eau et l'accessibilité à la synthèse, nous avons constaté que ces nouvelles molécules présentaient des propriétés ADME positives, favorables à leur potentiel de développement en tant que médicaments.

Abstract

Title : Identification of new COX-2 enzyme inhibitors by molecular docking in the NPASS database.

Molecular docking is one of the methods for modelling molecular interactions. As part of our master's thesis, we used the AutoDock Vina program to develop in silico potentially more potent and refined inhibitors of COX-2 (5IKR), a therapeutic target involved in the treatment of inflammation. Before proceeding, we carried out an evaluation to check the reliability of the "AutoDock Vina" program. This evaluation was conducted using both a RMSD test and a visual analysis. Specifically, we applied the RMSD test to a total of 100 Protein Data Bank (PDB) complexes. We found that 80% of these complexes had a RMSD below 2 Å, indicating good agreement between program predictions and experimental structures.

We then screened a collection of 35,032 compounds from the NPASS database at the active site of COX-2 (5IKR). Following this screening, we identified 10 compounds with the highest scores relative to the reference ligand. These compounds were studied in more detail and showed superior activity towards COX-2, with interaction energies significantly lower than those of the reference ligand, reaching -9.1 kcal/mol. In addition, by applying the Lipinski and Veber rules, as well as by checking water solubility and the accessibility to synthesis, we found that these new molecules had positive ADME properties, favourable to their development potential as drugs.

Key Words : Molecular docking, COX-2, NPASS, virtual screening.

العنوان : تحديد مثبطات إنزيم COX-2 الجديدة عن طريق الالتحام الجزيئي في قاعدة بيانات NPASS.

يعد الالتحام الجزيئي إحدى طرق نمذجة التفاعلات الجزيئية. كجزء من أطروحة الماجستير لدينا ، استخدمنا برنامج AutoDock Vina لتطوير مادة السيليكو التي يحتمل أن تكون أكثر فعالية ومثبطات أكثر من COX-2 (5IKR) ، وهو هدف علاجي يشارك في علاج الالتهاب. قبل المتابعة ، أجرينا تقييماً للتحقق من موثوقية برنامج "AutoDock Vina". تم إجراء هذا التقييم باستخدام كل من اختبار RMSD والتحليل البصري. على وجه التحديد ، قمنا بتطبيق اختبار RMSD على ما مجموعه 100 مجمع من بنك بيانات البروتين (PDB). وجدنا أن 80٪ من هذه المجموعات أظهرت RMSD أقل من 2 Å ، مما يشير إلى اتفاق جيد بين تنبؤات البرنامج والهياكل التجريبية.

بعد ذلك ، قمنا بفحص مجموعة من 35,032 مركباً من قاعدة بيانات NPASS للموقع النشط لـ COX-2 (5IKR). نتيجة لهذا الفحص ، حددنا 10 مركبات مع أفضل الدرجات مقارنة بالرابط المرجعي. تم فحص هذه المركبات بشكل أكبر وأظهرت نشاطاً متفوقاً تجاه COX-2 ، مع طاقات تفاعل أقل بكثير من الليجند المرجعي ، حيث وصلت إلى -9.1 كيلو كالوري / مول. علاوة على ذلك ، من خلال تطبيق قواعد Lipinski و Veber ، وكذلك عن طريق التحقق من قابلية الذوبان في الماء وإمكانية الوصول إلى التوليف ، وجدنا أن هذه الجزيئات الجديدة أظهرت خصائص ADME إيجابية ، مواتية لإمكاناتها التنموية كأدوية.h

الكلمات المفتاحية : الالتحام الجزيئي ، سيكلووكسيجيناز-2 , NPASS , الفحص الافتراضي.

Année universitaire : 2022-2023

Présenté par : CHELLOUG Maroua
FERHI Nora

Identification de nouveaux inhibiteurs de l'enzyme COX-2 par docking moléculaire dans la base de données NPASS

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée

Le docking moléculaire fait partie des méthodes de modélisation des interactions moléculaires. Dans le cadre de notre mémoire de master, nous avons utilisé le programme AutoDock Vina pour développer in silico des inhibiteurs potentiellement plus puissants et plus affins de la COX-2 (5IKR), une cible thérapeutique impliquée dans le traitement de l'inflammation. Avant de procéder, nous avons réalisé une évaluation pour vérifier la fiabilité du programme "AutoDock Vina". Cette évaluation a été effectuée en utilisant à la fois un test RMSD et une analyse visuelle. Plus précisément, nous avons appliqué le test RMSD à un total de 100 complexes provenant de la Protein Data Bank (PDB). Nous avons constaté que 80 % de ces complexes présentaient un RMSD inférieur à 2 Å, ce qui indique une bonne concordance entre les prédictions du programme et les structures expérimentales.

Ensuite, nous avons effectué un criblage d'une collection de 35 032 composés provenant de la base de données NPASS sur le site actif de la COX-2 (5IKR). À la suite de ce criblage, nous avons identifié 10 composés présentant les meilleurs scores par rapport au ligand de référence. Ces composés ont été étudiés plus en détail et ont démontré une activité supérieure envers la COX-2, avec des énergies d'interaction nettement inférieures à celles du ligand de référence, atteignant -9,1 kcal/mol. De plus, en appliquant les règles de Lipinski et Veber, ainsi qu'en vérifiant la solubilité dans l'eau et l'accessibilité à la synthèse, nous avons constaté que ces nouvelles molécules présentaient des propriétés ADME positives, favorables à leur potentiel de développement en tant que médicaments.

Mots-clés : Docking moléculaire, COX-2, NPASS, Criblage virtuel.

Centre de recherche : Centre de recherche en biotechnologie de Constantine.

Président de jury : MOKRANI E.H. (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1)

Rapporteur : CHERIET M. (MRB-Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine CRBt)

Examineur : BOUHDJAR Kh. (MRA-Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine CRBt)

