



Faculté des Sciences

Département de Chimie

THESE

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat

Option : Chimie Organique Appliquée

THEME

Etude docking et synthèse de dérivés de xanthone : voie d'accès à de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosidase

Présentée par :

Mme LAKEHAL Saoussene

Devant le jury :

Président:	M. AOUF	Noureddine	Professeur	Université de Annaba
Rapporteur :	M. FERKOUS	Fouad	Professeur	Université de Annaba
Examineurs :	M. REGAINIA	Zine	Professeur	Université de Souk ahras
	M ^{lle} BOUZEMI	Nassima	Professeur	Université de Annaba
	M ^{me} MADI	Fatiha	MCA	Université de Guelma
Membre invité :	M. KRAIM	Khaireddine	MCB	ENSET Skikda

Remerciements

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de deux laboratoires: la première partie a été effectuée au niveau du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (LCOA), équipe «Organométalliques & Modélisation Moléculaire» (Université Badji Mokhtar-Annaba) sous la direction du Professeur FERKOUS Fouad. La deuxième partie a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie médicinale (CMFA, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Belgique) en collaboration avec le Professeur FREDERICK Raphael.

J'adresse mes sincères remerciements à Professeur FERKOUS Fouad pour la confiance et l'intérêt qu'il a su m'accorder tout au long de ces années de thèse.

Mes vifs remerciements à Docteur KRAIM Khaireddine pour avoir été à l'initiative de ce travail et d'y avoir contribué.

Je remercie chaleureusement Professeur FREDERICK Raphael qui m'a permis d'intégrer son équipe durant mes stages que ce soit à l'Université de Namur ou à l'Université Catholique de Louvain et je voudrais lui témoigner toute ma reconnaissance pour les moyens qu'il a mis à ma disposition pour mener à bien la partie synthèse et étude biologique de ce travail.

Je remercie vivement le Professeur AOUF Nour-Eddine de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

J'exprime ma gratitude à Professeur REGAINIA Zine pour avoir accepté de juger ce travail. Je suis honoré de le compter parmi les membres de ce jury.

J'adresse mes remerciements à Professeur BOUZEMI Nassima pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit et de participer au jury de cette thèse. Qu'elle reçoit l'expression de ma sincère gratitude.

J'adresse mes respectueux remerciements à Docteur MADI Fatiha de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier vivement Docteur ATTOUI YAHIA Ouassila pour sa disponibilité et sa rigueur scientifique. C'est avec elle que j'ai fait mes premiers pas dans le monde du docking moléculaire.

Je remercie Docteur SAIHI Youcef pour son aide et pour nos discussions scientifiques.

Remerciements

J'associe à ces remerciements Monsieur Zeineddine DJEGHABA Professeur à l'Université de Annaba, pour ses précieux conseils et pour m'avoir fait bénéficier de ses connaissances en chimie.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire «32» (Laboratoire de Chimie Organique Appliquée , Université d'Annaba) et les membres du laboratoire de chimie médicinale à l'Université Catholique de Louvain et particulièrement à Monsieur ES SAADI Bouazza pour l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation de l'étude biologique.

J'adresse un remerciement incommensurable à celle qui est ma première lectrice : ma sœur et ma meilleure amie Imane, pour son encouragement constant, nos discussions scientifiques et les moments passés ensemble. Heureusement que tu étais là.

Je remercie très affectueusement mes parents, à qui je dois beaucoup, mes frères Samir et Imed et toute ma famille, mais surtout mon oncle Mohamed, qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras et m'ont toujours soutenue. Merci Wahab pour ta compréhension et ton soutien sans faille pour tous mes moments de doute. J'espère vous rendre fier de moi comme moi je suis fier de vous.

Enfin, «the best for last» un grand merci à Mme Beni et à tous ceux qui m'ont aidée, soutenue et encouragée, de près ou de loin, tout au long de ce travail.

Résumé

Ce travail de thèse comporte deux parties ; la première décrit un criblage virtuel basé sur le docking moléculaire d'une chimiothèque de dérivés de xanthone dans le site actif de l' α -glucosidase. En se basant sur les résultats de cette première partie, nous avons procédé à la synthèse et l'évaluation de l'activité inhibitrice de dérivés de xanthone sulfonamide .

L'étude docking sur un ensemble de 189 dérivés de xanthones a été menée dans le but de comprendre le mode d'interaction de ces composés vis-à-vis de l' α -glucosidase (PDB ID : 3L4W) et de sélectionner ceux représentant une bonne affinité avec les résidus du site actif. Cette étude a été assistée par le programme Molegro Virtual Docker (MVD) en utilisant MolDock Score comme algorithme de recherche et MolDock Score comme fonction de score. L'efficacité du protocole combinant ces paramètres a été validée avec une simulation de re-docking avec un RMSD de 0.3 Å.

L'analyse des modes d'interaction des vingt meilleurs dérivés de xanthone « top-scoring » révèle l'affinité favorable des xanthone sulfonamide avec les résidus du site actif en comparaison avec l'inhibiteur de référence «Miglitol ».

La deuxième partie de ce travail concerne la synthèse de quelques dérivés de xanthones sulfonamide issus de la première étude, l'évaluation de leur potentiel inhibiteur vis-à-vis de l' α -glucosidase suivie d'une étude cinétique enzymatique montrant le caractère non compétitif de l'effet inhibiteur de ces composés actifs. Nous avons ensuite mené une étude docking de ces composés dans le site d'interaction de l' α -glucosidase de souche *Saccharomyces cerevisiae* utilisée pour les tests biologiques, dont sa structure 3D a été générée par homologie.

Mots clés: Docking Moléculaire, criblage virtuel, dérivés de xanthone, α -glucosidase, inhibition.

Abstract

Abstract

In this thesis, we present two studies; the first study describes a docking-based virtual screening of a xanthone derivatives set toward α -glucosidase. Then, according to screening results, the second part is devoted to the synthesis of xanthone sulfonamides derivatives and the evaluation of their inhibitory activity toward target enzyme.

In the first study, we have carried out a docking-based virtual screening on an in-house database of 189 xanthone derivatives, in order to provide insights into the binding mechanism at molecular level toward α -glucosidase active site obtained from X-ray crystal structure (PDB ID :3L4W). Molecular docking analysis was carried out, using Molegro Virtual Docker with a combination of MolDock Optimizer as search algorithm and MolDock Score as scoring function, this combination was validated with Re-docking simulation (RMSD of 0.3 Å).

According to binding analysis, the selection of 20 top-scoring xanthone derivative revealed that: xanthone derivatives showed favorable binding affinity in comparison with «Miglitol » as reference ligand.

Thus, the quest of the second part of this work is the synthesis of some xanthonic sulfonamide derivatives, test them for α -glucosidase inhibitory properties and the measurement of their enzyme inhibition kinetics by using Lineweaver Burk plots in order to study their binding affinity which was revealed non-competitive. In addition, a molecular docking study has been realized to provide an insight into xanthonic sulfonamides binding modes and their inhibition mechanism toward α -glucosidase target for enzymatic assays from *Saccharomyces cerevisiae*. 3D structure of the target was obtained with homology modeling.

Key-words: Molecular docking, virtual screening, xanthone derivatives, α -glucosidase, inhibition.

ملخص

قدمنا في هذه الاطروحة دراستين : الدراسة الاولى تصف غريلة افتراضية لمكتبة كيميائية لمشتقات «enohtnaX» بواسطة دراسة من نوع «gnikcoD» في الموقع الفعال للانزيم و اعتمادا على نتائج هذا الجزء، قمنا خلال الدراسة الثانية بتركيب بعض مشتقات «edimanflus» xanthone و تقييم نشاطها التثبيطي بالنسبة للانزيم المعني بالدراسة. الدراسة الاولى : تمت على مجموعة تضم 189 مشتق و ذلك بهدف تحليل كيفية تفاعل هذه المركبات مع الانزيم (ID PDB : 3W4L) و اختيار المركبات الاكثر فعالية بالنسبة لموقعه النشط باستخدام برنامج «DVM» , ما مكننا من تحديد عشرون مركبا تميزت من بينها مشتقات «edimanflus» xanthone بتفاعل جيد مع الاحماض الامينية المكونة للموقع النشط و ذلك مقارنة مع المثبط المرجعي «lotilgiM».

الدراسة الثانية : تهدف الى تركيب بعض مشتقات «edimanflus» xanthone التي تم اختيارها خلال الدراسة الاولى و تقييم نشاطها التثبيطي مع تحديد نمط التثبيط بواسطة دراسة حركية للانزيم و اخيرا اجراء دراسة مفصلة لكيفية تفاعل هذه المركبات مع الانزيم المراد تثبيطه.

الكلمات المفتاحية : docking ، غريلة افتراضية ، مشتقات xanthone ،انزيم α -glucosidase ، تثبيط.

Liste des abréviations

Liste des abréviations

1D : une dimension

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

ADME: Absorption Distribution Métabolisme Elimination – Toxicité

AE : algorithme évolutionnaire

Ala : Alanine

AMBER : Assisted Model Building and Energy Refinement

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

Arg : Arginine

ARN : Acide RiboNucléique

Asn : Asparagine

Asp : Acide Aspartique.

CAZy : Carbohydrate-Active Enzymes.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

CHARMM : Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics

Coef : Coefficients.

CoMFA : Comparative Molecular Field Analysis

CoMSIA : Comparative Molecular Similarity Indices Analysis

Cys: Cystéine

DCM : dichlorométhane

DMSO : Diméthylsulfoxyde

E: Energie.

EC : Enzyme classification

Eq : Equation.

GH : Glycosyle Hydrolases

Glu : Acide Glutamique

Gly: Glycine

GROMOS : GRONingen MOlecular Simulation System

Liste des abréviations

H_{Bond} : Hydrogen Bond: liaison hydrogène

HIV : Human Immunodeficiency Virus: virus de l'immunodéficience humaine.

HTS : High Throughput Screening : Criblage à haut débit

IBAC : Interactions-Based Accuracy Classification: Classification de précision basée sur les

IC50 : la concentration d'inhibiteur pour laquelle la vitesse initiale de formation de produit diminue jusqu'à la moitié de sa valeur mesurée en absence d'inhibiteur.

ICM : Internal Coordinate Mechanic

interactions

IUB-MB : Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire.

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

Lys : Lysine

MDV: Molegro Virtual Docker.

Met :Méthionine

MGAM : Maltase Glucoamylase

MVD : Molegro virtual docker

N : nombre d'atome

NA : Non Actif

nt-MGAM : N-terminal Maltase Glucoamylase

OPLS : Optimized Potentials for Liquids simulation

PCA : Principal Component Analysis: Analyse en composante principale

PCA : Principal Component Analysis: Analyse en composante principale

PDB : Protein Data Bank

PDB: Protein Data Bank

PF : Point de fusion

Phe : Phénylalanine

PM3: semi empirique

Liste des abréviations

PMF : Potential of Mean Force : potentiel de force moyenne

Ppm : partie par millions

Pro : Proline

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship: Relation quantitative structure-activité

Rdt : rendement

R&D : Recherche et Développement

RD-QSAR : Receptor Dependent Quantitative Structure-Activity Relationship : Relation (Receptor Dependent Quantitative Structure-Activity Relationship).

RMN: Résonance magnétique nucléaire

RMSD: root-mean-square derivation : Ecart quadratique moyen.

RX: rayons X

SDF : Structure Data File

Ser : Sérine

SN2 : Substitution Nucléophile type 2.

SRA : Structure-Activity Relationship : Relations Structure-Activité

TBAOH : hydroxyle de tetrabutyl ammonium

Thr : Thréonine

TMS : triméthylsilyle

Trp :Tryptophane

Tyr: Tyrosine

Val : Valine

VDW : Van Der Waals

δ : déplacement chimique d'un atome

pNP-glucose : para-nitrophenyl glycopiranoside

Lexique

Lexique

Chimiothèque : librairie de substances chimiques

Clash stérique: interpénétration des rayons de VDW de deux atomes

Drug discovery : Ensemble des processus menant à l'identification de molécules actives pouvant être commercialisées en tant que médicament.

Drug-like (molécules) : Molécules dont les propriétés drug-like sont satisfaisantes pour une application comme candidat médicament.

Drug-like (propriétés) : Caractéristiques des molécules actives ayant un impact sur leur propriétés pharmacocinétiques (ADME) et/ou sur leur éventuelle toxicité.

Hits : «touches» :des substances ayant la capacité d'interagir avec la cible biologique et moduler ses effets.

Leads : «têtes de séries» : des composés plus actifs et plus sélectifs que les hits dont ils sont issus, tout en présentant des propriétés pharmacocinétiques optimales.

Pose : Agencement 3D d'un composé dans un complexe, conformation et position d'un ligand au sein du site actif d'une protéine.

Screening : Criblage

Top-scoring : Têtes de liste obtenues via le scoring d'un ensemble de molécules.

Liste des figures

Partie I : Rappels bibliographiques

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Figure I. 1. Structure du glycogène.....	8
Figure I. 2. Glycoprotéine avec oligosaccharides N-liés	9
Figure I. 3. Les différents modèles de l'inhibition compétitive.....	21
Figure I. 4. Représentation graphique de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat	22
Figure I. 5. Représentation double inverse $1/V_i = f1/S$ selon Lineweaver-Burk.....	23
Figure I. 6. Représentation graphique $SV_i = fS$ selon Hanes-Woolf.	23
Figure I. 7. Représentation graphique $KM = fI$ selon Lineweaver-Burk.	24
Figure I. 8. Détermination expérimentale d'IC ₅₀ à partir de la courbe $V_i/V_i = fI$	25
Figure I. 9. Mécanisme d'inhibition non compétitive pure.	26
Figure I. 10. Représentation graphique de $V_i/I = fS$ dans le cas d'inhibition non compétitive pure. .	27
Figure I. 11. représentation graphique double inverse selon Lineweaver-Burk pour l'inhibition non compétitive pure.	27
Figure I. 12. tracé double inverse de Lineweaver-Burk dans le cas d'inhibition non compétitive mixte (pour $KI < KI'$).	28
Figure I. 13. tracé double inverse de Lineweaver-Burk dans le cas d'inhibition non compétitive mixte (pour $KI > KI'$).....	28
Figure I. 14. modèles d'inhibition non compétitive mixte.	30
Figure I. 15. Formation du complexe inactif ESI	31
Figure I. 16. Représentation graphique double inverse selon Lineweaver-Burk pour inhibition incompétitive.	32
Figure I. 17. Structure chimique de l'acarbose.....	35
Figure I. 18. Structures chimiques de Valiénamine, Validamine, Valiolamine et de Voglibose.....	36
Figure I. 19. Structures chimiques de validoxyamine A, validamycine A et de l' α -méthylacarviosine	36
Figure I. 20. Structures chimiques de quelques aminosucre et analogues inhibiteurs de glycosidases	37
Figure I. 21. Structures chimiques de quelques aminosucre et analogues inhibiteurs de glycosidases avec des formes bicyclique et furanique.	38
Figure I. 22. Structures chimiques de salacinol et katalanol.	39
Figure I. 23. Structures chimiques des principales sous-familles de flavanoides.....	39
Figure I. 24. Structures chimiques de quelques dérivés de flavanoides d'origine naturelle inhibiteurs d' α -glucosidases.....	40

Liste des figures

Figure I. 25. Structures chimiques de quelques dérivés de Chalcones inhibiteurs d' α -glucosidases.	41
Figure I. 26. Structure chimique du squelette de base des xanthonnes.	42
Figure I. 27. Structures chimiques de quelques xanthonnes oxygénés biologiquement actifs.	43
Figure I. 28. Structures chimiques de quelques xanthonnes oxygénés inhibiteurs d' α -glucosidase.	43
Figure I. 29. Structures chimiques de quelques xanthonnes O-glucosides inhibiteurs d' α -glucosidases.	44
Figure I. 30. Structures chimiques de quelques xanthonnes C-glucosides inhibiteurs d' α -glucosidases.	45
Figure I. 31. Structures chimiques de quelques prenylated xanthonnes inhibiteurs d' α -glucosidase.	46
Figure I. 32. Structures chimiques de quelques benzoxanthonnes inhibiteurs d' α -glucosidases.	46

Chapitre II. Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

Figure II. 1. Quelques grandes étapes de la découverte de médicaments au cours du XIXème et XXème siècle.	53
Figure II. 2. Étapes du processus de recherche et développement (R&D) des médicaments.	54
Figure II. 3. Intervention des méthodes in silico dans le processus R&D de nouveaux médicaments.	58
Figure II. 4. Classification des méthodes de criblage virtuel « ligand-based » et « structure-based » les plus utilisés au cours du processus R&D notamment par les chimistes.	59
Figure II. 5. Présentation de la méthodologie de QSAR.	63
Figure II. 6. Principales étapes de l'élucidation d'un pharmacophore ⁵	65
Figure II. 7. Représentation schématique des étapes principales d'une conception de novo.	66
Figure II. 8. Démonstration d'une reconstruction incrémentale dont la molécule est divisée en fragments puis dockée et reconstruite couche par couche dans le site actif ⁶²	69
Figure II. 9. Représentation schématique du cycle évolutif typique d'un algorithme évolutif « AE ».	71

Partie II : Résultats et discussions

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthonnes

Figure I. 1. Structure de Maltase GlucoAmylase (PDB : 3L4W).	81
Figure I. 2. Illustration des cinq cavités du MGAM détectées (en vert) par l'algorithme de détection de MVD.	83
Figure I. 3. Illustration de l'espace de recherche.	84
Figure I. 4. Principe de l'algorithme évolutif différentiel de MDV.	86
Figure I. 5. Matrice de RMSD générée par MDV après la simulation du re-docking.	92
Figure I. 6. La superposition de la structure cristallographique du ligand (en bleu) et la pose obtenue après re-docking (en rouge), RMSD = 0.31 Å.	92
Figure I. 7. visualisation comparative entre le mode d'interaction du ligand cristallographique avec les résidus adjacents (a), et celui de la pose dans le même site d'interaction (b).	93

Liste des figures

Figure I. 8. Positionnement des vingt «Top-scoring» poses représentant les ligands de la chimiothèque dans le site d'interaction.	97
Figure I. 9. Structure chimique des 20 top-scoring xanthones	99
Figure I. 10. Interactions de type liaison hydrogène entre X170 et les résidus du site d'interaction; Arg526, Asp203, Thr205 et Gln603.	100
Figure I. 11. Interactions de type liaison hydrogène entre X117 et les résidus du site d'interaction; Trp406, Thr205 et le résidu catalytique Asp542.	101
Figure I. 12. liaisons hydrogène entre X108 et les résidus du site d'interaction; Tyr214, Thr205 et le résidu catalytique Asp542.	102
Figure I. 13. liaisons hydrogène entre X161 et les résidus du site d'interaction; Tyr299, Asp542, Thr205, Gln603 et Tyr605.	102
Figure I. 14. liaisons hydrogène établis entre X155, X156 ,X168 et les résidus du site actif.	103
Figure I. 15. Interactions de type liaison hydrogène pour X138 (a) et pour X47 (b).....	104

Chapitre II. Synthèse de dérivés de xanthone et étude de leur effet inhibiteur

Figure II. 1. Détermination graphique de l'IC ₅₀ de l'Acarbose.	114
Figure II. 2. Détermination graphique de l'IC ₅₀ du composé (4').....	116
Figure II. 3. Détermination graphique de l'IC ₅₀ du composé (11).....	118
Figure II. 4. Détermination graphique de l'IC ₅₀ du composé (12).....	118
Figure II. 5. Détermination graphique de l'IC ₅₀ du composé (13).....	118
Figure II. 6. Détermination graphique de l'IC ₅₀ du composé (14).....	119
Figure II. 7. Détermination graphique de l'IC ₅₀ du composé (15)	119
Figure II. 8. Détermination graphique de la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration du substrat, sans et en présence du composé 11.	120
Figure II. 9. tracé double inverse de Lineweaver-Burk en présence de différentes concentrations du composé 11.....	121
Figure II. 10. Alignement des séquences de l' α -glucosidase cible et le Template (3AJ7). (les résidus identiques sont représentés en rouge, non-identiques en bleu et ceux du site actif sont surlignés).	123
Figure II. 11. Comparaison entre la structure du modèle de l' α -glucosidase créé par homologie (a) et la structure du Template 3AJ7 (b) avec la conservation des résidus catalytiques.	124
Figure II. 12. Illustration de l'espace de recherche qui couvre toute la structure 3D de la cible	125
Figure II. 13. Distribution et orientation des poses du composé 11 obtenues dans la structure 3D de l'enzyme cible.	125
Figure II. 14. Orientation du composé 11 (en bleu) vers un site d'interaction proche du site actif (en rouge).	126
Figure II. 15. liaisons hydrogène entre le composé 11 et les résidus du site d'interaction.....	126

Liste des figures

Figure II. 16. Distribution et orientation des poses de l'acarbose obtenues dans la structure 3D de l'enzyme cible.	127
Figure II. 17. Orientation de l'acarbose dans le site actif proche du site d'interaction déterminé pour le composé 11 avec le site actif.	127
Figure II. 18. Mode d'interaction des composés 12-15 sans le site d'interaction déterminé.	128

Liste des schémas

Liste des schémas

Partie I : Rappels bibliographiques

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Schéma I. 1. hydrolyse du maltose	7
Schéma I. 2. Mécanisme de la réaction d'hydrolyse par les glycosidases avec inversion de configuration.	10
Schéma I. 3. Mécanisme de la réaction d'hydrolyse par les glycosidases avec rétention de configuration.	11
Schéma I. 4. état de transition lors de l'hydrolyse glycosidique.....	12
Schéma I. 5. Processus d'hydrolyse lors de la digestion des carbohydrates.	16
Schéma I. 6. Mécanisme de la réaction enzymatique selon Michaëlis-Menten.....	17
Schéma I. 7. Mécanisme réactionnel de l'inhibition compétitive.	20
Schéma I. 8. Mécanisme d'inhibition incompétitive.....	30
Schéma I. 9. Mécanisme d'inhibition irréversible.	33
Schéma I. 10. Mécanisme d'inhibition de la protéase par le di-isopropylfluorophosphate.....	34

Partie II : Résultats et discussions

Chapitre II. Synthèse de dérivés de xanthone et étude de leur effet inhibiteur

Schéma II. 1. Rétro-synthèse dérivés de xanthones sulfamides	110
Schéma II. 2. Voie de synthèse du précurseur 1,3,6,7-tetraméthoxyxanthone (4)	111
Schéma II. Voies d'accès aux dérivés de xanthone sulfamide à partir du précurseur 4	112
Schéma II. 4. Réaction enzymatique en présence du p-nitrophényl glucopyranoside comme substrat	113
Schéma II. 5. Voie de synthèse de 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (4').....	115
Schéma II. 6. Voie de synthèse des composés (11-15)	116

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Partie I : Rappels bibliographiques

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Tableau I. 1 : Mécanismes réactionnels et acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique des familles des glycosidases classées en clans. 14

Partie II : Résultats et discussions

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthones

Tableau I. 1: les cavités détectées avec l'algorithme de détection de MVD pour 3L4W 84

Tableau I. 2: Templates de charges prisent en compte par MolDock Score [Grid]. 88

Tableau I. 3: Type d'atomes contribuant à la formation d'une liaison hydrogène. 88

Tableau I. 4: Les paramètres correspondant à l'énergie de torsion. 89

Tableau I. 5: Les termes d'énergie calculés avec la fonction de score MolDock Optimizer. 90

Tableau I. 6: Les énergies d'interaction Moldock score des meilleurs poses obtenues pour chaque ligand de la chimiothèque. 94

Tableau I. 7: Les énergies d'interaction MolDock Score, Hbond Score et VDW des 20 meilleurs poses sélectionnés et le miglitol. 97

Tableau I. 8: Les interactions de type liaisons hydrogène «H_{Bond}» et de Van der Walls «VDW» des meilleurs dérivés de xanthone «20 top-scoring» établis avec les résidues du site actif. X indique l'établissement d'une seule interaction, XX l'établissement de plusieurs interactions. 106

Chapitre II. Synthèse de dérivés de xanthone et étude de leur effet inhibiteur

Tableau II. 1. structure des tetramethoxy-xanthones sulfamides synthétisés 112

Tableau II. 2. Evaluation de l'activité inhibitrice des xanthones sulfamide (6-10) 114

Tableau II. 3. structure des tetrahydroxy-xanthones sulfamides synthétisés 117

Tableau II. 4. Evaluation de l'activité inhibitrice des xanthones sulfamide (11-15) 117

Tableau II. 5. variation de V_{max} et K_m en fonction de la présence de l'inhibiteur 11 120

Tableau II. 6. Liste des meilleurs Templates PDB générés par Swiss-model. 122

Table des matières

Introduction générale	2
-----------------------------	---

Partie I : Rappels bibliographiques

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

1. Les glycosidases	7
1.1. Généralités	7
1.2. Mécanismes	9
1.2.1. Mécanisme avec inversion de configuration	9
1.2.2. Mécanisme avec rétention de configuration	10
1.2.3. Quelques aspects mécanistiques particuliers	11
1.2.4. Etat de transition	12
1.3.1. Classification traditionnelle	12
1.3.2. Classification structurale	13
1.3.2.1. Principe et classification	13
1.3.2.2. Les glycosidases responsables de la digestion des carbohydrates	15
4. Inhibition enzymatique	16
4.1. Bref rappel sur la cinétique enzymatique	16
4.1.1. Equation de Michaëlis-Menten	17
4.1.2. Détermination de V_{max} et K_M	18
4.2. Types d'inhibition enzymatique	19
4.2.1. Inhibition réversible	20
4.2.1.1. Inhibition compétitive	20
4.2.1.2. Inhibition non compétitive	25
4.2.1.3. Inhibition incompétitive	30
4.2.2. Inhibition irréversible	33
4.3. Inhibiteurs des glycosidases	35
4.3.1. Les inhibiteurs mimétiques	35
4.3.1.1. L'acarbose et ses analogues	35
4.3.1.2. Les aminosucre et leurs analogues	36
4.3.1.3. Salacinol et katalanol	38
4.3.2. Les inhibiteurs non-mimétiques	39
4.3.2.1. Flavonoides	39
4.3.2.1. Les xanthones	41
Références Bibliographiques	47

Table des matières

Chapitre II : Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

1. Drug discovery: Historique et développement	53
1.1. Choix d'une cible thérapeutique	55
1.2. Identification de hits	55
1.3 Génération et optimisation des leads	56
1.4 Le tests précliniques et cliniques	56
2. Criblage virtuel «in silico», méthodes et alternatives	58
2.1. Criblage virtuel « ligand-based »	60
2.1.1. Recherche de similarité	60
2.1.2. Modèles pharmacophoriques « ligand- based »	61
2.1.3. QSAR : Modèles de relations quantitatives structure-activité	61
2.1.4. 3D-QSAR	63
2.2. Criblage virtuel « structure-based »	63
2.2.1. Les approches pharmacophoriques 3D	64
2.2.2. La conception de novo « de novo design »	65
2.2.3. Docking moléculaire	66
2.2.3.1. Les approches de Docking	67
Références Bibliographiques	76

Partie II : Résultats et discussions

Chapitre I : Criblage par Docking d'une chimiothèque de xanthones

1. Choix d'une cible à intérêt biologique	81
2. Chimiothèque de ligands : Création et préparation	81
3. Le processus du docking moléculaire.....	82
3.1. Post-préparation du récepteur et des ligands par MDV	82
3.2. Détection des cavités et définition du site actif	83
3.3. Protocole et validation	85
3.3.1. Algorithme de recherche	85
3.3.2. Fonction de score.....	86
3.3.3. Validation du protocole de docking.....	90
4. Criblage de la chimiothèque	93
5. Conclusion	107
Références Bibliographiques	108

Table des matières

Chapitre II : Synthèse de dérivés de xanthone et étude de leur effet inhibiteur

1. Voie de Synthèse de quelques dérivés de xanthes sulfamide sélectionnés à partir du criblage	110
2. Evaluation de l'activité inhibitrice	113
3. Démethylation des composés synthétisés	115
4. Evaluation biologique des dérivés tetra-hydroxyxanthone sulfonamides	117
5. Cinétique enzymatique	119
6. Etude de mode d'interaction des dérivés synthétisés	121
6.1. Génération de la structure 3D de l'enzyme cible par homologie	121
5.2. Docking Moléculaire	124
6. Conclusion	128
Références Bibliographiques	130
Conclusion générale	131
Conclusion générale	132
Partie expérimentale	134
1. Synthèse des dérivés de xanthone:	135
1.1. Généralités :	135
1.2. Synthèse des dérivés 1,3,6,7-teraméthoxy-xanthone sulfamide:	135
1.2.1. Synthèse des précurseurs:	135
2. Evaluation de l'activité inhibitrice :	146
2.1. Généralités :	146
2.2. Protocole du test in vitro et évaluation des valeurs IC ₅₀ :	146
2.3. Etude cinétique:	147
ANNEXE	148

Introduction générale

Introduction générale

Les glycosidases sont une famille d'enzymes présente chez presque tous les êtres vivants. Elles ont un rôle capital dans 8600 processus biologiques connus¹. Parmi ces enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidique, l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) impliquée dans l'étape finale de la digestion des carbohydrates de l'alimentation de l'être humain en permettant la dégradation complète des oligosaccharides libérés par l' α -amylase salivaire et pancréatique et non absorbés par le corps. Ce processus permet la libération du glucose pour être ensuite véhiculé par le sang vers les organes.

Les inhibiteurs de l' α -glucosidase ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche pour pouvoir accéder à une diversité de composés utilisés comme agents thérapeutiques contre les maladies dans lesquelles l' α -glucosidase est impliqué telle que le diabète type II². Dans ce travail, nous nous intéresserons aux inhibiteurs de l' α -glucosidase dans l'objectif d'enrichir cette classe thérapeutique avec des substances médicamenteuses candidates à base de xanthone, dont certains composés de la famille ont montré leur effet inhibiteur de l' α -glucosidase³.

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Etudier les détails d'interactions, à l'échelle moléculaire, entre un ligand et la cible thérapeutique s'avère donc d'un très grand intérêt. Actuellement, les approches de criblage virtuel basé sur la structure de la cible, et plus précisément le docking moléculaire, permettent de prédire les modes d'interactions possibles et fournissent un moyen d'étudier les interactions au niveau moléculaire et sont, de ce fait, une indication de l'activité biologique de nouvelles molécules ne tenant compte que des critères structuraux⁴.

Le docking moléculaire est devenu, un outil indispensable dans le domaine de la conception de molécules médicamenteuses qui pourraient agir le plus favorablement, ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre que les méthodes classiques⁵.

Dans ce contexte, ce manuscrit est présenté comme suit :

Une étude bibliographique exposée sous forme de deux chapitres, le premier représente un aperçu général sur les glycosidases; leur site actif, leur classification, leur mécanisme d'action et un bref rappel sur la cinétique enzymatique montrant les différents types d'inhibition. Un rappel bibliographique sur les inhibiteurs les plus significatifs des glycosidases est présenté dans ce même chapitre.

Introduction Générale

Le second chapitre sera consacré aux approches et méthodes de criblage devenus indispensables pour la conception de nouvelles substances médicamenteuses.

Les travaux et résultats obtenus seront ensuite exposés et discutés dans une deuxième partie comprenant deux chapitres. Dans un premier temps, nous exposerons le criblage par docking moléculaire effectué sur une chimiothèque virtuelle de dérivés de xanthone dans le but de sélectionner les composés prometteurs qui réagissent plus favorablement avec l' α -glucosidase.

Le dernier chapitre s'articule autour de la synthèse de certains dérivés de xanthone, l'évaluation de leur inhibition avec un test in-vitro, la détermination du type d'inhibition avec une étude cinétique, la génération de la structure 3D de la cible utilisée pour les tests et enfin l'étude des modes d'interactions par docking moléculaire.

Enfin, une conclusion générale suivra les résultats de cette thèse et exposera les perspectives.

Références Bibliographiques

1. D. G. Naumoff, *Biochemistry (Moscow)*, 2011, **76**, 622-635.
2. G. T. Gallienne E, Lemaire. M, *J OrgChem*, 2006, **71**, 894-902.
3. Y. Liu, Z. F. Ke, J. F. Cui, W. H. Chen, L. Ma and B. Wang, *Bioorg. Med. Chem*, 2008, **16** 7185 – 7192.
4. A. C. Cheng, R. G. Coleman and K. T. Smyth, *Nat Biotechnol*, 2007, **25**, 71-75.
5. E. Yuriev, M. Agostino and P. A. Ramsland, *J. Mol. Recognit*, 2011, **24**, 149-164.

Partie I :
Rappels bibliographiques

Chapitre I :

Les glycosidases et leurs
inhibiteurs

1. Les glycosidases :

1.1. Généralités :

Les glycosidases ou glycoside-hydrolases sont les enzymes qui catalysent l'hydrolyse sélective des liaisons glycosidiques dans les polysaccharides et les glycoconjugués. Elles permettent la libération de molécules non saccharidiques, de monosaccharides ou d'oligosaccharides de plus faible poids moléculaire. Ainsi, la maltase, à titre d'exemple, catalyse l'hydrolyse de la liaison entre les deux unités du maltose pour donner deux molécules de glucose (Schéma 1). De toutes les enzymes présentes dans la nature, ce sont les plus abondantes, les plus évoluées et comptent parmi les plus efficaces. Elles arrivent à augmenter jusqu'à 1017 fois la vitesse de la réaction de coupure de la très stable liaison glycosidique ($347 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)¹.

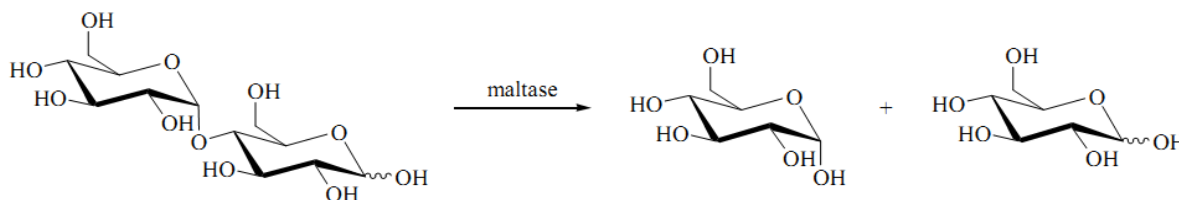


Schéma I. 1. hydrolyse du maltose

Elles sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques.² Elles sont spécifiques de l'unité glucidique hydrolysée, de sa série D ou L, de sa forme furanique ou pyranique et de la configuration de la liaison glycosidique α ou β . Ainsi les α -D-glycosidases hydrolysent les α -D-glucosides, les β -D-galactosidases les β -D-galactosides etc. De plus, au sein de chaque famille, il existe de petites variations selon l'origine de l'enzyme.³

Chez l'homme, les glycosidases sont responsables de la digestion des polysaccharides de l'alimentation dans la bouche et l'intestin grêle, en permettant la dégradation de ceux-ci en monosaccharides, qui peuvent ensuite passer la barrière intestinale pour être véhiculés par le sang vers les organes. Par exemple, l' α -amylase sécrétée par les glandes salivaires et le pancréas transforme l'amidon en maltose, maltotriose et dextrines. Les deux premiers composés sont hydrolysés par la maltase et le dernier par l' α -dextrinase pour donner du glucose. De même, le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose par la saccharase et le lactose en glucose et galactose par la lactase. Ces enzymes sont localisées à la surface des cellules épithéliales qui tapissent l'intestin grêle⁴.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Certaines de ces enzymes, dont l' α -1,6-glycosidase, jouent également un rôle important dans la dégradation du glycogène stocké dans le foie et les muscles. L'hydrolyse de ce polysaccharide formé d'unités glucose reliées entre elles par des liaisons α -1,4 et possédant des ramifications créées par des liaisons α -1,6, sur environ un résidu sur dix (Figure 1), permet d'apporter rapidement de l'énergie sous forme de glucose aux différents organes.⁵

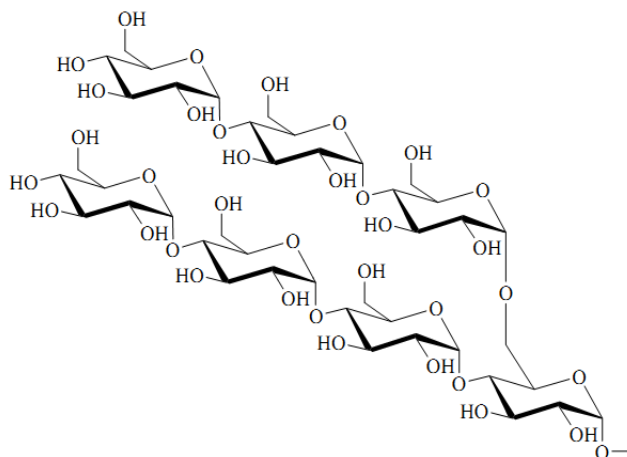


Figure I. 1. Structure du glycogène

Les glycosidases sont également impliquées dans le processus de maturation des glycoprotéines et des glycolipides qui sont très répandus dans l'organisme et leurs fonctions sont très variées.

Les glycoprotéines sont notamment présentes dans les membranes cellulaires et interviennent dans de nombreux processus, comme le transport membranaire, la reconnaissance cellulaire, la réplication des virus, la réponse immunitaire etc. Les unités oligosaccharidiques des glycoprotéines sont liées à des résidus asparagine par des liaisons N-glycosidiques ou à des résidus sérine et thréonine par des liaisons O-glycosidiques. Dans le cas des oligosaccharides N-liés (Figure 2), quatorze résidus osidiques sont transférés en bloc d'un transporteur lipidique à la protéine.⁶ Il s'agit d'un enchaînement de deux N-acétylglucosamines (GlcNAc), suivies de neuf mannoses (Man) et de trois glucoses (Glc) hydrolysés dans le réticulum endoplasmique par action de différentes glycosidases.

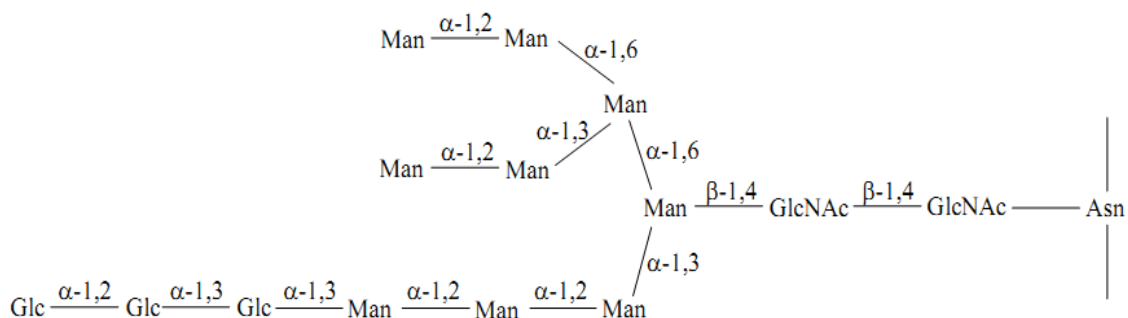


Figure I. 2. Glycoprotéine avec oligosaccharides N-liés

Les glycoprotéines sont ensuite transportées vers l'appareil de Golgi, cet organe a pour but de poursuivre la modification des protéines N-glycosylées et d'entamer la maturation des protéines O-glycosylées qui sont ensuite envoyées vers leurs sites d'activité : le lysosome, la membrane ou les vésicules de sécrétion.

1.2. Mécanismes :

Les glycosidases agissent selon deux mécanismes principaux décrits pour la première fois par Koshland en 1953⁷. Les séquences d'acides aminés, ainsi que les structures en trois dimensions d'un grand nombre de glycosidases sont désormais connues, ce qui permet d'affiner encore les connaissances relatives aux mécanismes de ces enzymes^{8, 9}. Ces mécanismes mettent principalement en jeu deux groupements carboxyliques provenant de résidus glutamate ou aspartate du site actif de l'enzyme, dont l'un joue le rôle de donneur de proton (acide-base) et l'autre agit en tant que base/nucléophile.

1.2.1. Mécanisme avec inversion de configuration :

C'est le mécanisme le moins répandu qui libère un glucide dont la configuration anomérique est l'inverse de celle du substrat. Il correspond à une substitution nucléophile s'effectuant selon un mécanisme concerté avec une catalyse acide-base générale. L'un des groupements carboxyliques permet le départ de l'aglycone par son rôle de catalyseur acide, tandis que l'autre sous forme de carboxylate déprotone l'eau pour favoriser son attaque sur le carbone anomérique. En effet, pour ce type de glycosidases, une distance moyenne de 10,5 Å entre les deux acides aminés doit être mise en évidence¹⁰⁻¹². Cette réaction s'effectue en passant par un état de transition dont la structure est proche de celle d'un cation oxocarbenium (Schéma 2).

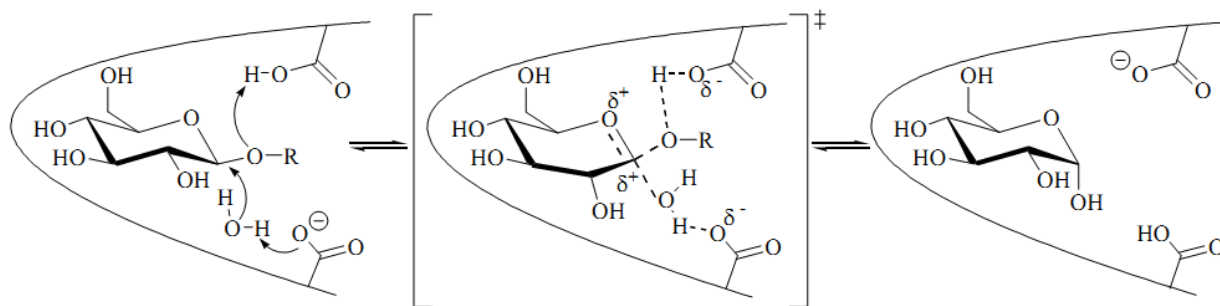


Schéma I. 2. Mécanisme de la réaction d'hydrolyse par les glycosidases avec inversion de configuration.¹³

1.2.2. Mécanisme avec rétention de configuration :

Les glycosidases agissant avec rétention de configuration anomérique, libèrent un glucide dont la stéréochimie du carbone anomérique est la même que celle du substrat (suite à deux inversions de configuration successives). Dans ce cas, les résidus carboxyliques sont moins éloignés (5,5Å) et l'hydrolyse a lieu en deux étapes^{11, 14}. Le nucléophile effectuant la première attaque sur le carbone anomérique est l'acide carboxylique déprotoné de l'enzyme (Asp ou Glu), ce qui implique la formation d'un intermédiaire covalent glycosyl-enzyme. Par conséquent, le substituant du glucoside est relâché à cette première étape. Par la suite, un deuxième résidu acide active une molécule d'eau qui, en attaquant le carbone anomérique, libère le glucide de l'enzyme.

Deux étapes de type S_N2 se suivent donc, il y a rétention de la configuration du carbone anomérique en passant par des états de transition également proches de cations oxocarbenium (schéma 3).

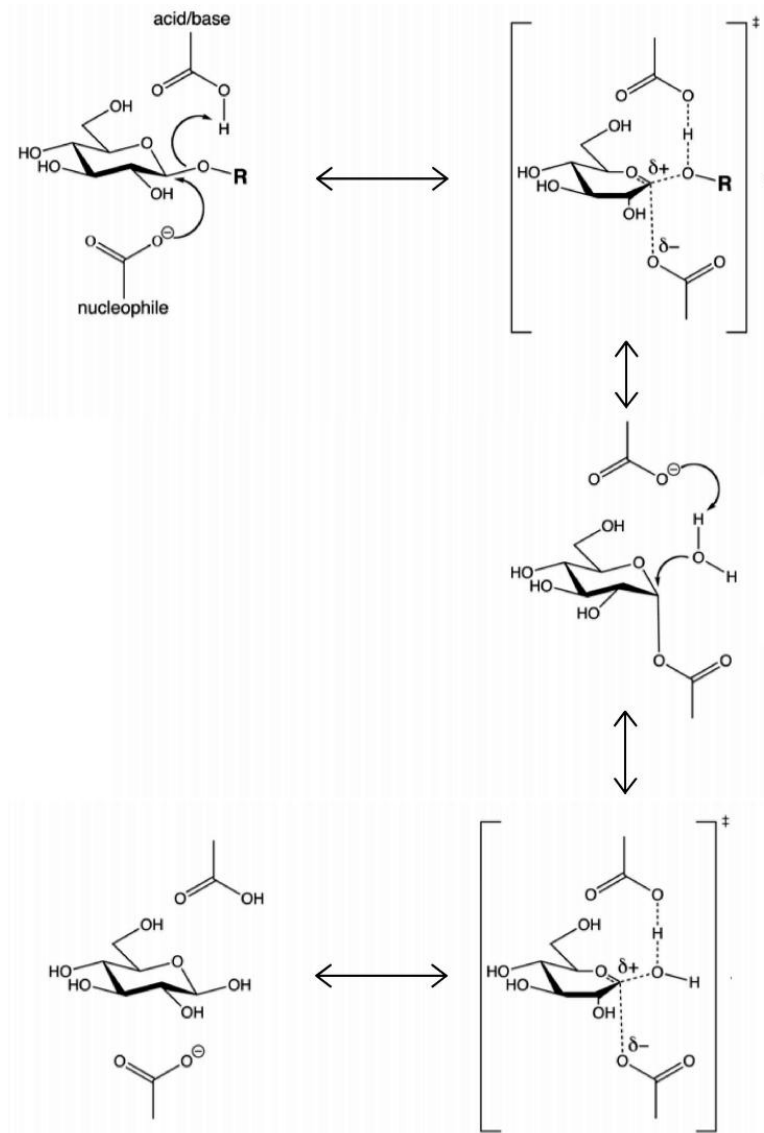


Schéma I. 3. Mécanisme de la réaction d'hydrolyse par les glycosidases avec rétention de configuration.¹³

1.2.3. Quelques aspects mécanistiques particuliers :

Il s'agit des cas particuliers où l'acide catalytique peut être remplacé par un phosphate inorganique, comme, par exemple: la maltose phosphorylase, la sucrose phosphorylase ou la cellobiose phosphorylase^{13, 15}. Certaines glycosidases comme les myrosinases, les chitinases et les endo N-acétylglucosaminidases présentent un mécanisme moléculaire d'hydrolyse n'impliquant l'intervention que d'un seul acide aminé catalytique comme N-acétyl- β -hexosaminidases dont le groupement N-acétyl du substrat joue le rôle du nucléophile en formant un intermédiaire oxazolinium^{16, 17}. D'autres impliquent des mécanismes d'oxydoréduction et/ou d'élimination^{18, 19}.

1.2.4. Etat de transition :

L'état de transition impliqué au cours du chemin réactionnel des glycosidases est similaire quel que soit le mécanisme mis en jeu (Schéma 4). Il se caractérise essentiellement par une distorsion de cycle du substrat dont les liaisons entre le nucléophile et l'oxygène glycosidique du groupement partant (ou l'eau dans l'étape de déglycosylation) sont partiellement formées et rompues. Cette distorsion se traduit par une structure dont la conformation est demi-chaise, bateau ou twist selon l'enzyme ce qui permet la formation d'une structure "pseudo-cationique" de type oxocarbénium.²⁰

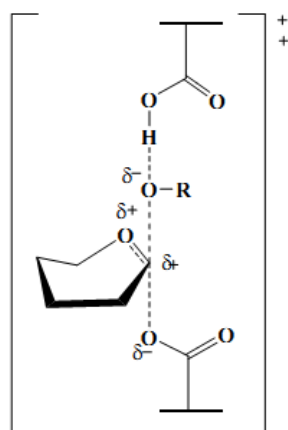


Schéma I. 4. état de transition lors de l'hydrolyse glycosidique.

Dans le cas des glycosidases agissant sur les liaisons β -anomériques, et particulièrement pour les β -glycosidases, la distorsion du cycle du substrat dans l'intermédiaire covalent glycosyl-enzyme est nécessaire pour amener la liaison glycosidique dans une position pseudoaxiale pour faciliter l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique et rapprocher l'oxygène exocyclique du catalyseur acide.

En effet, cette position pseudoaxiale entraîne le recouvrement de l'orbitale occupée par une des paires libres d'électrons de l'oxygène endocyclique avec l'orbitale antiliante de la liaison glycosidique, ce qui constitue un facteur favorable à l'hydrolyse de la liaison^{21, 22}. Par contre, pour certaines enzymes agissant sur des liaisons α -anomériques, la distorsion du cycle reste inutile vu la position déjà axiale de la liaison glycosidique²³.

1.3. Classifications des glycosidases :

1.3.1. Classification traditionnelle :

Dans la nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (IUB-MB) basée sur le type de réaction catalysée et la spécificité de

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

substrat, les glycosidases possèdent un numéro du type EC 3.2.1.x. Les trois premiers chiffres indiquent qu'elles hydrolysent des liaisons O-glycosidiques, le dernier (x) est variable et dépend du substrat transformé²⁴. Cette classification systématique permet de nommer précisément la spécificité de substrat d'une enzyme et possède en outre, l'avantage de pouvoir classer rapidement une enzyme. Cependant, ce système ne tient pas compte des similarités de séquence protéique et donc de la structure tridimensionnelle.

De plus, cette classification n'est pas systématique quant au mécanisme d'action des enzymes. Elle paraît mal adaptée aux glycosidases qui peuvent agir sur différents substrats et elle ne reflète pas les aspects structuraux des enzymes. C'est notamment le cas de la β -glucosidase BglA, de *Pyrococcus furiosus* DSM 3638. Elle est annotée avec le numéro EC 3.2.1.21, on pourrait penser qu'elle n'a que cette activité, or elle montre des activités β -galactosidasique (EC 3.2.1.23) et β -xylosidasique (EC 3.2.1.37)²⁵. Il peut se trouver également que deux numéros EC différents décrivent la même activité.

1.3.2. Classification structurale :

1.3.2.1. Principe et classification :

Avec l'accumulation de séquences des glycosidases (GHs), une nouvelle classification était indispensable car la diversité de propriétés et le comportement de certaines enzymes étaient inexplicables par rapport à la seule référence EC. Ces raisons ont amené Bernard Henrissat, à partir de 1989, à chercher une autre alternative pour classer ces enzymes selon leurs propriétés structurales. Il a donc créé une classification, basée sur la similarité de séquences en acides aminés.²⁶ Elle est basée sur la détection de segments structuraux constituant le cœur hydrophobe des protéines globulaires. Grâce à cette approche, des similarités dans le repliement tridimensionnel peuvent être détectées entre les protéines.²⁷

Les séquences ayant une forte similarité entre elles ont été classées dans les mêmes familles.²⁸ Cette classification diffère de la classification de l'IUB-MB par le fait que des enzymes de spécificité différente peuvent appartenir à la même famille. Elle permet de prendre en considération la structure tridimensionnelle ainsi que le mécanisme moléculaire d'action des glycosidases. Elles sont ainsi regroupées en familles (notées GH) en fonction des similarités dans leur séquence d'acides aminés. Certaines glycosidases sont multifonctionnelles. Elles contiennent des domaines catalytiques qui appartiennent à différentes familles des glycosidases. Puisqu'il existe une relation directe entre similarités de séquence en acides aminés et similarités de repliement²⁹, il peut être admis que les

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

membres d'une même famille possèdent des repliements similaires. Cette situation permet de prédire les structures tridimensionnelles générales des sites actifs des membres de chaque famille, si cette information est connue pour un ou plusieurs de ses représentants.

Le mécanisme d'action d'une enzyme étant donné par la structure du site actif et par la position des différents groupes fonctionnels, le mécanisme et la stéréochimie de la réaction seront conservés dans un clan (exception faite de la famille GH4). Toutes les glycosidases agissent généralement selon un mécanisme qui implique deux résidus importants. Chez ces enzymes, les acides aminés catalytiques sont le plus souvent des aspartates et/ou des glutamates (Tableau 1).

Tableau I. 1. Mécanismes réactionnels et acides aminés impliqués dans la catalyse enzymatique des familles des glycosidases classées en clans²⁵.

Clan de glycosidases	Famille de glycosidases	Nombre de familles	Mécanisme réactionnel	Résidus catalytiques impliqués dans la catalyse enzymatique (acide-base/nucléophile)
GH-A	1, 2, 5, 10, 17, 26, 30, 35, 39, 42, 50, 51, 53, 59, 72, 79, 86, 113, 128	19	Rétention	Glu / Glu
GH-B	7, 16	2	Rétention	Glu / Glu
GH-C	11, 12	2	Rétention	Glu / Glu
GH-D	27, 31, 36	3	Rétention	Asp / Asp
GH-E	33, 34, 83, 93	4	Rétention	Tyr+Glu / non connu
GH-F	43, 62	2	Inversion	non connu / non connu
GH-G	37, 63	2	Inversion	non connu / non connu
GH-H	13, 70, 77	3	Rétention	Asp / Glu
GH-I	24, 46, 80	3	Inversion	non connu ou Asp / non connu ou Glu
GH-J	32, 68	2	Rétention	Asp / Glu
GH-K	18, 20, 85	3	Rétention	Oxygène carbonyle / Glu
GH-L	15, 65, 125	3	Inversion	Glu ou phosphate /Glu
GH-M	8, 48	2	Inversion	Asp ou non connu /Glu
GH-N	28, 49	2	Inversion	Asp / Asp

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Cet effort a abouti à la classification de 291 séquences en acides aminés en 35 familles de glycosidases différentes. Cette courte liste de familles a été, par la suite, mise à jour plusieurs fois³⁰. A l'heure actuelle, 133 familles de glycosidases différentes sont répertoriées et peuvent être consultées sur internet.

Par ailleurs, beaucoup de ces familles, présentant des similarités dans le repliement tridimensionnel des enzymes qu'elles contiennent, ont été regroupées pour former des clans ou super-familles³¹. On dénombre actuellement 14 clans (Clan GH: Clan des GlycosylHydrolases) appelés A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M et N (Tableau 1).

Réactualisée en permanence, la classification CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) est maintenant étendue à d'autres classes d'enzymes actives sur les sucres : les glycosyltransférases (96 familles), les polysaccharides lyases (23 familles), et les carbohydrates estérases (16 familles). Cette classification permet d'avoir un certain pouvoir prédictif : le même repliement, le même mécanisme d'action, et les mêmes résidus catalytiques sont conservés à l'intérieur d'une même famille. Or depuis des années, CAZy est devenue une des principales références en ce qui concerne les CAZymes.

Devant l'accumulation de séquences enzymatiques dans une même famille telle que la famille GH13 (contenant 20902 séquences), Stamet al., dans le but d'améliorer les procédures d'annotation de séquences, ont fourni un effort de division des familles de GHs en sous-familles suivant l'idée que des enzymes possédant des séquences très similaires doivent partager des propriétés biochimiques très proches^{32, 33}. La famille GH 13, qui regroupe beaucoup de glycosidases a été subdivisée en 40 sous-familles, dont 13 appartenant à la famille des α -amylases (EC 3.2.1.1) et 4 appartenant à la famille des α -glucosidases (EC 3.2.1.20)²⁵.

1.3.2.2. Les glycosidases responsables de la digestion des carbohydrates :

Chez les mammifères, six types de glycosidases sont impliquées dans la digestion complète des polysaccharides de l'alimentation, dont deux α -amylases et quatre α -glucosidases, en permettant la dégradation de ceux-ci en monosaccharides pour être ensuite véhiculés par le sang vers les organes (Schéma 5).

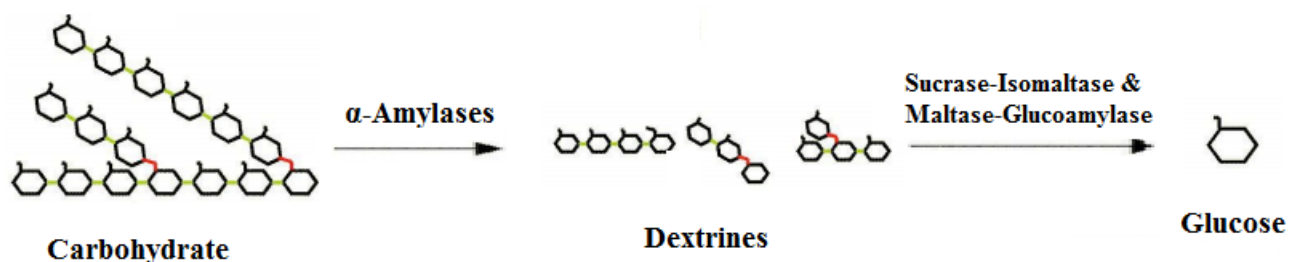


Schéma I. 5. Processus d'hydrolyse lors de la digestion des carbohydrates.

Les deux enzymes de type α -amylases (EC 3.2.1.1), salivaire et pancréatique, sont des iso-enzymes endohydrolases appartenant à la famille GH13 et réagissant avec un mécanisme de rétention de configuration^{34, 35}. Ces enzymes assurent une pré-hydrolyse des carbohydrates par le clivage des liaisons interne α -1,4 de l'amylose et de l'amylopectine (les liaisons α -1,6 de l'amylopectine ne s'hydrolysent pas avec les α -amylases) pour générer des dextrines linaires et des dextrines branchées.

Les dextrines résultantes sont ensuite dégradées par le biais de quatre α -glucosidase exohydrolases localisées à la surface des cellules épithéliales qui tapissent l'intestin grêle, dont deux maltase-glucoamylase (MGAM; EC 3.2.1.20 et 3.2.1.3) et deux sucrase-isomaltase (SI; EC 3.2.148 et 3.2.10), appartenant à la famille GH31. Ces enzymes jouent un rôle critique pour la production des unités du glucose qui seront ensuite absorbés et véhiculés par le sang vers les organes³⁶. Par contre, les carbohydrates et les fibres résistants qui ne peuvent pas être dégradés au niveau des intestins grêles sont dégradés par les bactéries du colon telles que *Bacteroides thetaiotaomicron* qui agissent sur certains carbohydrates et la cellulose³⁷.

4. Inhibition enzymatique :

4.1. Bref rappel sur la cinétique enzymatique :

Il existe plusieurs mécanismes enzymatiques différents pouvant décrire la réaction catalysée par les enzymes. En 1913, Leonor Michaëlis et Maud Menten ont proposé un modèle simple, dans lequel les enzymes, dites Michaëlinnes, fonctionnent selon le mode suivant : un substrat (S) se lie avec une enzyme (E) pour donner un complexe dissociable (ES), cet intermédiaire se dissocie pour donner un produit (P) avec régénération de l'enzyme (E)^{27, 38}.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

4.1.1. Equation de Michaëlis-Menten :

La modélisation mathématique de la cinétique d'une réaction selon Michaëlis-Menten se base sur deux termes : les concentrations des différentes molécules ou complexes de molécules et les constantes d'association et de dissociation de ces molécules entre elles (schéma 6).

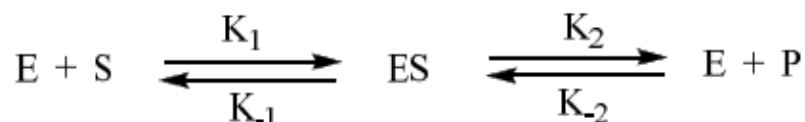


Schéma I. 6. Mécanisme de la réaction enzymatique selon Michaëlis-Menten.

Avec : k_1 = constante d'association de E + S

k_{-1} = constante de dissociation du complexe ES

k_2 = constante de réaction de ES en E + P

k_{-2} = constante d'association de E + P

L'équation de Michaëlis-Menten permet d'obtenir une expression de la vitesse initiale V_0 de la réaction en fonction de grandeurs connues (fixées par l'expérimentateur ou mesurées).

Pour cela, il faut se placer dans des conditions expérimentales particulières, à savoir : concentration en substrat [S] très largement supérieure à la concentration totale en enzyme $[E]_T$ et absence ou quasi-absence de produit P^{39} . La première condition est obtenue en choisissant des quantités adaptées d'enzyme et de substrat à introduire dans le milieu réactionnel, la seconde en réalisant les mesures suffisamment rapides pour que la quantité de substrat transformé en produit soit faible⁴⁰. A partir du moment où ces conditions sont réunies, on peut effectuer les approximations suivantes :

1. Les mesures de cinétique seront toujours réalisées pour des concentrations de produit très faibles : c'est la mesure de la vitesse initiale (v_i) pour $[P] \cong 0$ et $[S] \cong [S]_0$ où $[S]_0$ est la concentration du substrat à l'instant initial. Cela signifie que la vitesse d'apparition du complexe ES par association de E et de P (donnée par $V = K_2 [E] [P]$) est négligeable.

2. La concentration totale du substrat $[S]_0$ est très grande par rapport à $[E]_T$, la concentration maximale en complexe $[ES]_{max}$ est limitée par $[E]_T$ et sera donc toujours

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

négligeable comparée à $[S]_0$, même à saturation de tous les sites actifs. Or $[S] = [S]_0 - [ES]$, donc si $[ES]$ est négligeable face à $[S]_0$, on a l'approximation suivante : $[S] = [S]_0$.

3. Dès l'addition de l'enzyme dans la solution de substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme $[E]$, du substrat $[S]$ et du complexe $[ES]$ (appelé complexe de Michaëlis), on parle d'hypothèse de l'état stationnaire. En terme cinétique cela se traduit par $\frac{d[ES]}{dt} = 0$

Après avoir posé ces hypothèses on peut calculer la vitesse d'apparition du produit en résolvant le système d'équations suivant :

$$\begin{cases} V = K[ES] & \text{eq. 1} \\ K_M = \frac{[E][S]}{[ES]} & \text{eq. 2} \\ [S_0] = [S] + [ES] + [P] & \text{eq. 3} \\ [E_0] = [E] + [ES] & \text{eq. 4} \end{cases}$$

Avec $K_M = \frac{K_2 + K_{-1}}{K_1}$: la constante de dissociation du complexe $[ES]$ (appelée constante de Michaëlis-Menten).

La vitesse d'apparition du produit est donnée par l'équation suivante :

$$V = \frac{K_2[E]_0 [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad \text{eq. 5}$$

Soit $V_{max} = K_2[E]_0$ (vitesse maximale pour $[S]_0 \gg K_M$), la vitesse s'écrit sous la forme :

$$V = \frac{V_{max} [S]_0}{K_M + [S]_0} \quad \text{eq. 6} \quad (\text{équation de Michaëlis})$$

4.1.2. Détermination de V_{max} et K_M :

Les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique V_{max} et K_M sont définis de la façon suivante :

- V_{max} représente la vitesse maximale de la réaction. Elle est atteinte pour une concentration élevée en substrat et traduit la saturation de l'enzyme par le substrat, c'est-à-dire lorsque l'enzyme est entièrement sous forme de complexe $(ES)^{41}$.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

- K_M représente la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de V_{max} ou pour laquelle la moitié des sites actifs de l'enzyme est occupée. Ainsi plus le K_M est faible et plus l'affinité de l'enzyme pour le substrat est importante⁴¹.

Ces paramètres cinétiques peuvent facilement être déterminés :

- en traçant la courbe double inverse selon Lineweaver et Burk $\frac{1}{V_t}$ en fonction de $\frac{1}{[S]}$.

L'équation de la vitesse initiale (eq.6) devient :

$$\frac{1}{V_t} = \frac{K_M + [S]_0}{V_{max} [S]_0} \quad eq.7$$

- En portant sur un graphique les valeurs de obtenues $\frac{[S]}{V_t}$ pour différentes concentrations en substrat $[S]$. Cette représentation graphique est appelée (représentation de Hanes-Woolf)³⁹. En effet, on peut transformer l'équation de Michaelis-Menten (eq.6) en l'équation suivante :

$$\frac{[S]}{V_t} = \frac{[S]}{V_{max}} + \frac{K_M}{V_{max}} \quad eq.8$$

4.2. Types d'inhibition enzymatique :

Si la vitesse d'une réaction enzymatique diminue dans des conditions où l'enzyme n'est pas dénaturée, cela signifie que l'enzyme est inhibée⁴².

De nombreuses substances modifient l'activité d'une enzyme en s'y combinant, ce qui altère la liaison du substrat et/ou sa constante catalytique. Les substances qui diminuent ainsi l'activité d'une enzyme sont appelées des inhibiteurs.

Les inhibiteurs sont généralement des molécules de structure voisine du substrat, qui ne donnent pas de réaction ou réagissent beaucoup plus lentement que le substrat. L'étude de l'effet d'inhibiteur est fréquemment utilisée pour déterminer le mécanisme catalytique d'une réaction enzymatique, de mieux connaître la spécificité d'une enzyme ainsi qu'obtenir des données physiques et chimiques concernant le site actif de l'enzyme³⁹.

Les inhibiteurs d'enzymes peuvent être classés en deux types : inhibiteurs réversibles et inhibiteurs irréversibles. Les inhibiteurs réversibles s'associent à l'enzyme de manière non covalente, alors que les inhibiteurs irréversibles forment des liaisons covalentes stables avec l'enzyme. L'effet net de l'inhibition correspond à une diminution de la concentration de l'enzyme active⁴³.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

4.2.1. Inhibition réversible :

On distingue dans l'inhibition réversible trois catégories principales: les inhibiteurs compétitifs, non compétitifs et incompétitifs.

4.2.1.1. Inhibition compétitive :

Généralement un inhibiteur compétitif ressemble structurellement au substrat à un point tel qu'il se lie au site actif de l'enzyme mais sans donner de réaction. L'inhibiteur (I) entre en compétition directement avec le substrat (S) pour un site actif de l'enzyme (E). La fixation de l'inhibiteur empêche celle du substrat et réciproquement. Leurs fixations sont mutuellement exclusives. Il y a donc formation de deux complexes (EI) et (ES). La présence du complexe (EI) ralentit la réaction de formation de produit (P) en diminuant la concentration de l'enzyme libre (E) ⁴⁴.

Le mécanisme réactionnel est représenté dans le schéma 7 :

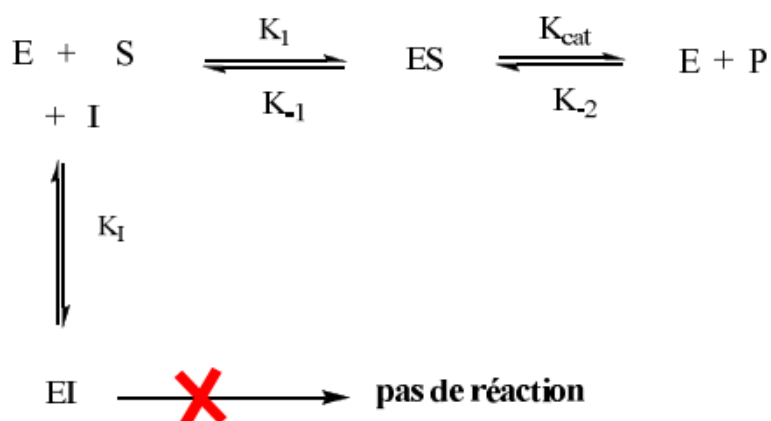


Schéma I. 7. Mécanisme réactionnel de l'inhibition compétitive.

Différents modèles rendent compte du mécanisme de l'inhibition compétitive.

a. Le substrat et l'inhibiteur ont le même site de fixation (modèle classique). Dans ce modèle il n'existe qu'un seul site de fixation pour les deux molécules (substrat et inhibiteur). La fixation exclusive résulte d'une analogie de structure entre le substrat et l'inhibiteur (figure.1 modèle1).

b. Les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts. Il existe d'autres modèles où le substrat et l'inhibiteur se fixent sur des sites distincts. Malgré la possibilité de fixation de l'inhibiteur et du substrat sur l'enzyme dans des emplacements différents,

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

le mécanisme de l'inhibition est considéré de type compétitif, pour diverses raisons structurales, parmi lesquelles :

- L'encombrement stérique de l'inhibiteur qui empêche la fixation du substrat sur son site actif (figure.3, modèle2),
- Le substrat et l'inhibiteur ont un groupe en commun qui se fixe à l'enzyme sur un troisième site de fixation (figure.3, modèle3),
- Les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur se recouvrent (figure.3, modèle4),
- La fixation de l'inhibiteur, généralement de structure différente de celle du substrat, induit un changement de conformation de l'enzyme qui déforme ou masque le site de fixation du substrat (et inversement) (figure.1, modèle5).

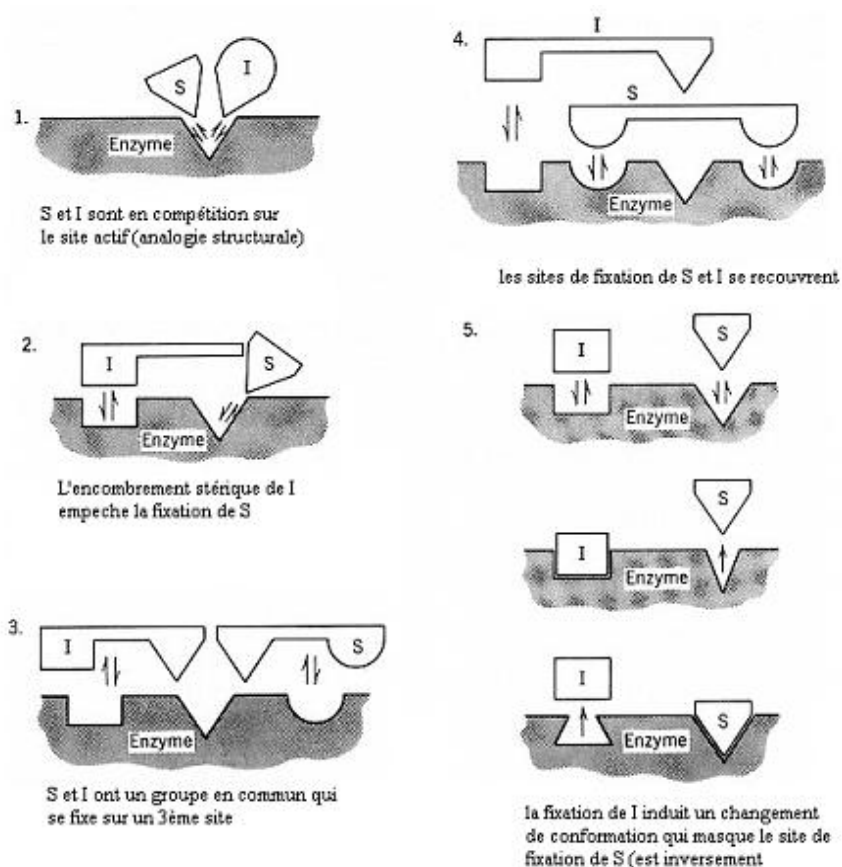


Figure I. 3. Les différents modèles de l'inhibition compétitive⁴⁴.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

4.2.1.1.1. Cinétique de l'inhibition compétitive :

Si, à une concentration donnée de substrat $[S]$, on appelle V_i^I et V_i , les vitesses initiales mesurées en présence et en absence d'inhibiteur sont respectivement :

$$V_i = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad \text{eq.9}$$

$$V_i^I = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_M^{app} + [S]} \quad \text{eq.10}$$

Avec
$$K_M^{app} = \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot K_M \quad \text{eq.11}$$

Avec :

- V_{max} : la vitesse maximale de réaction, $[I]$ la concentration de l'inhibiteur (I),
- K_I : constante d'inhibition, qui définit l'affinité de l'enzyme pour l'inhibiteur. Plus la valeur de cette constante est faible plus l'inhibiteur est efficace.
- K_M^{app} : constante de Michaelis Menten apparente. Cette constante augmente avec la concentration en inhibiteur ce qui ralentit la vitesse de formation de produit de réaction comme montré dans la figure 4 où la valeur de K_M (en absence d'inhibiteur) est accrue d'un facteur de $1 + \frac{[I]}{K_I}$ (présence d'inhibiteur). Quand $[I]$ est nulle, les deux équations (eq.9) et (eq.10) sont identiques.

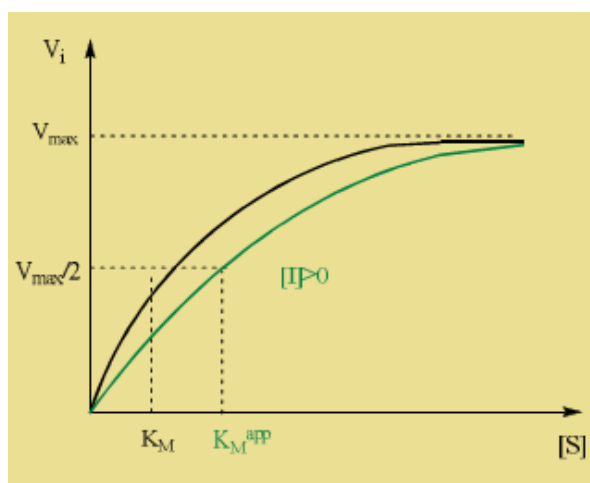


Figure I. 4. Représentation graphique de la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

On peut déterminer expérimentalement les valeurs de la vitesse maximale et la constante de Michaelis en traçant la courbe double inverse selon Lineweaver-Burk $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ (figure 5) ou selon la courbe de Hanes-Woolf $\frac{[S]}{v_i} = f([S])$ (figure 6).

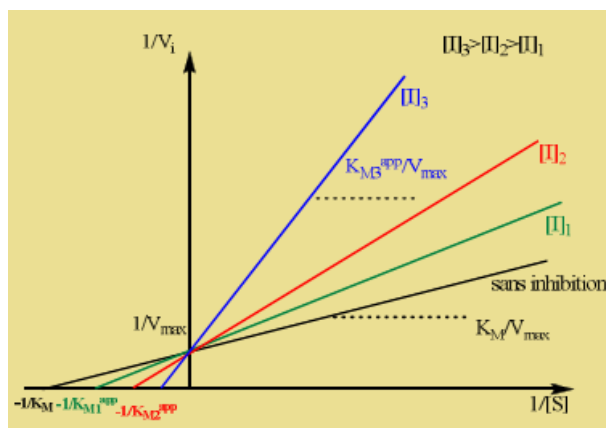


Figure I. 5. Représentation double inverse $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ selon Lineweaver-Burk

La représentation de Hanes-Woolf pour différentes concentration en inhibiteur (figure 6) donne plusieurs droites parallèles, qui permettent d'obtenir les différentes constantes de Michaelis K_M^{app} et la vitesse maximale V_{max} . Les droites de pente $\left(\frac{1}{V_{Max}}\right)$ coupent l'axe des abscisses au $\left(\frac{1}{K_M^{app}}\right)$

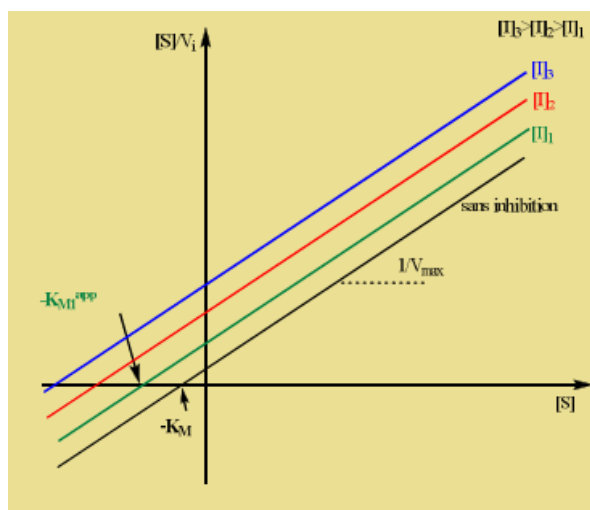


Figure I. 6. Représentation graphique $\frac{[S]}{v_i} = f([S])$ selon Hanes-Woolf.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

La détermination expérimentale de la constante d'inhibition K_I est réalisée à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis pour différentes concentration d'inhibiteur (I) (eq.11). On obtient une droite qui coupe l'axe des abscisses en $(-K_I)$ (figure 7).

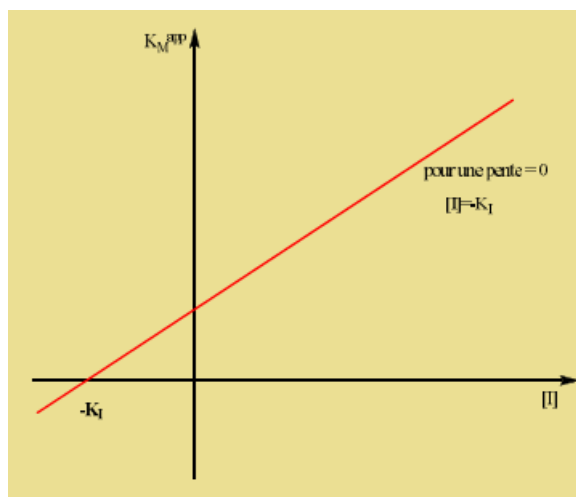


Figure I. 7. Représentation graphique $K_M = f([I])$ selon Lineweaver-Burk.

Il faut noter qu'en présence d'inhibiteur compétitif la constante de Michaelis K_M augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur (I). Le critère décisif de l'inhibition compétitive concerne la vitesse maximale de réaction V_{max} qui ne doit pas être affectée par la présence de l'inhibiteur I. Toutes les droites, dans le graphe double inverse de Lineweaver-Burk (figure 5), ont une intersection commune avec l'axe des ordonnées. Cela signifie que l'inhibiteur compétitif peut être libéré à concentration saturante de substrat.

4.2.1.1.2. Activité fractionnaire et degré d'inhibition :

L'activité fractionnaire (a) ou vitesse relative est définie par le rapport des vitesses initiales mesurées en présence et en absence d'inhibiteur⁴⁵ :

$$a = \frac{V_i^I}{V_i} = \frac{K_M + [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]} \quad eq.12$$

L'activité fractionnaire est souvent exprimée en terme de pourcentage d'inhibition (i%) :

$$i = 1 - a = \frac{[I]}{K_I \left(1 + \frac{[S]}{K_M}\right) + [I]} \quad eq.13$$

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Le degré d'inhibition induit par un excès d'inhibiteur compétitif est maximal quand la concentration du substrat et la concentration de l'inhibiteur sont beaucoup plus importantes que K_M et K_I respectivement.

4.2.1.1.3. Mesure du paramètre IC_{50} :

Le paramètre IC_{50} représente la concentration d'inhibiteur pour laquelle la vitesse initiale de formation de produit diminue jusqu'à la moitié de sa valeur mesurée en absence d'inhibiteur (eq.14).

$$IC_{50} = [I] \text{ pour } V_i^I = \frac{V_i}{2} \quad \text{eq. 14}$$

La valeur expérimentale d' IC_{50} est obtenue à partir de la courbe $\frac{V_i^I}{V_i} = f([I])$ (figure.8).

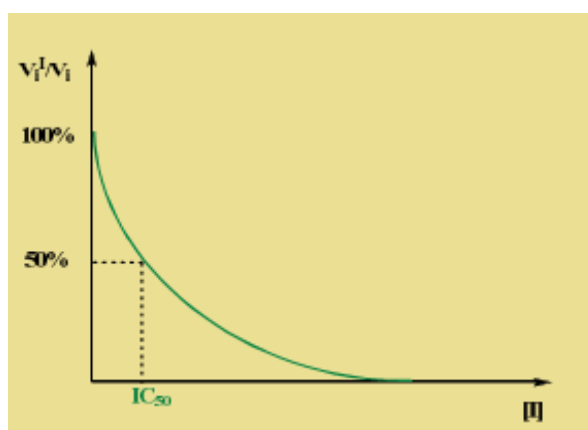


Figure I. 8. Détermination expérimentale d' IC_{50} à partir de la courbe $\frac{V_i^I}{V_i} = f([I])$

Pour une inhibition compétitive, l'expression qui détermine la valeur d' IC_{50} est la suivante:

$$IC_{50} = \frac{K_I}{K_M} [S] + K_I \quad \text{eq. 15}$$

Pour $[S] = IC_{50}K_M = 2K_I$

4.2.1.2. Inhibition non compétitive :

Dans le cas d'inhibition non compétitive, l'inhibiteur n'a aucune influence sur la fixation du substrat (et réciproquement), les sites de fixation du substrat et de l'inhibiteur sont distincts. En conséquence, l'inhibiteur se fixe de façon réversible à la fois

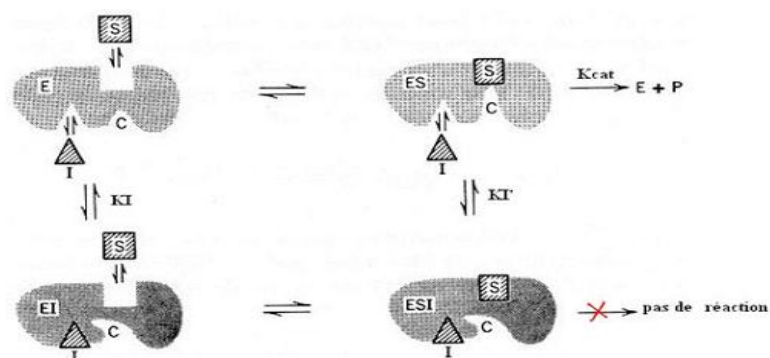
Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

sur l'enzyme (E) et sur le complexe enzyme-substrat (ES), de même le substrat se fixe à l'enzyme libre (E) et au complexe enzyme-inhibiteur (EI). Les inhibiteurs non compétitifs n'ont pas d'homologie structurale avec le substrat⁴⁴.

Il existe deux types d'inhibition non compétitive : l'inhibition non compétitive pure et l'inhibition non compétitive mixte.

4.2.1.2.1. Inhibition non compétitive pure :

Dans ce cas, la fixation de l'inhibiteur ne modifie pas la manière dont se fixe le substrat, mais empêche les ajustements conformationnels du site actif nécessaires pour la catalyse. Dans ce cas les valeurs de K_I et K'_I sont égales (figure 9)⁴⁶.



FigureI. 9. Mécanisme d'inhibition non compétitive pure.

En présence d'inhibiteur non compétitif, la représentation graphique de la vitesse initiale de réaction V_i^I (eq.09) en fonction de la concentration du substrat montre que la valeur de la constante de Michaelis K_M n'est pas modifiée. Cela peut signifier que l'affinité de l'enzyme libre (E) et celle du complexe (EI) pour le substrat (S) ne sont pas modifiées, par contre la vitesse maximale V_{max} a diminué (figure 10).

$$V_i^I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad eq.16$$

Soit
$$V_i^I = V_{max}^{app} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad eq.17$$

Avec
$$V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad eq.18$$

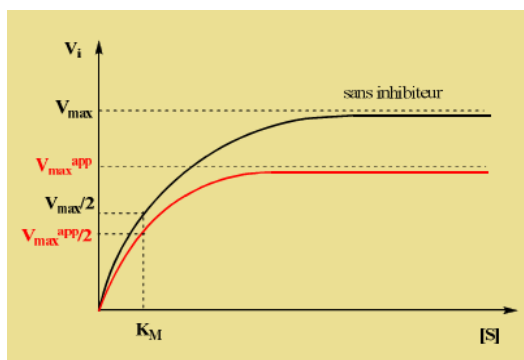


Figure I. 10. Représentation graphique de $V_i^I = f([S])$ dans le cas d'inhibition non compétitive pure.

Les paramètres cinétiques K_M et V_{max} peuvent être déterminés expérimentalement en traçant la courbe double inverse selon Lineweaver-Burk $\frac{1}{V_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ (figure 11). En présence de différentes concentrations de l'inhibiteur (I), on obtient des droites qui coupent l'axe des abscisses sur le point $\left(-\frac{1}{K_M}\right)$ et coupent l'axe des ordonnées en différents points représentant l'inverse des vitesses maximales apparentes $\left(\frac{1}{V_{max}^{app}}\right)$. Plus la concentration de l'inhibiteur (I) augmente plus V_{max} diminue.

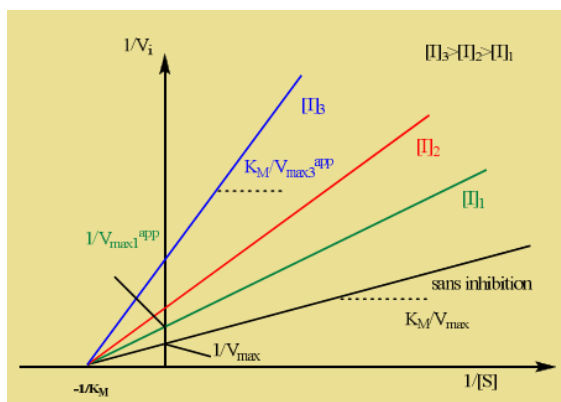


Figure I. 11. représentation graphique double inverse selon Lineweaver-Burk pour l'inhibition non compétitive pure.

4.2.1.2.1.1. Détermination du Degré d'inhibition et de l'IC₅₀ :

Dans le cas de l'inhibition non compétitive pure, le degré d'inhibition (i) et le paramètre IC₅₀ sont exprimés par les équations (eq.19) et (eq.20) respectivement :

$$i = \frac{[I]}{K_I + [I]} \quad \text{eq. 19}$$

$$IC_{50} = K_I \quad \text{eq. 20}$$

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

4.2.1.2.2. Inhibition non compétitive mixte :

Dans ce cas, la liaison de l'inhibiteur (I) avec l'enzyme (E) influence la liaison du substrat (S) avec l'enzyme. Les valeurs de K_I et K'_I ne sont pas égales. K_M et V_{max} sont altérées par la présence de l'inhibiteur (I) et ne sont pas constantes (figure 12 et figure 13).

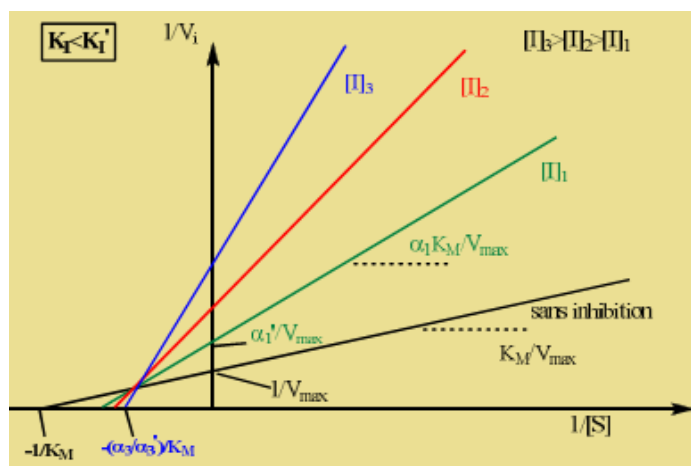


Figure I. 12. tracé double inverse de Lineweaver-Burk dans le cas d'inhibition non compétitive mixte (pour $K_I < K'_I$).

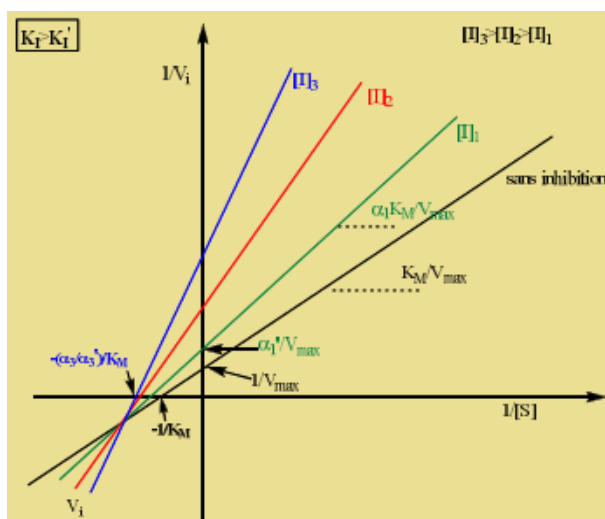


Figure I. 13. tracé double inverse de Lineweaver-Burk dans le cas d'inhibition non compétitive mixte (pour $K_I > K'_I$).

Dans le cas d'une inhibition mixte la vitesse initiale est définie par l'équation suivante :

$$V_i^I = \frac{V_{max}}{\alpha'} \cdot \frac{[S]}{\frac{\alpha}{\alpha'} K_M + [S]} \quad eq. 21$$

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Avec: $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$ et $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$

On peut écrire l'équation (eq.21) sous la forme :

$$V_i^I = V_{max}^{app} \cdot \frac{[S]}{K_M^{app} + [S]} \quad eq. 22$$

Avec: $V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'}$ et $K_M^{app} = \frac{\alpha}{\alpha'} K_M$

Dans la représentation graphique double inverse de Lineweaver-Burk (figures 12 et 13), les points d'intersection des droites avec l'axe des ordonnées et avec l'axe des abscisses représentent les termes $\frac{\alpha'}{V_{max}}$ et $\frac{\alpha}{\alpha' K_M}$ respectivement.

4.2.1.2.2.1. Détermination du degré d'inhibition (i) et de l'IC₅₀ :

Le degré d'inhibition (i) et le paramètre IC₅₀ pour une inhibition non compétitive mixte sont définis ci-dessous par les équations (eq.23) et (eq.24) respectivement :

$$i = 1 - \frac{K_M + [S]}{\alpha K_M + \alpha' [S]} \quad eq. 23$$

$$IC_{50} = \frac{K_M + [S]}{\frac{K_M}{K_I} + \frac{[S]}{K'_I}} \quad eq. 24$$

4.2.1.2.2.2. Modèles d'inhibition non compétitive mixte :

Il existe deux modèles alternatifs d'inhibition non compétitive mixte (figure 14). Le modèle 1 suggère qu'il n'y a pas de passage conformationnel possible entre les deux complexes enzyme-substrat (ES) et enzyme-substrat-inhibiteur (ESI), c'est-à-dire que le complexe enzyme-inhibiteur (EI) peut fixer le substrat (S) pour donner le complexe inactif (ESI), mais le complexe (ES) ne peut pas fixer l'inhibiteur (I). Le modèle 2 suggère qu'il n'y a pas d'équilibre entre les deux complexes (EI) et (ESI), c'est-à-dire que le complexe (ES) peut fixer l'inhibiteur (I) pour donner le complexe inactif (ESI), en revanche le substrat (S) ne peut pas être fixé sur le complexe(EI)³⁹.

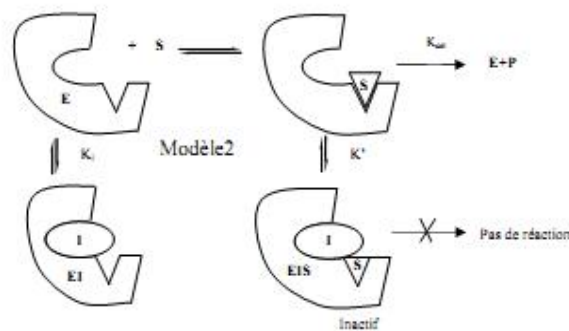
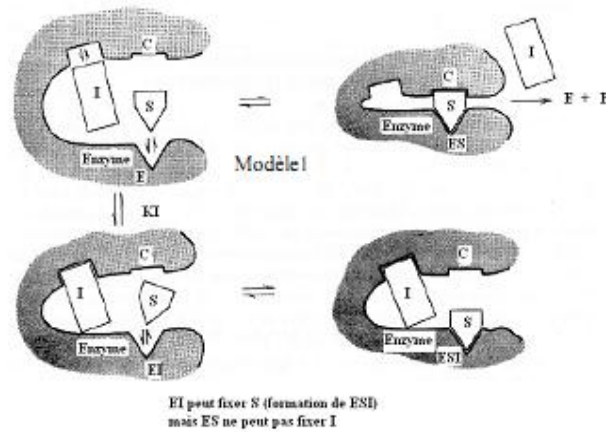


Figure I. 14. modèles d'inhibition non compétitive mixte.

4.2.1.3. Inhibition incompétitive :

Ce type d'inhibition est aussi appelé inhibition par blocage du complexe intermédiaire, l'enzyme et le substrat forment d'abord le complexe enzyme-substrat (complexe intermédiaire), puis l'inhibiteur se fixe à ce complexe. Il y a formation d'un complexe ternaire (ESI) inactif (schéma 8).

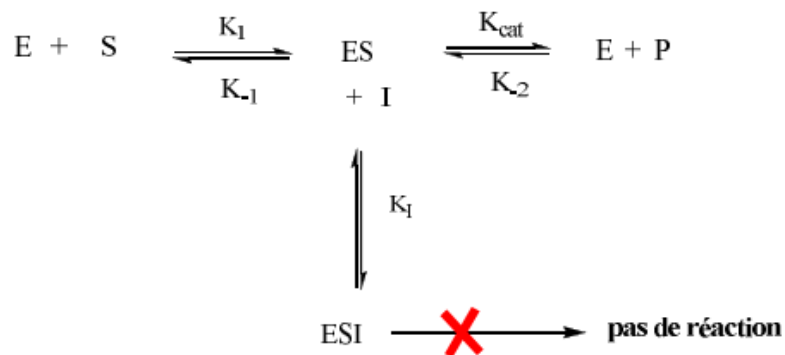
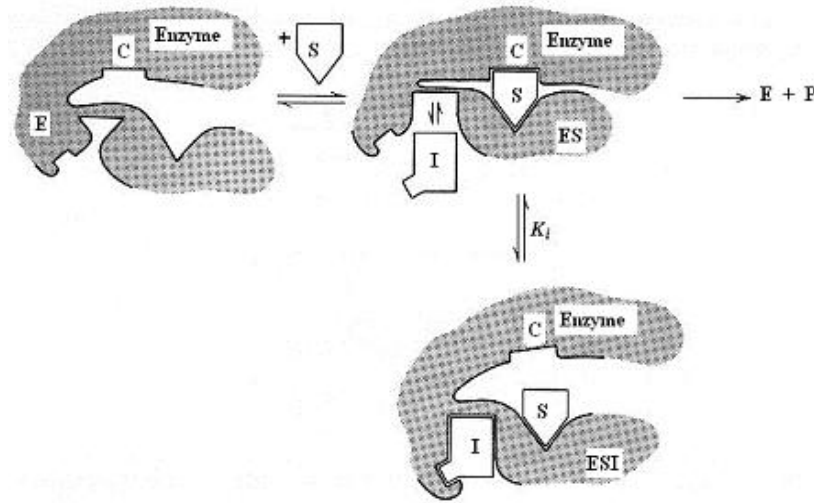


Schéma I. 8. Mécanisme d'inhibition incompétitive.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

La fixation du substrat (S) à l'enzyme, au niveau du site C (figure 15), induit un changement de conformation, formant ainsi le site de fixation de l'inhibiteur (I).



FigureI. 15. Formation du complexe inactif ESI

La vitesse de réaction en présence d'inhibiteur incompétitif est définie par l'équation eq25 ou eq26 selon :

$$V_i^I = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \cdot \frac{[S]}{\frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}} + [S]} \quad eq.25$$

$$V_i^I = V_{max}^{app} \cdot \frac{[S]}{K_M^{app} + [S]} \quad eq.26$$

Avec : $V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$ et $K_M^{app} = \frac{K_m}{1 + \frac{[I]}{K_I}}$

Les différents paramètres cinétiques, vitesse maximale, constante de Michaelis et constante d'inhibition, sont déterminés à partir de la représentation graphique double inverse selon Lineweaver-Burk (figure 16).

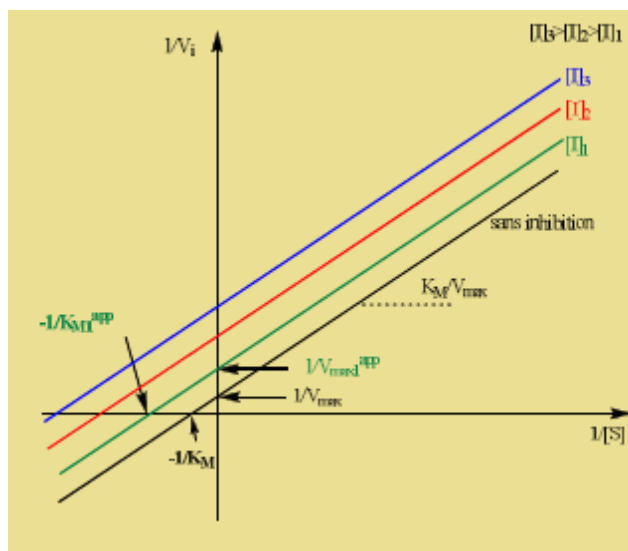


Figure I. 16. Représentation graphique double inverse selon Lineweaver-Burk pour inhibition incompétitive.

On obtient, selon le graphe, des droites parallèles de pente égale à $\left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)$ qui coupent les axes des ordonnées et des abscisses aux points $\left(\frac{1+\frac{[I]}{K_I}}{V_{max}}\right)$ et $\left(\frac{1+\frac{[I]}{K_I}}{K_m}\right)$ respectivement.

4.2.1.3.1. Degré d'inhibition et IC_{50} :

Le degré d'inhibition (i) et le paramètre IC_{50} pour une inhibition incompétitive sont donnés par les équations (eq.27) et (eq.28) respectivement :

$$i = \frac{[I][S]}{K_I K_m + (K_I + [I])[S]} \quad eq.27$$

$$IC_{50} = \frac{K_I K_m}{[S]} + K_I \quad eq.28$$

$$(IC_{50} = 2K_I \text{ pour } [S] = K_m)$$

En présence de ce type d'inhibiteurs, les valeurs des deux paramètres diminuent avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur. Cela est expliqué par la diminution de concentration en enzyme active à cause de la formation du complexe inactif (ESI).

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Cette inhibition ne peut être levée par un excès de substrat. En effet, plus il y a de substrat, plus il y a formation de complexe (ES) et plus l'équilibre de fixation de l'inhibiteur (I) est déplacé en faveur du complexe (ESI).

4.2.2. Inhibition irréversible :

L'action d'un inhibiteur est irréversible quand il se forme une liaison covalente entre l'enzyme et l'inhibiteur. Ce type d'inhibiteur est appelé inactivateur.

La cinétique de la réaction est similaire à celle d'une réaction en présence d'un inhibiteur non compétitif car il y a perte d'enzyme actif (schéma 8). Mais, contrairement à ce qui se passe dans l'inhibition réversible, la dilution ou la dialyse de la solution contenant le complexe enzyme-inhibiteur (EI) ne restaure pas l'activité enzymatique car le complexe ne peut pas se dissocier.

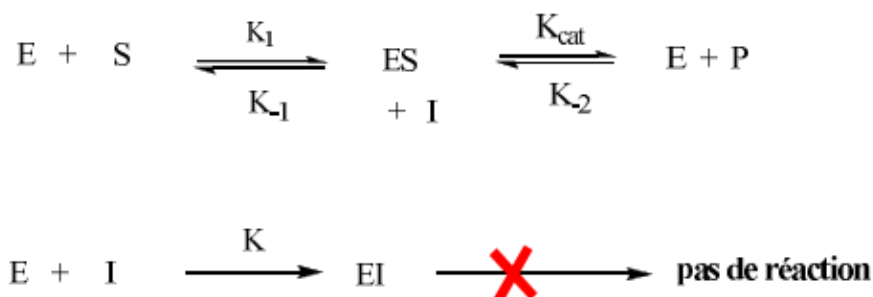


Schéma I. 9. Mécanisme d'inhibition irréversible.

L'étude de l'effet des inhibiteurs irréversibles est souvent utilisée pour déterminer les groupes actifs du site catalytique. Un exemple d'inactivateur est le gaz neurotoxique, employé dans la deuxième guerre mondiale, le di-isopropylfluorophosphate (DFP).

L'étude de l'effet de ce composé sur l'activité des protéases à sérine a permis d'identifier la sérine 195 et l'histidine 57, les deux résidus impliqués dans la catalyse. La sérine 195 attaque le groupe fluorophosphate du DFP en formant une liaison covalente (phosphoester) qui rend cette inhibition irréversible (schéma 9)⁴⁷.

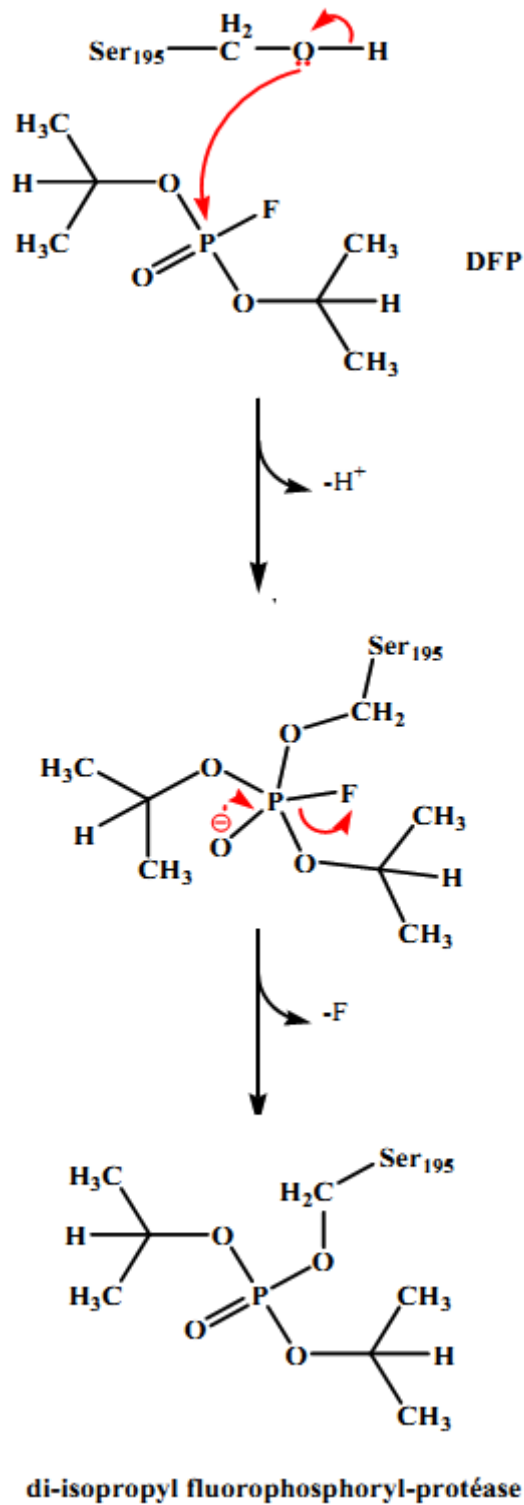


Schéma I. 10. Mécanisme d'inhibition de la protéase par le di-isopropylfluorophosphate.

4.3. Inhibiteurs des glycosidases :

Les rôles catalytiques critiques des glycosidases ont mis en avant le développement de leurs inhibiteurs qui peuvent présenter plusieurs types d'activité pharmacologique. Isolés ou synthétisés, les stratégies de développement de ces inhibiteurs sont généralement orientées vers des structures mimant le substrat ou son état de transition⁴⁸. Pour certains composés, l'activité inhibitrice est parfois attribuée à de fortes interactions avec le site actif sans correspondre à un mimétisme du substrat ou son état de transition.⁴⁹

Dans cette partie, nous avons choisi de présenter quelques exemples d'inhibiteurs significatifs de glycosidases sous forme de familles regroupés selon leurs propriétés structurales en deux catégories: les inhibiteurs mimétiques et les inhibiteurs non-mimétiques.

4.3.1. Les inhibiteurs mimétiques :

4.3.1.1. L'acarbose et ses analogues :

L'acarbose est un pseudotétracosaccharide, isolé dans les années 70 d'une souche bactérienne d'Actinoplanes. Ce composé qui mime le maltotetraose, possède une unité aminocyclitol insaturée liée à un aminodidésoxyglucose, lui-même lié à un maltose (Figure 17) connu comme un puissant inhibiteur d' α -glucosidases intestinales⁵⁰. A ce titre, au début des années 1990 il a été le premier inhibiteur d' α -glucosidases commercialisé sous le nom Glucor® ou Glucobay® par la société Bayer pour le traitement du diabète de type II⁵¹.

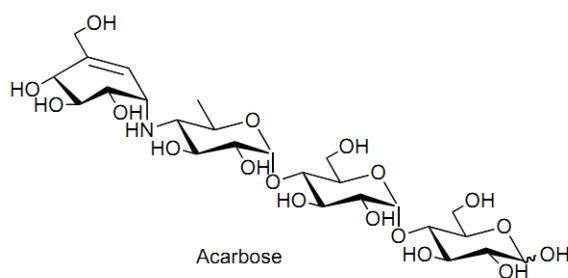


Figure I. 17. Structure chimique de l'acarbose.

La présence de plusieurs caractéristiques en commun entre l'unité aminocyclitol insaturée de l'acarbose et l'état de transition du substrat permet une haute affinité avec le site actif ce qui est à l'origine de l'activité inhibitrice importante de ce composé vis-à-vis l' α -glucosidase. Cet aminocyclitol insaturé appelé valiénamine (figure 18) isolés d'une souche de *Streptomyces lygrosopicus*, est lui même un bon inhibiteur d' α -glucosidases intestinales⁵². Des composés analogues de la valiénamine tels que la validamine et la valioline, isolés

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

de la même fermentation de microorganismes ont également présenté une bonne activité inhibitrice, (figure 18)⁵³. Il existe également d'autres analogues synthétisés tel que le Voglibose (figure 18) qui est un inhibiteur puissant d' α -glucosidases et actuellement commercialisé sous le nom Basen® par la société Takeda pour le traitement du diabète de type II^{54, 55}.

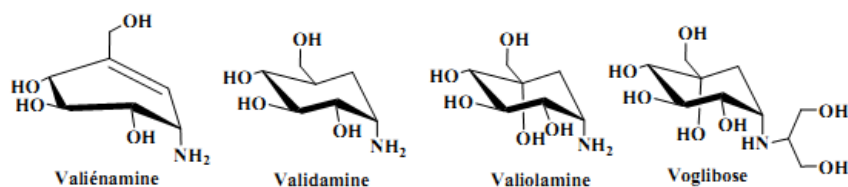


Figure I. 18. Structures chimiques de Valiénamine, Validamine, Valiolamine et de Voglibose.

De même, certains pseudooligosaccharide analogues de l'acarbose ont été étudiés, tels que, la validoxylamine A, la validamycine A et l' α -méthylacarviosine (figure 19). Ce dernier a montré une excellente activité inhibitrice vis-à-vis des α -glucosidases intestinales^{54, 56}.

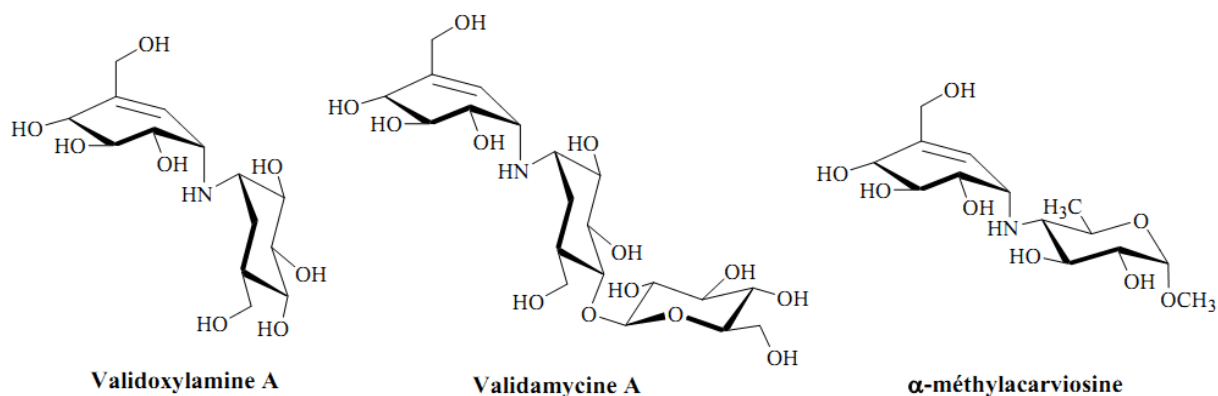


Figure I. 19. Structures chimiques de validoxylamine A, validamycine A et de l' α -méthylacarviosine.

4.3.1.2. Les aminosucres et leurs analogues :

Partant du même principe de mimisme, la classe des inhibiteurs à base d'aminosucres a été développée en remplaçant l'oxygène endocyclique d'un monosaccharide par un atome d'azote qui sera protoné en mimant l'état de transition du substrat à pH physiologique lors du processus catalytique⁵⁷. En 1967, la nojirimycine (figure 20) isolée d'une souche de *Streptomyces nojiriensis*, a été découverte en tant qu'un premier aminosucre naturel présentant une bonne inhibition pour les α - et les β -glucosidases. Cependant ce composé est instable à cause de la présence du groupement hydroxyle porté par le carbone C1^{49, 58}.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Depuis, plusieurs "désoxynojirimicine" ont été isolés et synthétisés pour former une nouvelle classe "d'aza-glycomimétiques" ayant une bonne activité inhibitrice vis-à-vis de certaines glycosidases^{24, 59-61}. Parmi ces composés, la N-hydroxyéthyl-1-désoxynojirimycine ou "Miglitol" (figure 20) en tant qu'un inhibiteur puissant d' α -glucosidases intestinales⁶², a été mis sur le marché sous le nom Diastabol® par la société Sanofi-Aventis pour le traitement du diabète de type II. On peut également citer le Zavesca/Miglustat, un analogue du miglitol possédant une chaîne butyle, prescrit pour combattre la maladie de Gaucher en inhibant la glycosyltransférase⁶³.

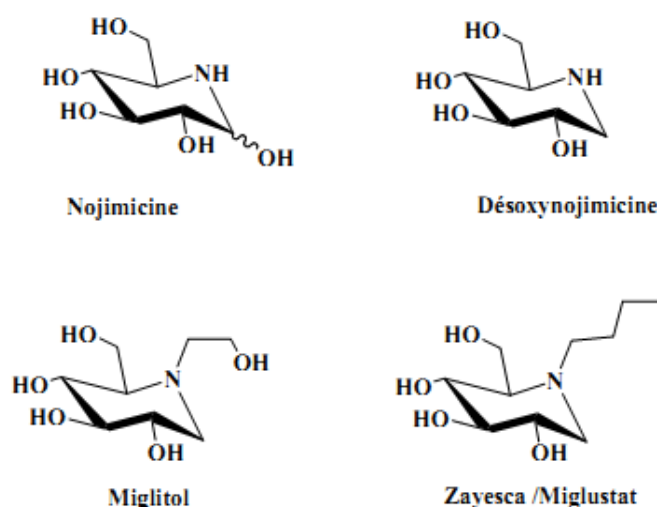


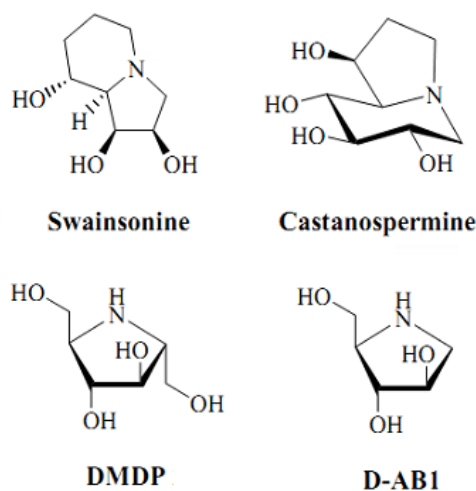
Figure I. 20. Structures chimiques de quelques aminosucres et analogues inhibiteurs de glycosidases.

Les aminosucres inhibiteurs de glycosidases existent également sous d'autres formes, autre que forme pyranique. A titre d'exemple, on peut citer le swainsonine et le castanospermine (figure 21) ayant une forme bicyclique, le premier est un bon inhibiteur d' α -mannosidase II impliquée dans la maturation des glycoprotéines^{64, 65}, et le deuxième est un inhibiteur d' α -glucosidase⁶⁶ qui se révèle très intéressant contre la maladie de *dengue* en inhibant l' α -glucosidase de réticulum endoplasmique ce qui pourrait empêcher la propagation du virus⁶⁷.

En revanche, quelques composés glycomimétiques sous forme furaniques ont également prouvé leur effet inhibiteur sur certaines glycosidases sélectives pour les sucres à six chaînons. A titre d'exemples, nous citons la 2,5-dihydroxyméthyl-3, 4-dihydropyrrolidine "DMDP" (figure 21), un très bon inhibiteur d' α -glucosidases et de β -

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

galactosidases⁶², connue principalement pour son inhibition de fructofuranosidases⁶⁸, de même, le 1,4-didésoxy-1,4-imino-D-arabinitol "D-AB1" analogue de D-arabinofuranose (figure 21), qui est également un excellent inhibiteur d' α -glucosidases avec une meilleure sélectivité que la DMDP⁶².



FigureI. 21. Structures chimiques de quelques aminosucres et analogues inhibiteurs de glycosidases avec des formes bicyclique et furanique.

4.3.1.3. Salacinol et katalanol :

Le Salacinol, le Katalanol (figure 22) ont été isolés à partir de certaines plantes médicinales de Salacia : *Salacia reticulata*, *Salacia oblonga* et *Salacia chinensis*, prescrites depuis longtemps dans la phytothérapie pour le traitement de plusieurs maladie telle que le diabète⁶⁹. Ces composés et leurs dérivés isolés et synthétisés sont identifiés comme une nouvelle classe d'inhibiteurs puissants de glycosidases avec une excellente sélectivité vis-à-vis des α -glucosidases^{70,71}. Cette sélectivité à été expliquée par leur structure zwitterionique comprenant un ion sulfonium endocyclique, qui peut être considéré comme mimant l'oxygène endocyclique de l'état de transition chargé positivement en réagissant de la même façon qu'une amine déportonnée (chez les inhibiteurs aza-glycomimétique) avec les résidus du site actif⁷².

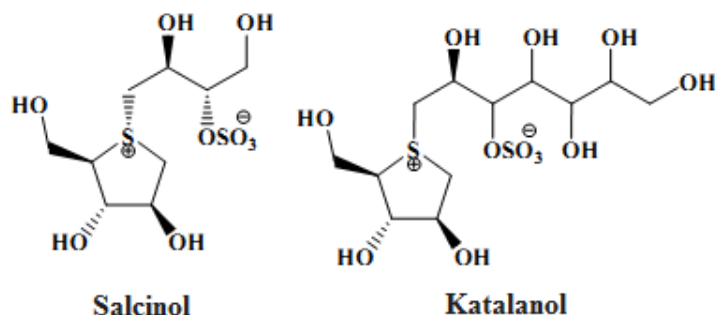


Figure I. 22. Structures chimiques de salacinol et katalanol.

4.3.2. Les inhibiteurs non-mimétiques :

4.3.2.1. Flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des substances très répandues dans la nature ayant principalement un effet antioxydant⁷³⁻⁷⁵. Leurs structures sont représentées avec un squelette de base polyphénol, dont un noyau benzénique est fusionné avec un pyrane hétérocyclique ou un noyau pyrone, qui en position 2 ou 3 porte un anneau de phényle (figure 23). L'identification de milliers de dérivés de flavonoïdes isolés à partir des plantes, a permis la répartition de ces composés en plusieurs sous-familles selon leurs structures chimiques, telles que les flavonols, les flavanones, les flavones et isoflavones et les anthocyanes (figure 23)⁷⁶.

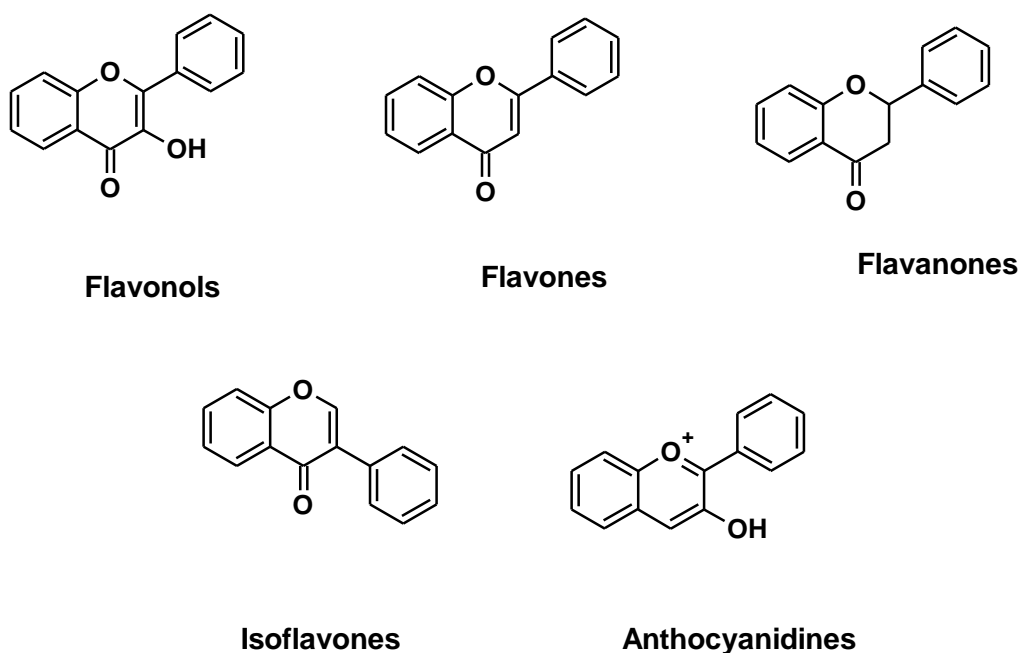


Figure I. 23. Structures chimiques des principales sous-familles de flavanoïdes.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

Mis à part leur effet antioxydant, certains flavonoïdes isolés et synthétisés ont suscité un grand intérêt en raison de leur effet bénéfique prouvé sur la santé humaine en présentant des propriétés pharmacologiques variées telles que : l'effet anti-inflammatoire⁷⁷, antitumorale^{78, 79}, oestrogénique⁸⁰ et notamment dans le traitement de certains troubles métaboliques comme l'obésité et le diabète⁸¹.

Cet effet antidiabétique a été interprété dans la littérature par le pouvoir inhibiteur de ces composés et de leurs dérivés vis-à-vis des glycosidases et notamment l'inhibition des α -glucosidases intestinales par certains flavonoïdes tels que le vitexine et l'isovitexine (figure 24), isolés à partir de l'extrait éthanolique du haricot Azuki (*vignaangularis*)⁸² ainsi que le dolichandroside et l'aloèsaponrine, isolés à partir de *dolichanronefalcata* qui ont montré une activité inhibitrice à la fois sur l' α -glucosidase intestinale et sur celle de levure⁸³.

Par contre, d'autres dérivés tel que le coumestrol, identifié dans les feuilles de soja, ayant un effet inhibiteur puissant sur l' α -glucosidase de levure, pour lequel aucune donnée n'a été signalée prouvant son pouvoir inhibiteur sur les α -glucosidases intestinales⁸⁴.

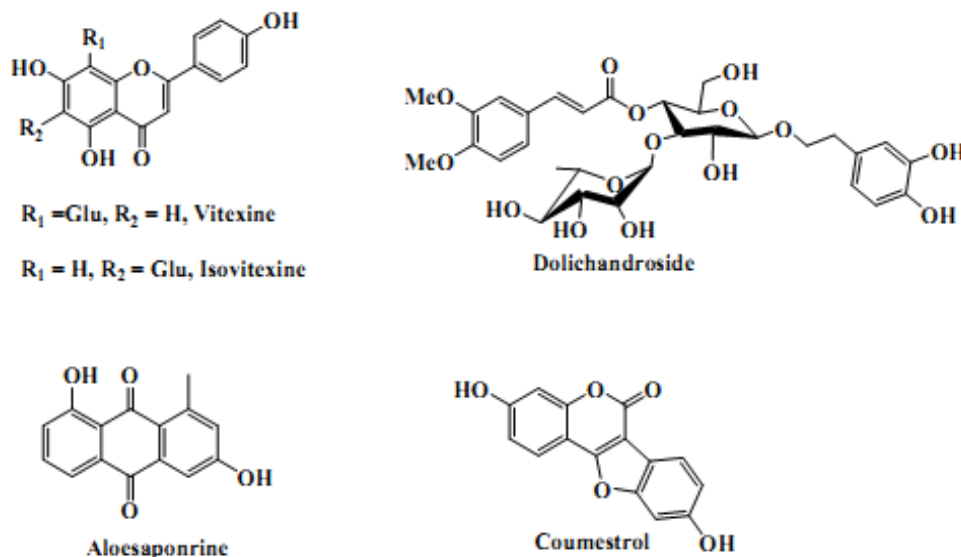


Figure I. 24. Structures chimiques de quelques dérivés de flavanoïdes d'origine naturelle inhibiteurs d' α -glucosidases

Il existe également des précurseurs de flavonoïdes abondants dans les plantes comme les chalcones⁸⁵. Ces composés présentent plusieurs effets pharmacologiques, telles que l'activité anti-inflammatoire⁸⁶, anticancéreuse⁸⁷, anti-HIV⁸⁸ ainsi qu'une activité inhibitrice puissante sur l' α -glucosidase. Certains chalcones isolés à partir des plantes comme

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

l'Angelicakeiskei, le xanthoangelol, le isobavachalcone et le 4-hydroxyderricine (figure 24) ont montré une inhibition sélective pour la maltase de levure^{84, 89}. De même, des chalcones synthétisés tels que les aminochalcones (figure 25) ont également constitué une classe d'inhibiteurs de glycosidases ayant le pouvoir d'agir spécifiquement sur l' α -glucosidase, l' α -amylase et la β -amylase⁹⁰. En particulier, les chalcones sulfonamides avaient montré des activités inhibitrices de l' α -glucosidase plus puissantes que celles des chalcones aminés ce qui a permis de construire une nouvelle classe d'inhibiteurs d' α -glucosidase hautement spécifiques à base de chalcones^{90, 91}.

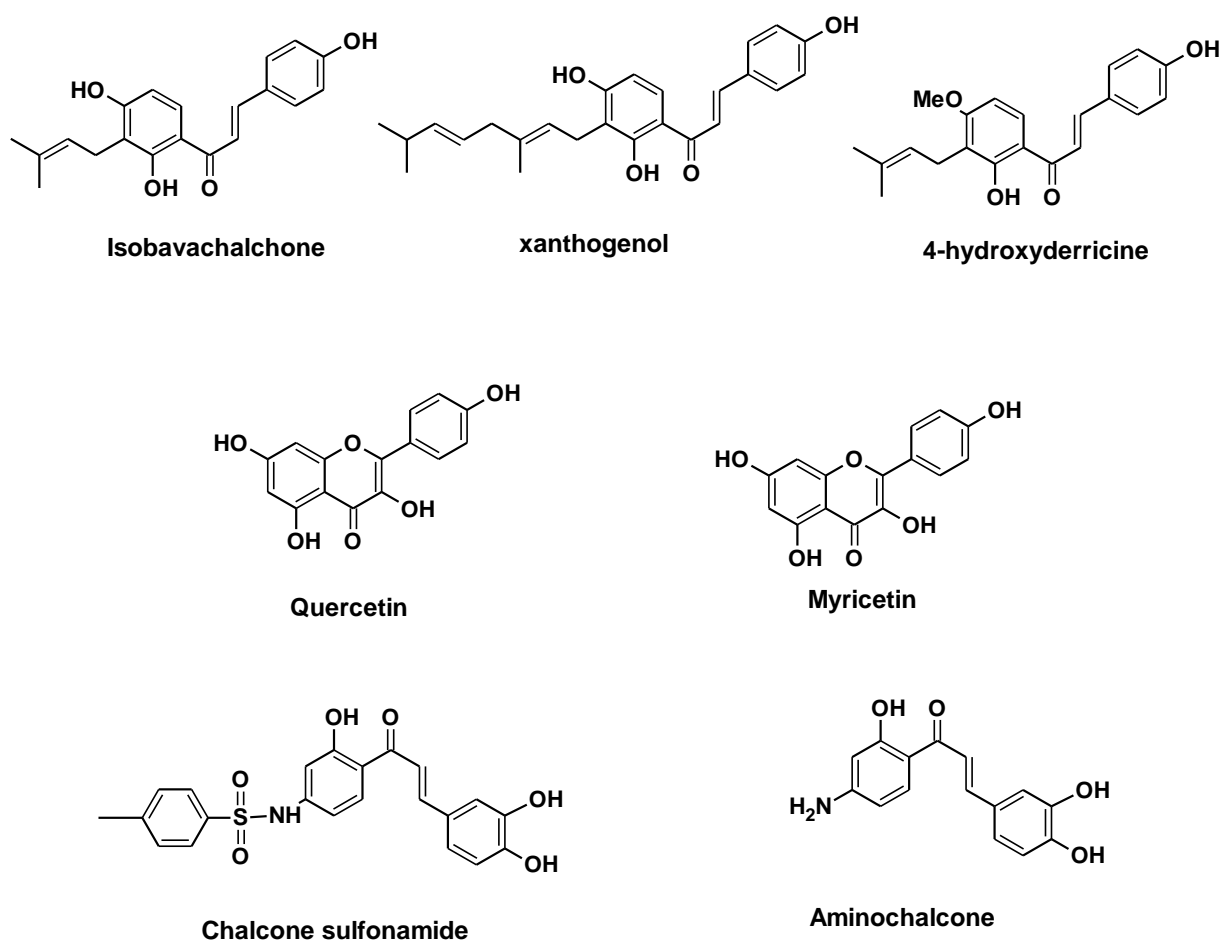


Figure I. 25. Structures chimiques de quelques dérivés de Chalcones inhibiteurs d' α -glucosidases.

4.3.2.1. Les xanthones :

Les xanthones et leurs dérivés sont largement répandus dans la nature et sont isolés à partir de plusieurs sources naturelles telles que les lichens, les champignons et d'autres

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

plantes⁹²⁻⁹⁴. Ils représentent une classe de polyphénols hétérocycliques possédant un dibenzo- γ -pyrone comme squelette de base (figure 26).

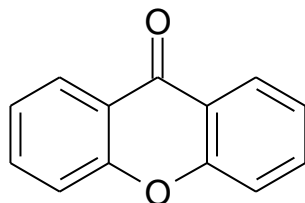


Figure I. 26. Structure chimique du squelette de base des xanthones.

Ces dernières années, le développement des dérivés de xanthones a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche dans le but d'isoler et de synthétiser de nouveaux dérivés biologiquement actifs⁹⁵. Ces composés ont manifesté plusieurs effets biologiques et médicaux très importants tels que l'activité antioxydante^{96, 97}, antibactérienne⁹⁸, anti-inflammatoire⁹⁹, anticancéreuse^{100, 101}, anti-coagulant/anti-plaquette¹⁰², anti-champignons¹⁰³ et sont notamment connus en tant qu'anti-hyperglycémique grâce à leur potentiel d'agir sur l' α -glucosidase¹⁰⁴⁻¹⁰⁶.

Les xanthones synthétisés ainsi que ceux isolés des plantes et des champignons peuvent être classés, selon leurs structures chimiques, en quelques sous-familles. Principalement, les xanthones oxygénés, les benzo-xanthones, les xanthones glycosides, les xanthones prenylées et les xanthonolignols⁹⁵.

4.3.2.1.1. Les xanthones oxygénés :

Comme l'indique leur nom, ces composés possèdent un ou plusieurs substituants oxygénés dont les plus étudiés sont les xanthones polyhydroxylés pour leur large distribution dans plusieurs plantes médicinales comme l'hypericum chinense, *Garcinia xanthochynus*, *Polygala japonica*, *Polygala crotalarioides*, *Securidaca inappendiculata* et *Garcinia cowa*⁹⁵. Étant isolés ou synthétisés, ces dérivés mono, di ou poly-oxygénés, ont montré plusieurs effets biologiques intéressants tels que, à titre d'exemple (figure 27), l'effet thérapeutique sur des maladies cardiovasculaires du 1,3,6,7-Tetrahydroxy xanthone¹⁰⁷, l'effet antidiabétique du Bellidifolin¹⁰⁶, l'effet antioxydant du 1,7-dihydroxy-2,3,8-triméthoxyxanthone¹⁰⁸, l'effet hépato-protectif du 3,4-dihydroxy-2-méthoxyxanthone et 2,3-dihydroxy-4-méthoxyxanthone¹⁰⁹ ainsi que l'activité anti-plaquette et anti-hypertensive de certains alkoxy-xanthones¹¹⁰.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

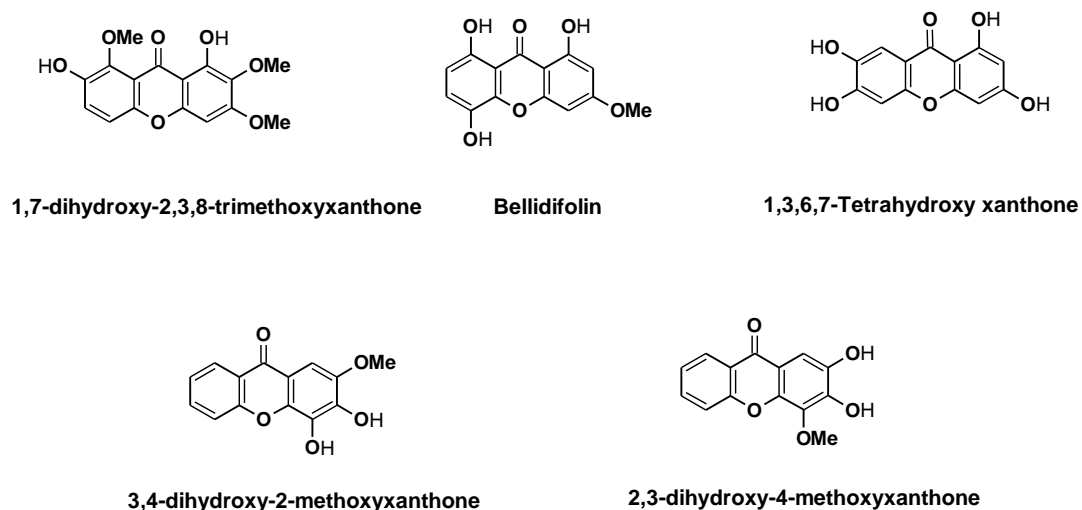


Figure I. 27. Structures chimiques de quelques xanthonés oxygénés biologiquement actifs

En 2006, le potentiel de certains flavonoïdes d'agir de manière sélective sur l' α -glucosidase ainsi que la similarité structurale entre ces derniers et les xanthonés ont inspiré Yan Liu et ses collègues pour synthétiser une série de xanthonés oxygénés y compris plusieurs xanthonés hydroxylés (figure 28), afin d'évaluer leurs activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -glucosidase. Cet étude a montré une activité inhibitrice excellente des xanthonés polyhydroxylés par rapport à celle des autres xanthonés oxygénés qui s'est révélée moins intéressante¹⁰⁴. Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par des études évaluant la relation quantitative structure-activité (QSAR)^{94, 111}.

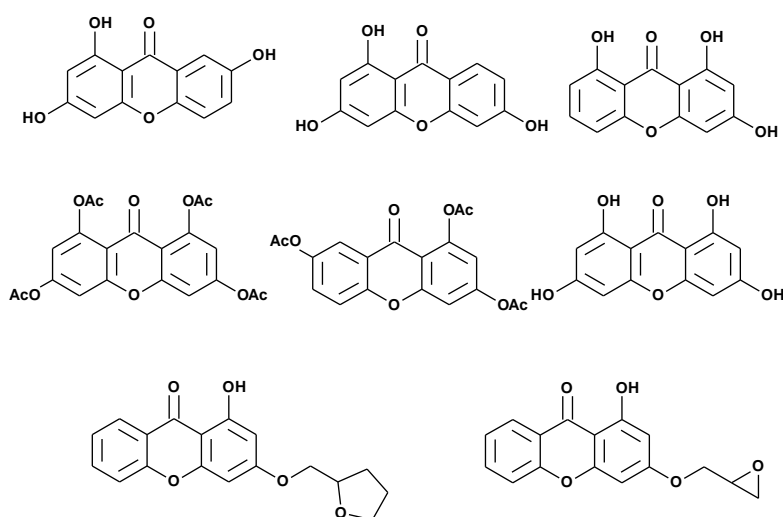
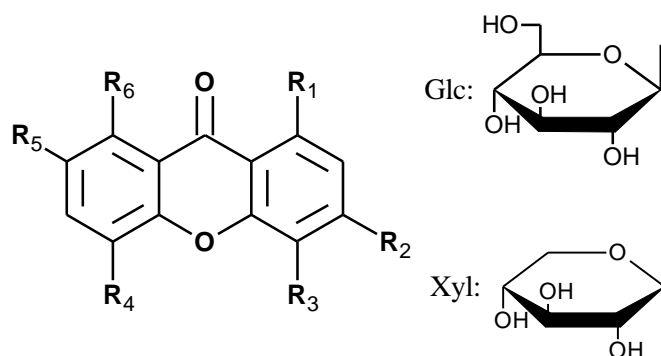


Figure I. 28. Structures chimiques de quelques xanthonés oxygénés inhibiteurs d' α -glucosidase.

4.3.2.1.2. Les xanthone glycosides :

Largement répandus dans la nature, ces composés sont isolés principalement à partir des plantes médicinales manifestant plusieurs activités pharmacologiques. Les xanthonnes glycosides peuvent être distingués, selon la nature de la liaison xanthone-glycoside, en xanthonnes O-glycosides et xanthonnes C-glycosides.

- **Les xanthonnes O-glycosides :** Ces composés isolés à partir des plantes possèdent une partie glycoside attachée au squelette dibenzo- γ -pyrone par une liaison C-O. Certains xanthonnes O-glycosides tels que les Kouitchensides (1-4) (figure 29), étant facilement hydrolysables dans un milieu acide ou enzymatique, ont montré de bonne à excellente affinité vis-à-vis l' α -glucosidase. Ces composés ont été isolés de la plante médicinale *Swertia Kouitchensis Franch (Gentianaceae)* largement répandue en chine et connue en médecine traditionnelle pour son effet antidiabétique grâce à sa capacité de contrôler l'hyperglycémie postprandiale en inhibant l' α -glucosidase¹¹².



Kouitchenside 1 (R₁: O-glc(6-1)-xyl, R₂: OCH₃, R₃: OCH₃, R₄: H, R₅: OCH₃, R₆: OCH₃)

Kouitchenside 2 (R₁: O-glc(6-1)-xyl, R₂: OCH₃, R₃: H, R₄: OCH₃, R₅: H, R₆: OCH₃)

Kouitchenside 3 (R₁: O-glc(6-1)-xyl, R₂: OCH₃, R₃: H, R₄: OCH₃, R₅: OCH₃, R₆: OCH₃)

Kouitchenside 4 (R₁: OH, R₂: O-glc(6-1)-xyl, R₃: OCH₃, R₄: OCH₃, R₅: H, R₆: OH)

Kouitchenside 5 (R₁: OH, R₂: OCH₃, R₃: H, R₄: OH, R₅: H, R₆: O-glc)

Figure I. 29. Structures chimiques de quelques xanthonnes O-glycosides inhibiteurs d' α -glucosidases.

- **Les xanthonnes C-glycosides :** sont des analogues stables des xanthonnes O-glycosides ayant plus de résistance pour l'hydrolyse en milieu acide ou enzymatique, dont le substituant glycosidique est attachée au squelette dibenzo- γ -pyrone par une liaison C-C. Mangiferin et ses analogues isomangiferin et homomangiferin (figure 30) ont été les premiers xanthonnes C-glycosides extraits à partir de *Mangifera indica (Anacardiaceae)*¹¹³⁻¹¹⁵, à montrer plusieurs

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

effets pharmacologiques (antioxydant, anti-inflammatoire, anti-tumoral, antimicrobien, antiviral, et antidiabétique) avec de très faibles toxicités^{116, 117}, ce qui a favorisé le profil pharmacologique des xanthones C-glycosides pour être considérés comme une classe importante de médicaments candidats. Ces xanthones C-glycosides et d'autres analogues ont été synthétisés¹¹⁶ ou identifiés à partir d'autres plantes médicinales, comme la *Swerita Kouitchensis*, *Hypericum canariense* L (*Hypericaceae*) et l'*Aquilaria sinensis*, en tant qu'excellents inhibiteurs d' α -glucosidases^{105, 112, 118, 119}.

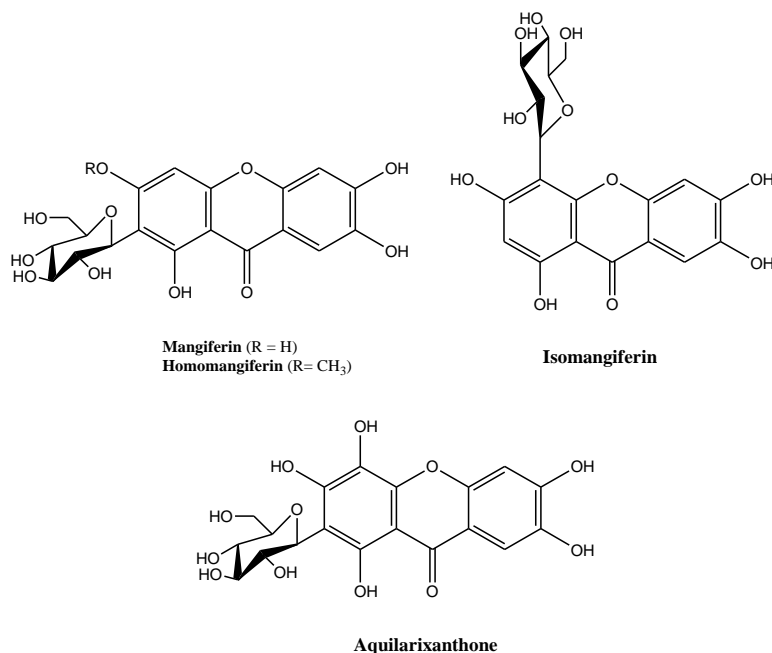


Figure I. 30. Structures chimiques de quelques xanthones C-glycosides inhibiteurs d' α -glucosidases.

4.3.2.1.2. Prenylated xanthones :

Cette classe de xanthones regroupe les xanthones substitués par des groupements de pentenyle et geranyle, les oxyprenylated xanthones, pyrano-xanthones et les furano-xanthones¹²⁰. Les analogues synthétisés ainsi que ceux isolés ont été identifiés comme des composés prometteurs pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques et notamment le développement des anti cancéreux¹²¹.

En 2011, Hyung Won Ryu et ses collègues ont identifié une série de prenylated xanthones à partir des fruits de *Garcinia mangostana* manifestant une activité anti-hyperglycémique par la diminution de l'absorption postprandiale ce qui a été confirmé avec l'évaluation de leur potentiel d'agir sur l' α -glucosidase¹²². Un an plus tard, une autre série de

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

prenylated xanthones inhibiteurs d' α -glucosidases a été identifié à partir des tiges de *Garcinia nobilis*¹²³.

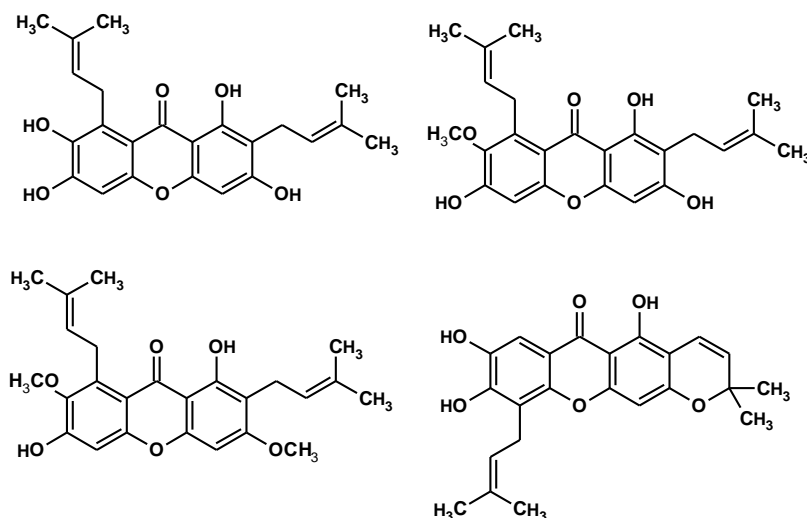


Figure I. 31. Structures chimiques de quelques prenylated xanthones inhibiteurs d' α -glucosidase.

4.3.2.1.2. Les benzoxanthones :

Ces composés possèdent un ou plusieurs noyaux benzéniques fusionnés avec le squelette dibenzo- γ -pyrone conduisant à une extension du système conjugué, cette extension a été identifié à l'origine de l'excellente inhibition des benzoxanthones vis-à-vis de l' α -glucosidase^{124, 125}.

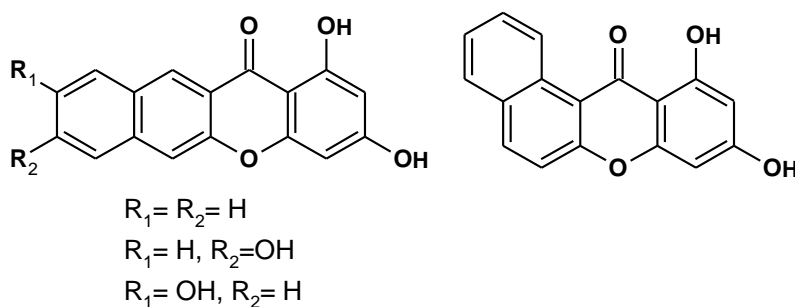


Figure I. 32. Structures chimiques de quelques benzoxanthenes inhibiteurs d' α -glucosidases

Références Bibliographiques

1. Hansch, *Acc. Chem. Res*, 1969, **2**, 232-239.
2. L. Stryer, 1992, **Médecine-Sciences Flammarion**.
3. S. David, *Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres*, 1995, **InterEditions / CNRS Editions**, 58-61.
4. A. Quaroni and G. Semenza, *J Biol Chem*, 1976, **10**, 3250-3253.
5. N. G. Asp, *Am J Clin Nutr*, 1995, **61**, 930-937.
6. Lennarz, *W. J. Biochemistry*, 1987, **26**, 7205-7210.
7. D. E. Koshland, *Biological Reviews*, 1953, **28**, 416-436.
8. M. L. Sinnott, *Chem. Rev*, 1990, **90**, 1171-1202.
9. A. Vasella, G. J. Davies and M. Böhm, *Curr. Opin. Chem. Biol*, 2002, **6**, 619-629.
10. E. MONTEL, Thèse de doctorat, Université Joseph FOURIER - Grenoble 1, France, 2006.
11. S. W. J. McCarter, *CurrOpin. Struct. Biol*, 1994, **4**, 885-892.
12. B. H. G. Davies, *Structure*, 1995, **3**, 853 - 859.
13. F. C. BRES, Thèse de Doctorat, Université BLAISE PASCAL, France, 2010.
14. R. G. Q. Wang, D. Trimbur, R. A. J. Warren, S. G. Withers,, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 11594-11595.
15. B. E. J. Davies, M. Jenney, J. Gregory, *J. Clin. Endocrinol.Metab*, 2003, **88**, 6088-6097.
16. D. J. V. B. L. Mark, S. Knapp, B. L. Triggs-Raine, S. G. Withers, *J. Biol. Chem*, 2001, **276**, 10330-10337.
17. S. W. C. Rye, *Curr.Opin. Chem. Biol*, 2000, **4**, 573-580.
18. B. Saha, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 2003, **30**, 279-291.
19. A. V. V. Yip, G. Davies, S. Rajan, X. Yang, J. Thompson, W. Anderson, S. Withers, *J. Am. Chem. Soc*, 2004, **126**, 8354- 8355.
20. V. M.-A. D. G. J. Davies, A. Varrot, D. L. Zechel, *Biochem. Soc. Trans*, 2003, **31**, 523-527.
21. L. M. G. J. Davies, A. Varot, M. Dauter, A. M. Brzozowski, M. Schülein, S. G. Withers, *Biochemistry*, 1998, **37**, 11707-11713.
22. E. B. M. R. Stam, P.M. Coutinho, B. Henrissat, *Carbohydr. Res*, 2005, **340**, 2728-2734.
23. G. D. R. V.V.S. Rajendra Prasad, D. Appaji, G.J. Peters, Y.C. Mayur, *J. Mol. Graph. Model*, 2013, **40**, 116-124.
24. G. Placier, Thèse doctorat. Université de Nantes, France, 1999.
25. M. R. Stam, Thèse doctorat de l'Université Aix-Marseille1, France,, 2006.
26. M. C. B. Henrissat, P. Tomme, L. Lemesle, J. P. Mornon, *Gene* 1989, **81**, 83-95.
27. Y. Saihi, thèse de doctorat. Aniversité Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 2015.
28. B. Henrissat, *Biochem. J*, 1991, **280**, 309-316.
29. A. M. L. C. Chothia, *EMBO. J*, 1986, **5**, 823-826.
30. A. B. B. Henrissat, *Biochem J*, 1993, **293**, 781-788.
31. S. E. H. B. Henrissat, M. D. Yoder, S. E. Lietzke, F. Jurnak, *Plant Physiol*, 1995, **107**, 963-976.
32. B. H. P. D. Kim, B. W. Jung, M. k. Kim, S. I. Hong, D. S. Lee *Int. J. Mol. Sci*, 2006, **7**, 571-589.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

33. E. G. J. D. M. R. Stam, C. Rancurel, P. M. Coutinho, B. Henrissat, *Prot. Engineering Design Selection*, 2006, **19**, 555-562.
34. Y. L. G. D. Brayer, S. G. Withers, *Protein Sci*, 1995, **4**, 1730-1742.
35. S. J. E. A. MacGregor, B. Svensson, *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1546**, 1-20.
36. H. A. B. E. H. Van Beers, R. J. Grand, A. W. Einerhand, J. Dekker, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995, **30**, 197-262.
37. E. A. B. H. J. Flint, M. T. Rincon, R. Lamed, B. A. White, *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6**, 121-131.
38. M. L. M. L. Michaelis, *Biochem J*, 1993, **49**, 333-369.
39. C. M. G. R. GARRETT, « *Biochimie* » De Boeck, 2ème Edition américaine. Paris, 2000.
40. M. J. A. CORNISH-BOWDEN, V. SAKS, « *Cinétique enzymatique* » Grenoble Science, Portland press, Ltd. London, . 2004.
41. A. RAISONNIER, « *Enzymologie élémentaire* » PCEM2, Université Pierre et Marie Curie, 2002.
42. I. S. G. Bjelaković, G. B. Bjelaković, D. Pavlović, G. Kocić, A. Daković, *Med. Bio*, 2002, **9**, 201 - 206.
43. C. d. i. d. r. e. (<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/4EnzymologieLicence/3CoursINHIBITEURS/1CoursInhibition.h and c. l. f. tm>).
44. h. c. b.-l. w. c. Cours de cinétique enzymatique, consulté le 18 février 2016. .
45. M. DIXON, *Biochem. J*, 1953, **55**, 170-171.
46. B. TOUSSAINT, 2010.
47. D. Z. K. M. B. Čolović, T. D. Lazarević-Pašti, A. M. Bondžić, V. M. Vasić, *Curr. Neuropharm*, 2013, **11**, 315-335.
48. H. H. J. V. H. Lillelund, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev*, 2002, **102**, 515-553.
49. M. N. S. G. Withers, R. Mosi, dans *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* Stütz, A. E., 1999, **Wiley-VCH**, 188-206.
50. W. F. E. Truscheit, B. Junge, L. Müller, D. D. Schmidt, W. Wingender, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 1981, **20**, 744-761.
51. A. J. S. P.J. Lefebvre, *Eur. J. Clin. Invest*, 1994, **24**, 40-44.
52. Y. F. X. Chen, Y. Zheng, Y. Shen, , *Chem. Rev*, 2003, **103**, 1955-1977.
53. N. A. Y. Kameda, M. Yoshikawa, M. Takeuchi, T. Yamaguchi, K. Matsui, S. Horii, H. J. Fukase, *Antibiot*, 1984, **37**, 1301-1307.
54. H. F. S. Horii, T. Matsuo, Y. Kameda, N. Asano, K. Matsui, *J. Med. Chem*, 1986, **29**, 1038-1046.
55. N. Asano, *Glycobiology*, 2003, **13**, 93-104.
56. M. T. N. Asano, Y. Kameda, K. Matsui, Y. J. Kono, *Antibiot*, 1990, **43**, 722-726.
57. G. W. J. F. A. A. Watson, N. Asano, R. J. Molyneux, R. J. Nash, *Phytochemistry*, 2001, **56**, 265-295.
58. T. T. S. Inouye, T. Ito, T. Niida *Tetrahedron*, 1968, **24**, 2125-2144.
59. E. J. G. Legler, *Carbohydr. Res*, 1984, **128**, 61-72.
60. K. O. N. Asano, H. Kizu, K. Matsui, *J. Med. Chem*, 1994, **37**, 3701-3706.
61. I. S. H. Paulsen, K. Heyns *Chem. Ber*, 1967, **100**, 802-811.
62. H. K. K. Yasuda, T. Yamashita, Y. Kameda, A. Kato, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, R. J. Molyneux, , N. Asano, *N. J. Nat. Prod*, 2002, **65**, 198-202.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

63. G. R. N. F. M. Platt, R. A. Dwek, T. D. Butters, *J. Biol. Chem*, 1994, **269**, 8362-8365.
64. T. M. H. D. R. P. Tulsiani, O. Touster, *J. Biol. Chem* 1982, **257**.
65. M. J. G. G. Fleet, P. W. Smith, *Tetrahedron Lett*, 1984, **25**, 1853-1856.
66. L. E. F. R. J. Nash, G. Dring, G. W. J. Fleet, A. Girdhar, N. G. Ramsden, J. M. Peach *Phytochemistry*, 1990, **29**, 111-114.
67. T. C. P. K. Whitby, B. Geiss, K. Lane, E. Engle, Y. Zhou, R. W. Doms, M. S. Diamond, *J. Virol*, 2005, **79**, 8698-8706.
68. M. H. F. C. W. Ekhart, P. Hadwiger, E. Mlaker, A. E. Stütz, A. Tauss, T. M. Wrodnigg, *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors* ;, 1999, **Wiley-VCH**, 253-390.
69. T. M. H. Matsuda, K. Yashiro, J. Yamahara, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull*, 1999, **47**, 1725-1729.
70. N. M. W. d. A. M. H. S. ayawardena, V. Hettigoda, D. J. S. Fernando, *J. Ethnopharmacology*, 2005, **97**, 215-218.
71. H. H. J. B. D. Johnston, B. M. Pinto *J. Org. Chem*, 2006, **71**, 1111-1118.
72. D. R. R. Slim. L, *Biochemistry*, 2010, **49**, 443-451.
73. M. H. Pan, C. S. Lai, C. T. andHo, *Food. Funct*, 2010, **1**, 15-31.
74. H. C. J. B. Xiao, Y. F. Wang, K. Yamamoto, X. L. Wei, *Mol. Nutr. Food. Res*, 2010, **54**, S253-S260.
75. T. T. C. J. B. Xiao, H. Cao, L. Chen, F. Yang, *Mol. Nutr. Food Res*, 2011, **55**, 310-317.
76. B. P. W. Brand, P. J. van Bladeren, G. Williamson, I. M. C. M. Rietjens, *54*, 2010, **Mol. Nutr. Food Res**, 851-860.
77. J. C. D. E. Papa, *P. Gramatica Chemospher*, 2007, **67** 351-358.
78. S. A. M. . Université de Constantine, 2003.
79. C. E. Cassidy and W. N. Setzer, *J. Mol. Model*, 2010, **16**, 311- 326.
80. H. K. M. Kitaoka, M. Sugano, A. Ichakawa; M. Taki, S. Takaishi, Y. Iijima, S. Tsutsumi, M. Boriboom, T. Akiyama, *Planta Medica*, 1998, **64**, 511-515.
81. M. A. Z. S. I. Rizvi, *Clinic. Chim. Acta*, 2005, **354**, 59-67.
82. X. Z. C. Y. Yao, L. X. Wang, S. H. Wang, G. X. Ren, *Inter. J. Mol. Sci*, 2011, **12**, 6445-6451.
83. A. K. T. P. Aparna, P. V. Srinivas, A. Z. Ali, V. Anuradha, , J. M. Rao, *Phytother. Res*, 2009, **23**, 591-596.
84. L. H. J. Yuk, M. J. Curtis-Long, J. W. Lee, Y. S. Kim, , H. W. Ryu, *Food Chem*, 2011, **126**, 1057-1063.
85. A. W. T. J. F. Stevens, G. B. Nickerson, Ivancic, J. Henning, A. Haunold, M. L. Deinzer, *Phytochemistry*, 2000, **53**, 759-775.
86. M. K. K. V. Sashidhara, R. K. Modukuri, R. Sonkar, G. Bhatia, A.K. Khanna, S. Rai, R. Shukla, , *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 2011, **21**, 4480-4484.
87. I. V. I. S. Aljančić, M. Jadrnin, M. Pešić, I. Đorđević, A. Podolski-Renić, S. Stojković, N. Menković, V. E. Vajs, S. M. Milosavljević, *Phytochemistry*, 2014, **98**, 90-196.
88. S. P. M. Abdel-Aziz, G. El-Din, A.A. Abuo-Rahma, M. A. Sayed, Y. Kwon, *Euro. J. Med. Chem.*, 2013, **69**, 427-438.
89. R. W. L. Luo, X. Wang, Z. Ma, N. Li, *Food Chem*, 2012, **131**, 992-998.
90. J. H. K. W. D. Seo, J. E. Kang, H. W. Ryu, M. J. Curtis-Long, H. S. Lee, M. S. Yang, K. H. Park, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 2005, **15**, 5514-5516.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

91. k. Bharatham, N. Bharatham, K. H. Park and K. W. Lee, *J. Mol. Graph. Model*, 2008, **26**, 1202-1212.
92. V. Peres and T. J. Nagem, *Phytochemistry*, 1997, **44**, 191.
93. V. Peres, T. J. Nagem and F. F. d. Oleveira, *Phytochemistry*, 2000, **55**, 683.
94. Y. Liu, Z. F. Ke, J. F. Cui, W. H. Chen, L. Ma and B. Wang, *Bioorg. Med. Chem*, 2008, **16** 7185 – 7192.
95. C. H. Yang, L. Ma, Z. P. Wei, F. Han and J. Gao, *Chinies Herbal Medecines*, 2012, **4**, 87-102.
96. H. A. Jung, B. N. Su, W. J. Keller, R. G. Mehta and A. D. Kinghorn, *J. Agri. Food. Chem*, 2006, **54**, 2077.
97. B. W. Lee, J. H. Lee, S. T. Lee, H. S. Lee, W. S. Lee, T. S. Jeong and K. H. Park, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 2005, **15**, 5548.
98. A. E. Nkengfack, P. Mkounga, M. Meyer, Z. Fomum and B. Bodo, *Phytochemistry* 2002, **61** 181-187.
99. M. I. C. C. N. Lin, S. J. Liou, T. H. Lee, J. P. Wang, *J. Pharm. Pharmacol*, 1996, **48**, 532-538.
100. Q. G. Su, Y. Liu, Y. Cai, Y. L. Sun, B. Wang and L. J. Xian, *Invest. New Drug*, 2011, **29**, 1230-1240.
101. Y. Na, *J Pharm pharmacol*, 2009, **61**, 707-712.
102. M. Correia-da-Silva, E. Sousa, B. Duarte, F. Marques, F. Carvalho and M. M. Pinto, *J Med Chem*, 2011, **54**, 5373-5384.
103. E. Pinto, C. Afonso, S. Duarte, L. Vale-Silva, E. Costa, E. Sousa and M. Pinto, *Chem. Biol. Drug. Des*, 2011, **77**, 212-222.
104. Y. Liu, L. Zou, L. Ma, W. H. Chen, B. Wang and Z. L. Xu, *Bioorg. Med. Chem*, 2006, **14**, 5683 –5690.
105. H. W. Ryu, J. K. Cho, M. J. Curtis-Long, H. J. Yuk, Y. S. Kim, S. Jang and B. W. Lee, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 2148-2154.
106. P. Basnet, S. Kadota, M. Shimizu, Y. Takata, M. Kobayashi and T. Namba, *Planta. Med*, 1995, **61**, 402-405.
107. F. N. Ko, C. N. Lin, S. S. Liou, T. F. Huang and C. M. Teng, *Eur. J. Pharmacol*, 1991, **192**, 133-139.
108. J. S. Zhang, X. M. Wang, Y. T. Gao and G. P. Li, *Asian. J. Chem*, 2011, **23**, 1966-1968.
109. E. R. Fernandez, F. L. Carvalho, F. G. Remiao, M. L. Bastos, M. M. Pinto and O. R. Gottlieb, *Pharm. Res*, 1995, **12**, 1756-1760.
110. K. W. Lin, S. W. Fang, C. F. Hung, B. J. Shieh and S. C. Yang, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci*, 2009, **342**, 19-26.
111. K. Kraim, D. Khatmi, Y. Saihi, F. Ferkous and M. Brahimi, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2009, **97**, 118-126.
112. L. S. Wan, Q. X. Min, Y. L. Wang, Y. D. Yue and J. C. Chen, *J. Nat. Prod*, 2013, **76**, 1248-1253.
113. W. Wiechowski, *Lotos*, 1908, **56**, 61.
114. P. E. Nott and J. C. Robert, *Phytochemistry*, 1967, **6**, 1597.
115. V. K. Bhatla and T. R. Seshadri, *Tetrahedron Lett*, 1968, **14**, 1741.
116. Z. Wu, G. Wei, G. Lian and B. Yu, *J. Org. Chem*, 2010, **75**, 5725-5728.
117. M. Correai-da-Silva, E. Sousa, B. Duarte, F. Marques, F. Carvalho, L. M. Cunha-Ribeiro and M. M. M. Pinto, *J. Med. Chem*, 2011, **54**, 5373-5384.
118. J. G. Diaza, P. P. d. Paz and W. Herz, *Phytochemistry Letters*, 2010, **3**, 171-175.
119. B. Prado, R. M. Rabanal and C. C. Sanchez-Mateo, *Phytother. Res*, 2002, **16**, 740-744.

Chapitre I : Les glycosidases et leurs inhibiteurs

120. R. Castanheiro, M. Pinto, S. Cravo, D. Pinto, A. Silva and A. Kijjoa, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 3848-3857.
121. N. Anantachoke, P. Tuchinda, C. Kuhakarn, M. Pohmakort and V. Reutrakul, *Pharm. Biol.*, 2012, **50**, 78-91.
122. H. W. Ryu, J. K. Cho, M. J. Curtis-Long, H. J. Yuk, S. Jung, Y. S. Kim and B. W. Lee, *Phytochemistry*, 2011, **72**, 2148-2154.
123. H. Fouotsa, A. M. Lannang, C. D. Mbazoas, S. Rasheed, B. P. Marasini, Z. Ali, K. P. Devkota and A. E. Kengfack, *Phytochemistry. Lett.*, 2012, **5**, 236-239.
124. Y. Liu, L. Zou, L. Ma, W. H. Chen, B. Wang and Z. L. Xu, *Bioorg. Med.Chem.*, 2007, **15**, 2810–2814.
125. G. L. Li, J. Y. He, A. Q. Zhang, Y. Q. Wan, B. Wang and W. H. Chen, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 4050– 4055.

Chapitre II :

Criblage virtuel : voie d'accès à des
substances médicamenteuses

1. Drug discovery: Historique et développement :

Par le passé, la transmission des savoirs ancestraux en médecine traditionnelle a été, pendant longtemps, un facteur déterminant de la découverte d'un grand nombre de médicaments. Grâce à l'identification de principes actifs extraits de substances naturelles d'origine végétale, minérale ou animale qui étaient historiquement utilisées et sélectionnées par l'observation empirique de leurs effets sur le cours des maladies, l'exploration de ces savoirs ancestraux est toujours d'actualité et constitue une discipline à part entière, l'ethnopharmacologie¹. Ainsi, la morphine a été isolée du pavot au début du XIX^{ème} siècle et ses effets sont décrits par Friedrich Wilhelm ce qui a marqué un tournant historique dans la recherche de nouveaux médicaments².

Cinquante ans plus tard, l'essor des médicaments issus de synthèses débute avec la mise au point de l'acide acétylsalicylique puis sa commercialisation plus tard sous le nom de marque « Aspirine » par les Laboratoires Bayer³. Depuis, plusieurs médicaments ont été identifiés ainsi. Cependant, la nécessité de développer d'autres sources de découverte et d'établir une démarche de recherche systématique est rapidement apparue suite aux nombreuses avancées dans le domaine de la synthèse chimique et de la pharmacologie en permettant l'élaboration de nouveaux médicaments de plus grande efficacité⁴. Les découvertes de médicaments les plus marquantes ont eu lieu au cours des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles et sont résumées dans figure 1⁵.

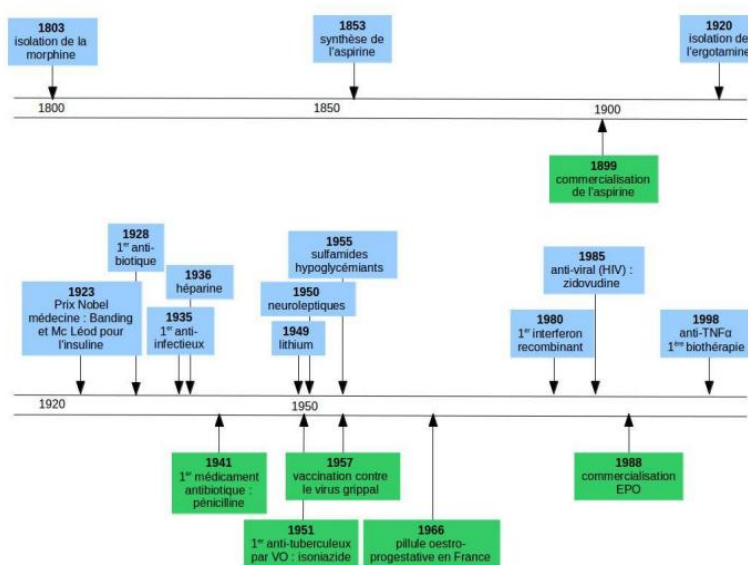


Figure II. 1. Quelques grandes étapes de la découverte de médicaments au cours du XIX^{ème} et XX^{ème} siècle

Chapitre II. Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

Avec la chimie et la pharmacologie, deux autres disciplines ont totalement révolutionné la recherche de nouveaux médicaments et abouti aux processus actuellement utilisés dans les phases précoces de recherche et développement (R&D). Il s'agit de la génétique qui a permis la rationalisation du choix et de l'utilisation de cibles biologiques définies au niveau moléculaire et de la bioinformatique avec la mise en pratique de nouveaux outils de découverte.

La découverte d'une molécule médicamenteuse « drug discovery » est un processus souvent extrêmement long, fastidieux et incertain (Figure 2). Pour chaque nouveau médicament, le temps s'écoulant entre la première étape, au cours de laquelle une cible biologique pertinente dans un processus pathologique donné est identifiée, jusqu'à la mise sur le marché d'un médicament est estimé à une moyenne de 12 à 14 ans avec un coût global minimum de 800 millions de dollars⁶.

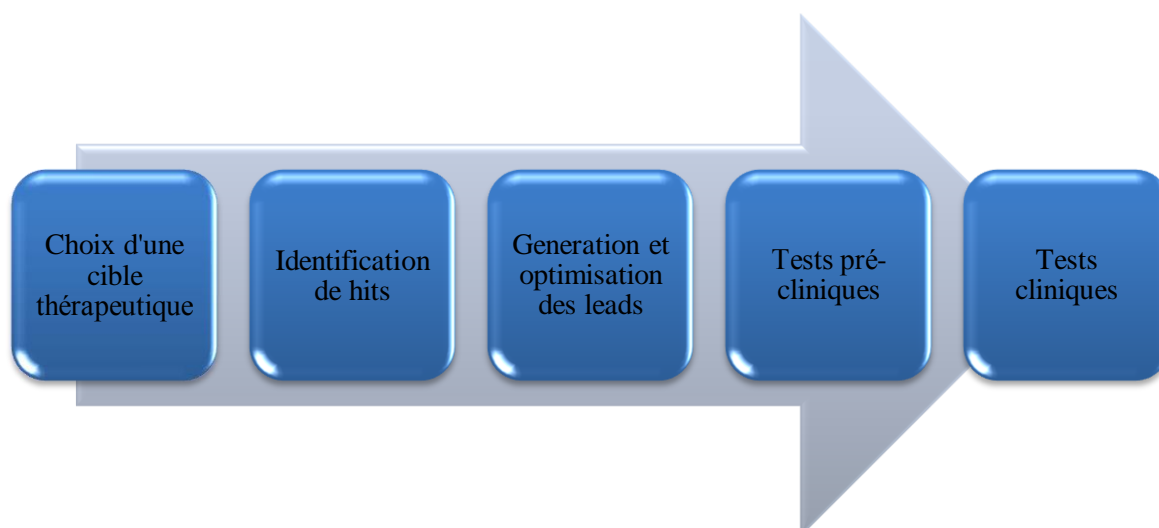


Figure II. 2. Étapes du processus de recherche et développement (R&D) des médicaments

En effet, le processus de (R&D), dans l'industrie pharmaceutique, n'est couronné de succès que pour environ une molécule sur 10000 testées. Les nouvelles méthodes permettant la découverte de nouveaux médicaments se doivent donc d'innover afin de mettre en évidence des molécules encore inconnues ayant un certain potentiel d'activité sur des cibles biologiques connues et les outils mis en place doivent être capables de guider les chimistes dans le choix des molécules à cribler et à synthétiser^{4, 7}. Ce processus suit les étapes suivantes:

1.1. Choix d'une cible thérapeutique :

Le processus de découverte d'un nouveau médicament doit logiquement débiter par la définition d'une maladie pour laquelle le défaut de traitement adapté est efficace et engendre un réel besoin médical. Il s'agit le plus souvent de pathologies touchant une grande partie de la population, largement étudiées et avec un fort potentiel commercial, comme par exemple les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, les cancers, le diabète, etc....

Une fois la maladie définie, une cible thérapeutique, à l'aide de données issues de la littérature, doit être identifiée. Cette cible est une biomolécule, en général une protéine ou un complexe protéique, impliquée dans un processus pathologique.⁸

Avant de rechercher des molécules capables d'agir sur la cible biologique identifiée, il est nécessaire de procéder à la validation de cette cible. Cette validation consiste d'une part à s'assurer de l'effet bénéfique de la modulation de la cible sur la pathologie étudiée tout en vérifiant d'autre part que les conséquences de ces altérations ne seront pas néfastes. Ces paramètres régulent ce que l'on appelle la « druggabilité » de la cible^{9, 10}.

De nombreux outils *in vitro* et *in vivo* sont utilisés lors de cette étape de validation, parmi lesquels les animaux transgéniques, les petits ARN interférents (ou *small interfering RNA* siRNA), les anticorps monoclonaux ou encore la chimogénomique (dont le but est de fournir une petite molécule pour chaque protéine codée par le génome pour explorer les fonctions cellulaires et guider la découverte de nouveaux médicaments).^{11, 12}

1.2. Identification de hits :

Dans cette seconde étape, les effets de cible en question sont modulés pour pouvoir agir favorablement sur le processus pathologique en question, et ceci par interaction avec des molécules. Ces composés ayant la capacité d'interagir avec la cible et susceptibles de moduler ses effets sont appelés des « touches » ou « hits ». Les hits sont sélectionnés par le criblage « screening » de bibliothèques de composés « chimiothèques » ciblées ou d'autres non ciblées. Le screening s'effectue, soit par le biais des tests expérimentaux, qui nécessitent le plus souvent une connaissance approfondie des systèmes étudiés. Ce type de screening, peut s'avérer très compliqué à mettre en œuvre et parfois irréalisable au vu des coûts financiers et temporels très importants, surtout lors d'un criblage à haut débit HTS «High Throughput Screening»¹³. Pour pallier ces difficultés, des techniques de criblage virtuel sur ordinateur «*in silico*» ont été développées. Ce criblage, contrairement aux tests expérimentaux, est

souvent plus aisé à mettre en œuvre, peu coûteux et relativement rapide. En revanche, ce criblage donne des résultats prédictifs qui doivent donc ensuite être impérativement validés par des tests expérimentaux, ceci représente l'inconvénient majeur de ce genre de screening.¹⁴

Par conséquent, la combinaison des deux approches de criblage est utilisée très fréquemment lors des processus actuels de R&D de nouveaux médicaments en considérant le criblage *in silico* en tant que premier filtre des chimiothèques afin d'identifier les molécules les plus prometteuses et restreindre le nombre de composés à cribler expérimentalement¹⁵.

1.3 Génération et optimisation des leads :

A ce stade, parmi les hits précédemment choisis, quelques molécules se qualifient têtes de séries ou « leads ». Les leads idéaux sont des composés plus actifs et plus sélectifs que les hits dont ils sont issus, tout en présentant des propriétés pharmacocinétiques optimales, qui vont ensuite permettre de créer des séries de composés ayant une activité démontrée sur la cible choisie¹².

L'intervention des chimistes et des chémoinformaticiens est déterminante à cette étape pour obtenir ces leads, en effectuant de vastes études de relations structure-activité (SAR) basées principalement sur la variation et la modification des groupements fonctionnels tout en gardant leurs squelettes de bases des hits. L'analyse des résultats issus de ces études SAR sont actuellement assistés par des approches bioinformatiques¹⁶, ce qui permet de guider la sélection de nouveaux leads en optimisant les propriétés favorables d'activité « drug-like » (activité, sélectivité, toxicité, propriétés physico-chimiques,...)¹⁷ tout en tentant d'améliorer l'affinité avec la cible et de prouver que l'effet biologique observé est bien induit par interaction du composé avec la cible¹⁸.

1.4 Les tests précliniques et cliniques :

Le rôle d'un chimiste au cours du processus R&D se limite dans les étapes précédemment décrites à identifier des médicaments candidats susceptibles de devenir un jour un médicament commercialisé¹⁰. Une fois les candidats identifiés, place aux tests précliniques et cliniques qui représentent les étapes les plus longues et les plus coûteuses, afin d'évaluer l'efficacité, la sélectivité et la sûreté de ces candidats.

Les tests précliniques s'effectuent sur les animaux, *in vivo*, pour assurer une analyse du métabolisme, de l'absorption et de la distribution du médicament et permettre également d'obtenir plus d'informations toxicologiques dans le but de prédire ces effets secondaires et

Chapitre II. Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

déterminer les dosages adéquats pour les essais cliniques. De nos jours, pour épargner des vies animales, ces tests sont réalisés *in vitro* en remplaçant les modèles animaux par des cellules humaines dérivant de différents tissus et organes¹². Cette étape est très importante puisque la poursuite ou non du développement des composés et leur entrée en phase clinique sont décidées à cette étape. Cette décision représente pour l'équipe de R&D une double prise de risque aux vues du grand coût financier de telles études mais aussi et surtout de la grande responsabilité incombée puisque les candidats médicaments vont être testés à l'échelle humaine.

Les tests à échelle humaine appelés «tests cliniques», constituent l'étape la plus critique et la plus longue de tout processus de R&D. Cette étape se passe en plusieurs phases en évaluant l'efficacité du candidat médicament chez l'homme, ainsi que sa pharmacocinétique et sa sécurité d'emploi pour une éventuelle mise du médicament sur le marché.

Dans une première phase, les tests sont effectués sur un faible nombre de volontaires sains pour s'assurer de la sécurité du médicament candidat en recherchant les effets secondaires qui apparaissent lors de l'administration croissante du candidat médicament et pour déterminer la dose minimale active et la dose maximale tolérable. Cette phase n'est pas autorisée quand il s'agit de molécules anticancéreuses et antibiotiques. Dans ces cas, les chercheurs passent directement à la phase II. Réalisée sur un groupe de patients malades pour évaluer l'efficacité (la biodisponibilité) du candidat, cette phase permet de déterminer la posologie du traitement et d'ajuster les dosages à prescrire en fonction des réponses obtenues des patients. Les premiers effets secondaires du médicament peuvent être également déterminés lors de cette phase, et si les effets secondaires sont trop importants le processus R&D est suspendu définitivement à cette phase. Par conséquent, seul un tiers des essais cliniques accèdent à la phase III. Celle-ci s'effectue sur une large population de malades et consiste à évaluer le potentiel thérapeutique réel du candidat médicament et établir le rapport bénéfices/risques. Les résultats sont ensuite comparés avec ceux d'un traitement de référence pour valider et confirmer l'efficacité du médicament⁵.

A la fin de ces trois phases, toutes les informations et les résultats obtenus sont rassemblées dans un dossier déposé pour obtenir une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM), et seul un candidat médicament sur dix entrent en phase clinique obtient une AMM et est commercialisé. Une fois le médicament commercialisé, une dernière phase IV débute et des tests de surveillance ou de pharmacovigilance sont mis en œuvre. Le médicament

Chapitre II. Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

administré à une large population pour révéler les effets secondaires (indésirables ou non) apparaissant plus tard dans la prise du médicament et inexplorés lors des phases précédentes pour garantir aux patients une plus grande sécurité d'utilisation¹².

2. Criblage virtuel «in silico», méthodes et alternatives :

Le terme criblage virtuel regroupe un ensemble de techniques computationnelles ayant pour objectif l'exploration de bases de composés à la recherche de molécules d'intérêt¹⁹. Une analogie souvent utilisée compare ces techniques à des filtres qui permettraient de constituer des ensembles de molécules partageant certaines propriétés, de sélectionner les plus susceptibles d'interagir avec une cible donnée et d'éliminer les composés supposés inactifs ou les molécules indésirables¹⁵.

Actuellement, le criblage virtuel est utilisé en amont du processus R&D de nouveaux médicaments (Figure 3) notamment dans les premières étapes, ce qui permet un gain important en temps et en argent. D'ailleurs, un certain nombre de médicaments mis sur le marché proviennent d'une conception rationnelle basée sur des stratégies de criblage virtuel comme, par exemple, des inhibiteurs de l'aldose réductase, obtenus suite à une recherche dans des bases de données de composés, un inhibiteur d'un élément de réponse de la transactivation de la HIV-1 RNA: obtenu après une étude docking rigide d'une base de données de composés, un inhibiteur de la thrombine: obtenu après une étude docking sur des chimiothèques combinatoires^{20, 21}

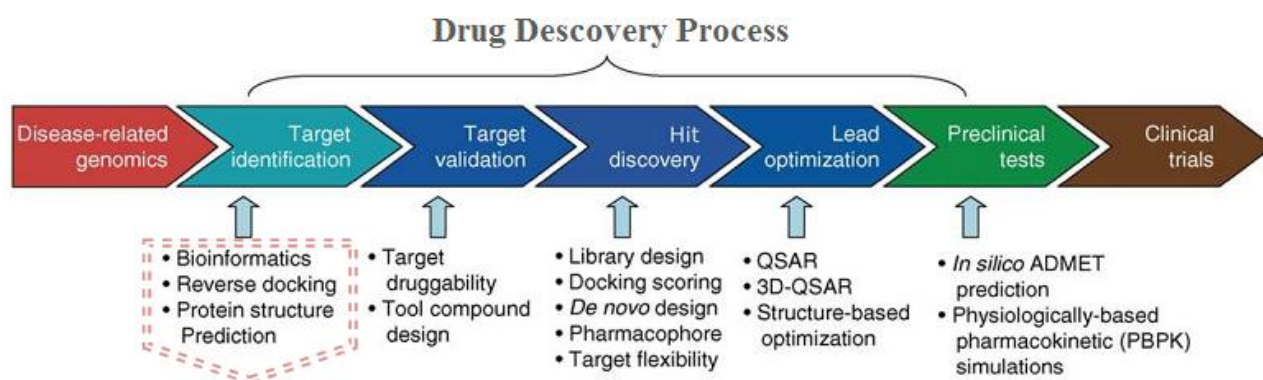


Figure II. 3. Intervention des méthodes in silico dans le processus R&D de nouveaux médicaments²².

On regroupe les méthodes in silico en deux grandes familles, le criblage virtuel « structure-based » et le criblage virtuel « ligand-based ». Comme son nom l'indique, le

Chapitre II. Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

criblage virtuel « structure-based » est basé sur la structure de la cible en évaluant la capacité des ligands à établir des interactions avec le site de liaison étudié et ainsi sélectionner les molécules capables de se lier à cette cible¹³.

En revanche, les techniques de criblage virtuel « ligand-based » utilisent les ligands connus comme guides pour définir les propriétés responsables de leur affinité en analysant les relations structure-activité de ces molécules pour découvrir de nouveaux composés susceptibles d'être actifs²³. Lorsque ces deux types de données sont disponibles simultanément, les méthodes « ligand-based » et « structure-based » peuvent toutes deux être utilisées l'une à la suite de l'autre²⁴. Ces différentes méthodes de criblage virtuel peuvent ainsi être utilisées dans les premières phases de R&D de nouveaux médicaments par les chimistes (figure 4), pour guider la sélection des composés les plus prometteurs, que ce soit lors des phases d'identification des hits ou d'optimisation des leads.

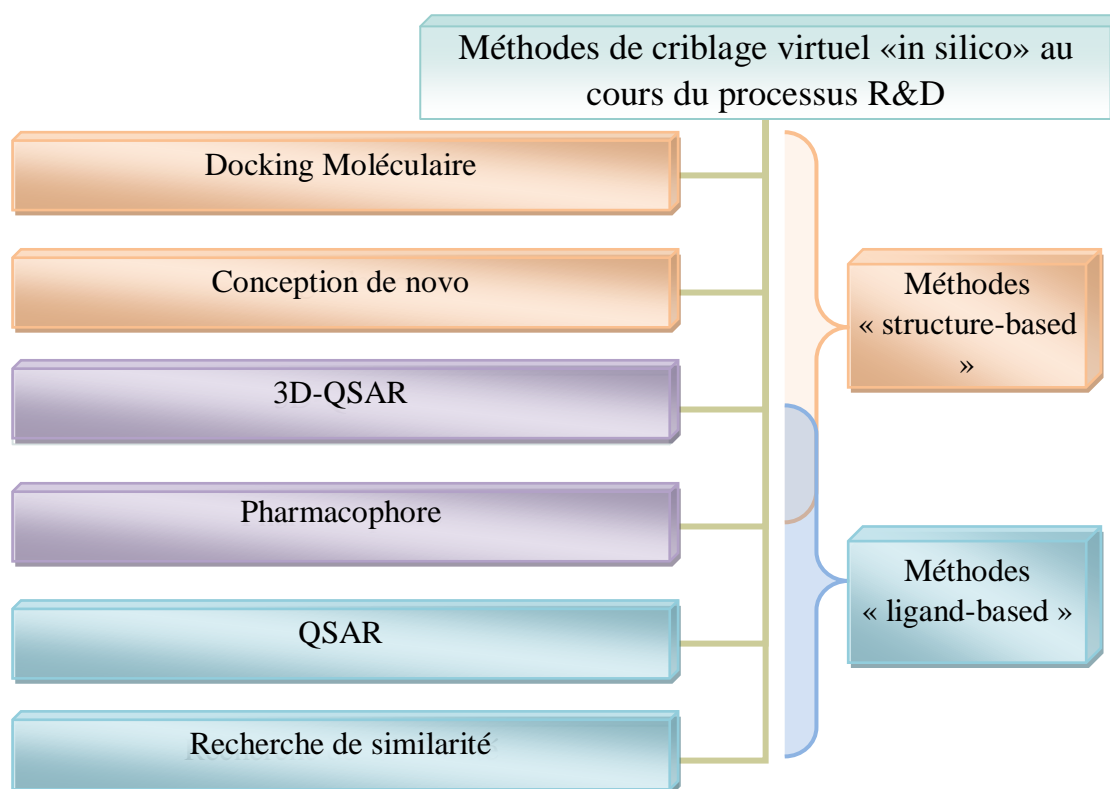


Figure II. 4. Classification des méthodes de criblage virtuel « ligand-based » et « structure-based », les plus utilisés au cours du processus R&D notamment par les chimistes.

2.1. Criblage virtuel « ligand-based » :

Un criblage virtuel « ligand-based » peut être réalisable, si au moins un ligand de la cible étudiée est déjà connu. L'hypothèse que les molécules similaires vont avoir tendance à présenter des profils d'activités très proches à similaires, est le principe de base de toutes les méthodes « ligand-based »²⁵.

Ce type de criblage très populaire est employé au cours de la phase d'identification de nouveaux hits et les phases d'optimisation des hits et des leads. Qui permet de rationaliser les processus de découverte de nouveaux composés, lorsque des données sont disponibles sur un ou plusieurs ligands actifs de référence.

2.1.1. Recherche de similarité :

La recherche de similarité est la méthode à employer lorsque très peu de ligands ont été rapportés pour la cible biologique choisie. Cette méthode repose sur l'utilisation de descripteurs et de métriques de similarité permettant de comparer des molécules à cribler à un ou plusieurs ligands de référence pour prédire leur profil d'activité²⁵.

Les descripteurs de similarité permettent de définir au sein d'une base de données quels ligands sont les plus ressemblants aux ligands actifs connus. Ce sont des nombres ou des vecteurs, souvent classés selon leur dimension (1D, 2D et 3D), qui représentent des caractéristiques structurales clés de composés. Ces descripteurs peuvent être obtenus en encodant la molécule par une représentation symbolique ce qui transforme l'information chimique en un nombre utile, qui est une procédure mathématique logique. En revanche, une procédure expérimentale peut également être utile en utilisant le résultat obtenu comme descripteur²⁶.

L'obtention des vecteurs de descripteurs pour chaque molécule de la chimiothèque ainsi que les molécules actives de référence permet ensuite de comparer ces molécules par métriques de similarité²⁷. Ces métriques sont classées en trois catégories: les mesures directes de similarité, les mesures de distances ou de dissimilitude et les mesures de corrélation. Ils sont traduits en coefficients dont la valeur est comprise dans l'intervalle [0;1] comme par exemple le cas du coefficient de Tanimoto « T_c » qui est le plus populaire et le plus couramment utilisé. Les valeurs de coefficients T_c les plus élevées sont associées aux molécules les plus similaires²⁸.

2.1.2. Modèles pharmacophoriques « ligand- based » :

Un pharmacophore est dit basé sur le ligand (ou « ligand-based ») lorsqu'il est déterminé à partir de la structure de composés actifs de référence, sans connaître ou sans prendre en compte la structure du récepteur. Lorsque la structure du récepteur est utilisée pour construire le pharmacophore, celui-ci est dit basé sur la structure ou « structure-based ».

En 1898, Ehrlich a développé le concept de pharmacophore, même si le terme pharmacophore n'était pas employé, en admettant que certains groupements chimiques dans une molécule sont responsables de l'action biologique ou pharmacologique. En 1960, la première définition moderne du pharmacophore a été établie en remplaçant « groupements chimiques » par le terme « caractéristiques abstraites »²⁹. Quelques années plus tard, Kier a publié le premier modèle de pharmacophore pour des agents muscariniques avec de mesures précises des distances entre groupements constituant le pharmacophore³⁰.

La définition officielle de l'IUPAC de 1998 indique que le pharmacophore se constitue de l'ensemble des propriétés stériques et électroniques d'une molécule, nécessaires pour assurer l'établissement d'interactions supramoléculaires optimales avec une cible biologique spécifique et engendrer ou bloquer une réponse biologique³¹. Ceci indique que les molécules partageant le même pharmacophore pour une cible donnée devraient donc se lier de manière identique à ce récepteur et présenter des profils d'activité similaires. Le pharmacophore généré est donc utilisé pour cribler la chimiothèque à la recherche de molécules se superposant à ce pharmacophore. L'une des caractéristiques majeures de ce type de méthodes est qu'un pharmacophore est défini par des points pharmacophoriques complémentaires les uns des autres, qui sont des groupes fonctionnels et non plus des groupes d'atomes. Les différents points pharmacophoriques recherchés sont les donneurs et les accepteurs de liaisons hydrogènes, les groupements chargés positivement ou négativement qui forment des interactions électrostatiques avec ceux de charge opposée, et les groupements aromatiques en tant que groupement hydrophobes³².

On distingue les approches pharmacophoriques 2D et 3D selon le format dans lequel sont présentés les ligands utilisés à la recherche du pharmacophore.

2.1.3. QSAR : Modèles de relations quantitatives structure-activité :

Les premiers essais de modélisation des relations structure-activité ont commencé à la fin du 19^{ème} siècle, lorsque Crum-Brown et Frazer ont postulé que l'activité biologique

d'une molécule est une fonction de sa constitution chimique³³. Mais ce n'est qu'au début des années 60 que les travaux de Corwin Hansch ont proposé un modèle mathématique reliant l'activité biologique à la structure chimique³⁴. Aujourd'hui, l'utilisation de QSAR n'a cessé de progresser³⁵. Elle est devenue indispensable en chimie pharmaceutique et pour la conception de médicaments, notamment dans le cas où la disponibilité des échantillons est limitée ou les mesures expérimentales sont dangereuses, longues et chères³⁶. Sans l'utilisation de grands instruments analytiques, les résultats des études QSAR peuvent fournir des informations utiles pour obtenir une meilleure connaissance des structures moléculaires et probablement le mode d'action au niveau moléculaire. Ces informations peuvent être alors utilisées dans la prédiction des activités biologiques de nouveaux composés ainsi que dans la conception de nouvelles structures³⁷.

Le principe des méthodes QSAR est, comme leur nom l'indique, de mettre en place une relation mathématique reliant de manière quantitative la structure moléculaire, codée par des propriétés moléculaires appelée descripteurs, avec une activité en utilisant des méthodes d'analyse de données³⁸. Par ces relations nous pouvons développer des modèles prédictifs de la forme générale suivante :

$$\text{Activité} = f(\text{descripteurs moléculaires})$$

L'objectif de ces méthodes est alors d'analyser les données structurales afin de déterminer les facteurs influençant l'activité mesurée³⁹.

En pratique, le développement d'un modèle commence par la collecte de données expérimentales fiables et en nombre important, ensuite il est nécessaire de générer un nombre de descripteurs, caractérisant les structures moléculaires, utilisés dans le développement du modèle QSAR⁴⁰. Une fois le modèle construit, il doit être évalué par des méthodes de validation (validation interne et externe) afin d'estimer sa robustesse et son pouvoir prédictif^{41, 42}. Enfin, pour tout modèle, il est important de connaître quel type de molécules ce modèle est utilisable (connaître le domaine d'applicabilité)⁴³.

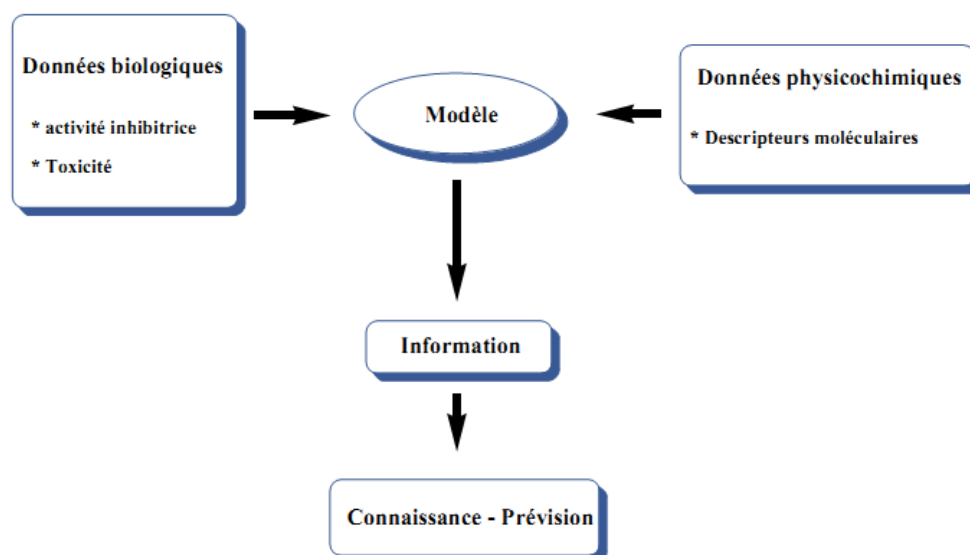


Figure II. 5. Présentation de la méthodologie de QSAR

2.1.4. 3D-QSAR :

Des modèles 3D-QSAR dit « receptor dependent » (RD-QSAR) peuvent être mis en œuvre lorsque la structure 3D de la cible biologique est résolue⁴⁴. Les approches 3D-QSAR ont été développées pour corréler l'activité biologique d'une série de composés actifs de référence avec l'arrangement spatial de nombreuses propriétés de la molécule telles que les propriétés stériques, lipophiliques et électronique et pour fournir des indications pour l'optimisation par pharmacomodulation et la conception de nouveaux composés avec des profils d'activité améliorés⁴⁵.

En 1979, La première approche 3D-QSAR a été proposée en décrivant les propriétés de champs moléculaires de composés, les calculer sur une grille régulière puis les corréler à leur activité biologique par analyse en «composante principale» (PCA)⁴⁶. Actuellement, différentes méthodes 3D-QSAR sont utilisées tel que CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) et CoMSIA (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis). Il est à noter que toutes ces méthodes nécessitent un alignement minutieux des ligands de référence. Cependant, ces approches sont considérées à la fois « ligand-based » et « structure-based ».

2.2. Criblage virtuel « structure-based » :

Le criblage virtuel « structure-based » est considéré comme un équivalent *in silico* d'un test expérimental étudiant la liaison ligand-cible biomoléculaire⁴⁷. Cependant, ce criblage dépend essentiellement de la disponibilité de la structure 3D de la cible biologique

qui est obtenue, soit par méthodes expérimentales (RX et RMN) dans des bases de données (tel que PDB: Protein Database), soit par des méthodes de prédiction de la structure 3D par homologie de séquence⁴⁸.

Différentes approches peuvent être employées pour réaliser ce criblage: la construction de modèles pharmacophoriques 3D, l'établissement de modèles 3D-QSAR (section II.1.4), la conception de novo « de novo design » et les méthodes de docking moléculaire qui sont les plus populaires.

2.2.1. Les approches pharmacophoriques 3D :

Les pharmacophores 3D décrivent l'arrangement spatial des propriétés chimiques nécessaires pour l'activité biologique à partir d'un ensemble de ligands actifs de référence⁴⁹. Les pharmacophores 3D sont obtenus également à partir de la structure 3D du récepteur ou la structure 3D d'un complexe ligand-récepteur. Les pharmacophores générés sont donc basés sur la structure et peuvent être ensuite utilisés pour cribler une chimiothèque à la recherche de molécules potentiellement actives⁵⁰.

Le processus de détermination du pharmacophore se divise en plusieurs étapes successives (Figure 6) qui peuvent être assistées par plusieurs logiciel tel que CATALYST, MOE, PHASE et SCAMPI⁵¹:

- Sélectionner les ligands de référence.
- Effectuer des recherches conformationnelles.
- Déterminer et représenter les points pharmacophoriques de chaque ligand.
- Déterminer les modèles de pharmacophore.
- Attribuer des scores à chaque model obtenu afin de choisir le ou les meilleurs pharmacophores.

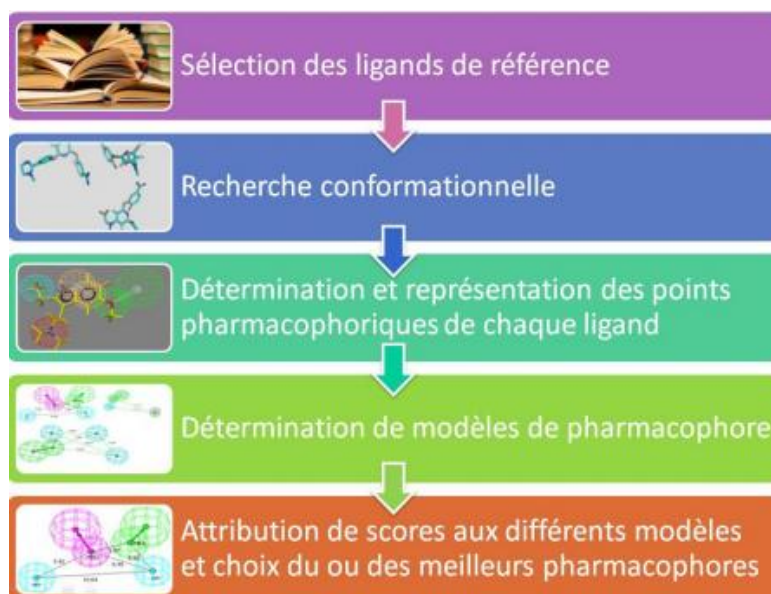


Figure II. 6. Principales étapes de l'élucidation d'un pharmacophore⁵.

Une fois le pharmacophore généré, il peut ensuite être utilisé dans le processus de R&D pour cribler une chimiothèque à la recherche de nouveaux hits « pharmacophore searching ». Il est très important de prendre en compte la flexibilité des molécules composant cette chimiothèque, sous peine d'éliminer une molécule qui aurait pu satisfaire les critères du pharmacophore si elle avait été proposée dans la bonne conformation⁵².

2.2.2. La conception de novo « de novo design » :

Cette approche consiste à définir des composés bioactifs par une construction incrémentale de ligands dans le site actif du récepteur (la cible en question), utilisant la structure du site d'interaction comme point de départ de la recherche de nouveaux composés actifs³¹. La première étape consiste à extraire toutes les informations concernant les interactions ligand-récepteur de type liaisons hydrogène, électrostatiques et hydrophobes pour déterminer les sites d'interactions nécessaires au placement de divers blocs dans le site d'interaction ligand-récepteur. Ces blocs peuvent être soit un atome, soit un fragment de molécule. L'utilisation des atomes comme blocs permet d'avoir plus de diversité structurale et conduit à un nombre très important de solutions possibles ce qui rend l'extraction des composés les plus prometteurs très compliqué. En revanche, l'approche basée sur les fragments permet de réduire la taille de l'espace chimique à étudier, et ce de manière rationnelle lorsque les fragments sont correctement choisis. En conséquence, les approches

basées sur les fragments sont les plus utilisées et les fragments obtenus sont ensuite assemblés pour créer de nouveaux composés⁵³ (Figure 7).

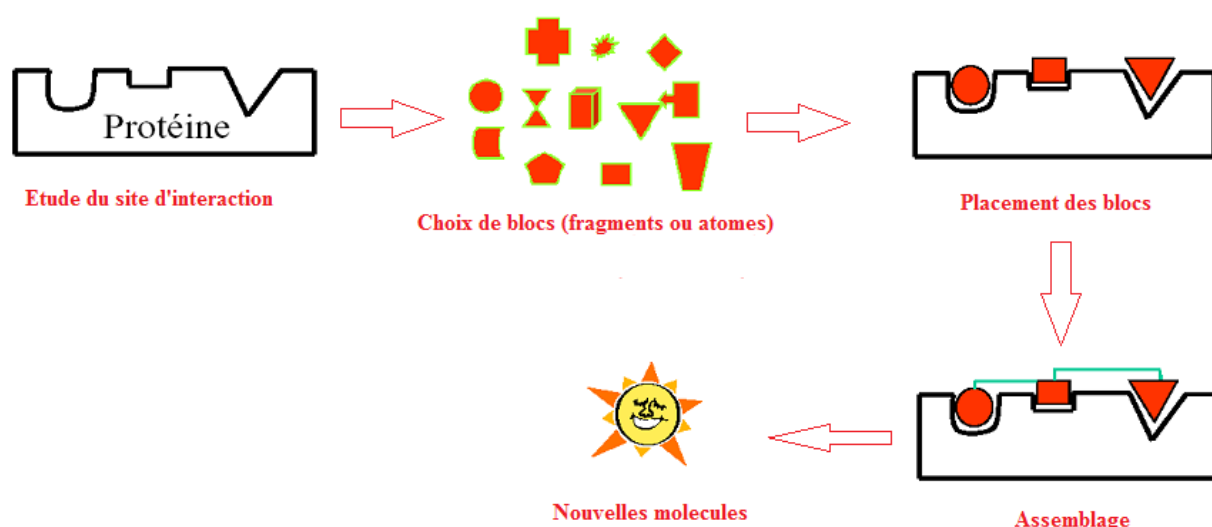


Figure II. 7. Représentation schématique des étapes principales d'une conception de novo.

2.2.3. Docking moléculaire :

Les interactions entre molécules sont à la base de la plupart des mécanismes biologiques. Les détails de ces interactions, au niveau moléculaire, sont donc d'un très grand intérêt et peuvent être étudiés par cristallographie aux rayons X ou résonance magnétique nucléaire (RMN). Ces techniques expérimentales coûteuses et peu accessibles, ne permettent pas de détailler la totalité de ces interactions étant donné le nombre incalculable de molécules différentes au sein d'une seule cellule.

Il y a plus de 30 ans, l'utilisation des méthodes de docking moléculaire *in silico* dans le processus de conception de nouvelles molécules actives a débuté, afin d'étudier les modes d'interactions des ligands avec la cible biologique pour l'inhiber ou l'activer. Ce qui est considérablement plus facile à mettre en œuvre, moins cher et plus rapide que l'utilisation d'une méthode expérimentale⁵⁴. Ces méthodes de docking visent à prévoir la capacité ou non d'un ligand à se lier au site actif du récepteur et comprendre comment il interagit avec, en se basant pour cela sur la prédiction de la conformation et de l'orientation de la molécule lors de sa liaison au récepteur⁵⁵. Les méthodes de docking s'attachent donc, d'une part, à identifier les molécules qui sont des ligands véritables du récepteur parmi toutes celles étudiées, mais aussi d'autre part, à déterminer les poses correctes soit les conformations adoptées par les ligands lors de la liaison au récepteur⁵⁶. A cet effet, les méthodes de docking combinent

l'utilisation d'un algorithme de recherche, permettant de générer des modes d'interactions putatifs du ligand dans le récepteur, ou « poses », et d'une fonction de score, employée pour classer les différentes poses selon un score prédit d'affinité.

2.2.3.1. Les approches de Docking :

En réduisant le système biologique en question à la zone d'interaction ligand-protéine, la flexibilité du ligand permet de distinguer deux approches principales de docking: le docking à ligand rigide et rigide, le dockings à ligand flexible.

2.2.3.1.1. Le Docking avec ligand rigide «docking rigid-body »:

Historiquement, les premiers outils de docking obéissaient au principe dit « clef-serrure » ou « lock-and-key » selon lequel le ligand qui représente la clef, est complémentaire au niveau géométrique du site actif du récepteur, qui représente la serrure. Considérant donc le ligand et le récepteur comme deux entités rigides, la recherche de la pose optimale se limite au positionnement en énumérant toutes les rotations et les translations possibles pour le ligand à l'intérieur du site d'interaction. Ensuite toutes les poses incompatibles avec le site actif sont éliminées par une image négative du site actif. Enfin, les poses sélectionnées se voient attribuées un score et les meilleures sont optimisées⁵⁶.

Cette approche de docking ,peu coûteuse en terme de temps de calcul, est utilisée de nos jour comme un premier filtre lors des criblages virtuels, permettant de ne pas retenir des molécules aberrantes (trop grandes, mauvaise complémentarité avec le site de liaison,...) ⁵⁷.

2.2.3.1.2. Le Docking avec ligand flexible :

La présentation du système biologique comme un système dynamique dont la liaison du ligand à un site d'interaction se fait en réalité dans la majorité des cas par un processus de sélection de conformation qui se termine par une étape d'adaptation du ligand et du récepteur l'un à l'autre donc le ligand mais également le récepteur sont susceptibles de subir des changements conformationnels importants⁵⁸. Cette représentation simpliste du problème a donc été améliorée par l'introduction de la flexibilité sur le ligand avec l'essor des moyens de calcul, permettant l'exploration des conformations adoptées par celui-ci lors de l'arrimage dans le site actif de la protéine⁵⁶. En effet cette approche représente actuellement l'approche la plus utilisée dans la plupart des logiciels de docking car elle permet une évaluation rapide de bases de milliers, voire de millions de molécules⁵⁹. Néanmoins, celle-ci reste approximative mais la prise en compte de la flexibilité du récepteur, proposée

actuellement par quelques logiciels de docking, entraîne une augmentation importante du nombre de degrés de liberté du système et cela représente un coût trop élevé en terme de temps de calcul pour être systématiquement envisagée dans les protocoles de docking⁵⁶.

2.2.3.1.2.1. Les algorithmes de recherche :

En principe, un programme de docking doit être capable de générer les modes de liaison attendus pour des ligands dont la position adoptée au sein du site actif est connue (en général, via la structure cristallographique de la protéine co-cristallisée avec le ligand) dans un temps raisonnable. Pour cela, il est nécessaire que l'algorithme de recherche conformationnelle puisse explorer l'espace conformationnel le plus exhaustivement possible et de façon efficace. Classiquement, on juge de la qualité du docking en mesurant le RMSD, appelé test de redocking, (Root Mean Square Deviation) sur les atomes lourds entre la pose obtenue en docking, et la pose observée expérimentalement si elle existe⁶⁰. Pour cet approche de docking, il existe deux types d'algorithmes de recherche permettant de traiter la flexibilité du ligand : les méthodes systématiques, les méthodes stochastiques ou aléatoires⁶⁰.

A. Recherche systématique :

Les algorithmes de recherche systématique ont pour but d'explorer tous les degrés de liberté des ligands par rotation de 0 à 360° de toutes ses torsions à l'aide d'un pas incrémental choisi. En conséquence, rapidement, ceci provoque une augmentation très importante du nombre de conformations créées que l'on nomme explosion combinatoire (Equation 1)⁶⁰.

$$N_{Conformations} = \prod_{i=1}^N \prod_{j=1}^{n_{inc}} \frac{360}{\theta_{i,j}} \quad eq. 1$$

Avec : $N_{Conformations}$: le nombre de conformations possibles pour un ligand

N : le nombre de torsions, n_{inc} : le nombre d'incrémentations et $\theta_{i,j}$: l'angle incrémental rotationnel j pour la liaison i

Cette explosion combinatoire est la raison pour laquelle ces techniques ne sont pas employées dans leur forme originelle, mais en association avec un certain nombre de contraintes destinées à réduire le nombre de solutions obtenues. On distingue deux types de méthodes pouvant être utilisées: des méthodes de recherche exhaustive et des méthodes de reconstruction incrémentale.

Les méthodes de reconstruction incrémentale sont les algorithmes de recherche systématique les plus couramment appliqués. Celles-ci séparent ligand en fragments rigides et

Chapitre II. Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

le reconstruit par la suite de façon incrémentale, en dockant ces fragments séparément avant de faire grandir étape par étape le ligand dans le site actif en rajoutant les différents fragments sur le premier fragment docké qui sert de base à la reconstruction^{55, 60}. En effet, à titre d'exemple, à partir d'une molécule avec 7 liaisons rotatives, en considérant 6 rotamères pour chaque liaison, il existe donc 6^7 , soit 279936 conformations possibles. Si une liaison rotative de cette molécule est rompue pour obtenir deux fragments, cela élimine une liaison pour la recherche conformationnelle et les conformations des deux fragments sont indépendantes, ce qui réduit le nombre de conformations à $6^3 + 6^3$ soit 432 conformations. Ce type d'algorithme est notamment employé dans plusieurs programmes de docking tel que Surflex et Dock^{5, 61, 62}.

Quand aux méthodes de recherche exhaustive, elles permettent de mener un docking avec ligand flexible par des rotations systématiques de toutes les liaisons rotatives possibles du ligand à un intervalle donné. L'explosion combinatoire sous-jacente est limitée par la définition de contraintes géométriques et chimiques à imposer aux conformations initiales des ligands à docker et les conformations ainsi sélectionnées sont finement affinées et optimisées. Un algorithme de recherche systématique exhaustive est employé dans la première étape du protocole de filtres hiérarchiques du logiciel GLIDE⁵⁷.

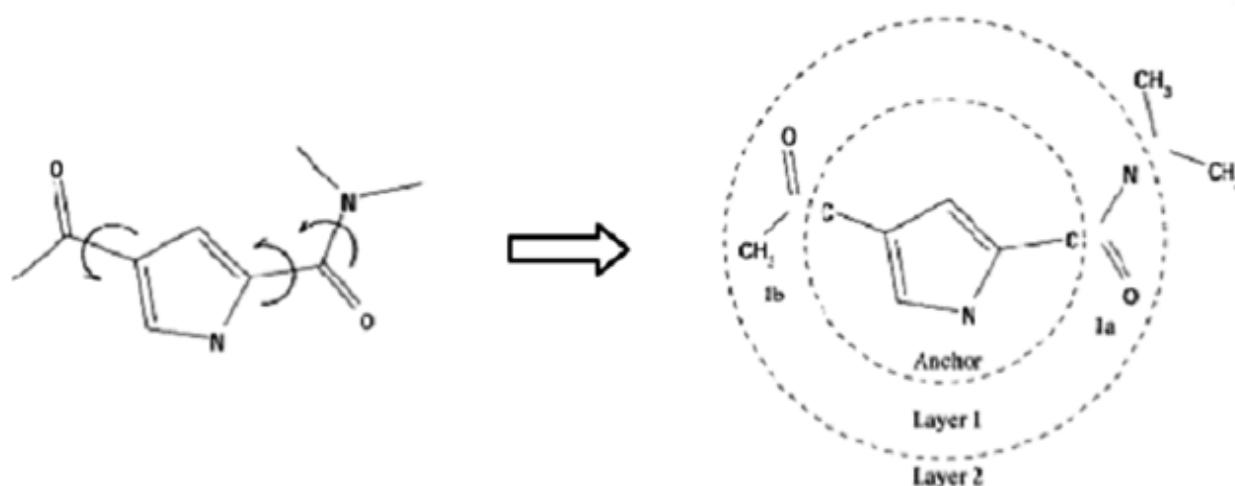


Figure II. 8. Démonstration d'une reconstruction incrémentale dont la molécule est divisée en fragments puis dockée et reconstruite couche par couche dans le site actif⁶².

B. Recherche aléatoire ou stochastique :

Les algorithmes de recherche aléatoire ou stochastiques fonctionnent en opérant des changements aléatoires sur un ligand ou une population de ligands permettant de générer de

Chapitre II. Criblage virtuel : voie d'accès à des substances médicamenteuses

nouvelles conformations de ligands, lesquels sont acceptés ou rejetés sur la base d'une fonction de probabilité (« fitness »)⁵⁵, Quatre grands types d'algorithmes appartiennent à cette classe : les algorithmes génétiques (évolutionnaires), les méthodes de Monte-Carlo, les algorithmes de recherche tabou et les algorithmes d'optimisation en essaim⁶³.

Les algorithmes évolutionnaires (« AE ») sont des méthodes d'optimisation génériques et itératives. Elles se reposent sur un processus adaptatif qui mime l'évolution biologique telle que décrite par la théorie de l'évolution de Darwin. Ces méthodes sont capables de gérer plusieurs solutions conformationnelles (poses) simultanément définies par un ensemble de variables assimilées à des gènes en appliquant des opérateurs génétiques (mutations, recombinaison « crossover »), regroupées dans une population. Cette population est exposée à une pression de sélection, implémentée dans une fonction de score. La sélection des solutions les plus performantes d'après la fonction de score est appelée « parents » ou « génome parentaux », contrebalancée par la génération de nouvelles solutions « enfants », ceci pour maintenir une diversité de population. Les enfants, sont donc générés par modification du génome parental par des opérateurs classés suivant le nombre de parents sur lesquels ils s'appliquent. Une fois les enfants créés, ils prennent la place des plus mauvaises solutions de la population. Et donc le processus itératif commence, cette dernière population (la nouvelle population) est de nouveau exposée à la pression de sélection implémentée par la fonction de score. L'évolution continue par une nouvelle itération ou bien génération (Figure 9)⁶⁰.

Au cours du processus itératif les solutions les mieux adaptées émergent, jusqu'à convergence de la population ou bien après un nombre déterminé de génération. Dans le docking moléculaire, l'algorithme évolutionnaire cherche à décrire les interactions entre le ligand et la cible protéique où les degrés de liberté correspondent aux positions, orientations et conformation du ligand et du récepteur. Ce type d'algorithme dirige le processus de docking des logiciels GOLD, AutoDock et Molegro virtual docker (MVD).

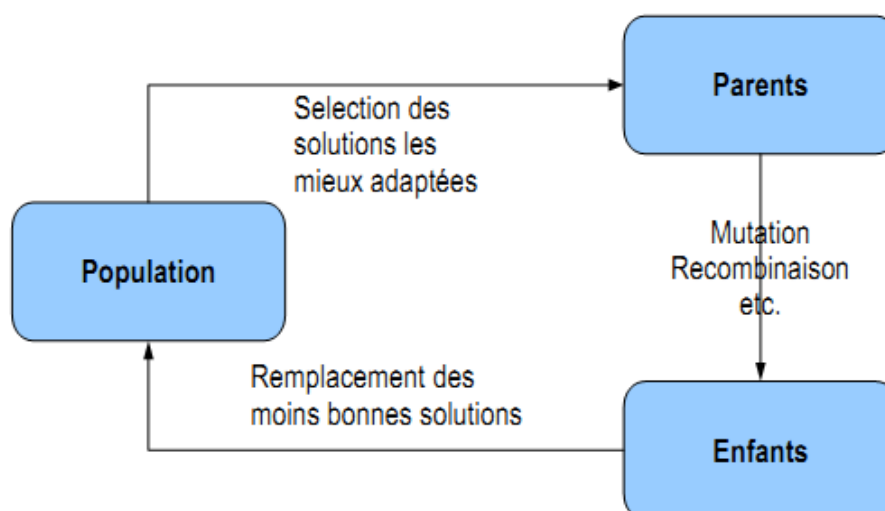


Figure II. 9. Représentation schématique du cycle évolutif d'un algorithme évolutionnaire « AE ».

Dans la méthode Monté Carlo, le ligand est placé au sein du site d'interaction d'une manière aléatoire pour générer une conformation initiale, où un changement conformationnel est opéré, toujours de manière aléatoire, que ce soit par une translation, une rotation ou une torsion⁶⁴. Chaque changement, induit une nouvelle conformation dont l'énergie d'interaction est calculée (scoré) et évaluée avec une fonction de score de probabilité de type Boltzmann. Cette nouvelle solution est acceptée si elle est meilleure que la précédente (conservée par le programme), sinon elle sera rejetée; en calculant l'écart énergétique, c'est ce qu'on appelle le critère de Métropolis (Équation 2)⁶⁵.

$$P = e^{\frac{E_{new} - E_{old}}{kT}} \quad eq.2$$

Avec:- P : probabilité d'acceptation de la nouvelle conformation

- E_{new} : énergie de la nouvelle conformation et E_{old} : énergie de l'ancienne conformation

- k : constante de Boltzmann et T est la température de simulation

Ces étapes sont ainsi répétées un certain nombre de fois, défini par le nombre de pas de Monte Carlo. Plusieurs logiciels utilisent ces simulations tel que ICM (Internal Coordinate Mechanics), QXP, PRODOCK et MCDOCK.

Les algorithmes de recherche tabou explorent l'espace conformationnel en interdisant les espaces déjà explorés et accepte les nouvelles solutions sur la base de leur RMSD par rapport aux précédentes conformations⁶⁶. La recherche débute par la détermination d'une

conformation initiale aléatoire du ligand qui va subir un nombre défini de changements par une procédure mimant des mutations par application de nombres aléatoires aux variables du docking. Ces changements sont ensuite évalués et triés à l'aide d'une fonction de score pour accepter ceux qui permettent d'obtenir une énergie plus basse et les intégrer dans la « liste tabou » regroupant les meilleures solutions. Dans le cas contraire, la conformation est comparée aux conformations précédemment acceptées et si la valeur de RMSD (Root Mean Square deviation) obtenue est supérieure à un seuil défini (par exemple 0,75 pour le logiciel PRO_LEADS), le changement est accepté et intégré à la « liste tabou ». Dans le cas contraire, le changement est considéré comme tabou et éliminé. La recherche se termine lorsque plus aucun changement acceptable n'est obtenu ou lorsque la limite d'itération est atteinte. Les algorithmes de recherche tabou sont exploités dans les logiciels PRO_LEADS 324 et PSI-DOCK 325 notamment⁶⁶.

Les algorithmes d'optimisation par essais particuliers ou (Swarm Optimization algorithm) considèrent un ensemble de conformations d'un ligand. Chaque conformation est appelée une particule et l'ensemble, un essaim. Chaque particule subit des changements et conserve la meilleure position qu'elle a adoptée au cours du docking. Les mouvements du ligand à travers l'espace conformationnel sont ainsi guidés par les meilleures positions adoptées par ses voisins⁶³. Parmi les logiciels de docking utilisant un algorithme d'optimisation en essaim, il est possible de citer SODOCK, Tribe-PSO, et FIPSDock.

2.2.3.1.2.2.. Fonctions de score :

Une fois les conformations du ligand (générées) acceptées selon les différentes approches, leurs affinités pour le récepteur doivent être évaluées⁶⁷. C'est ce qu'on appelle fonctions de score ou fonctions objectives, car elles évaluent les résultats de la recherche et attribuent la meilleure énergie (meilleur score) à la conformation du ligand la plus correcte (d'après la recherche). Pour cela, le rôle de la fonction de score est très important dans tout protocole de docking. Néanmoins, l'utilisation d'une fonction de score très précise n'est pas possible à cause du coût computationnel. En conséquence, quelques simplifications et approximations sont posées afin de réduire la complexité du problème et atteindre au moins une balance entre vitesse de calcul et exactitude du résultat. Une fonction de score doit être efficace et sélective, elle doit diriger la recherche en fournissant un gradient d'énergie, et identifier le mode d'interaction correct parmi un ensemble de leurs.

Les fonctions de score utilisées peuvent être classées en quatre catégories :

- A- Celles qui sont basées sur les champs de forces.
- B- Fonctions de score empiriques.
- C- Celles qui sont basées sur les données (knowledge-based).
- D- Celles qui sont basées sur des consensus.

Toutes ces fonctions de score ont un critère commun, le fait que l'énergie soit décomposée en une somme de termes décrivant les différentes contributions d'énergie. Dans un sens physique, ce n'est pas permis, puisque l'énergie libre est une fonction d'état tandis que les termes énergétiques formant la sommation ne le sont pas⁶⁸. De plus, les modes additifs simples, ne peuvent pas décrire des effets de coopérations subtiles⁶⁹. Néanmoins il est utile d'interpréter les interactions protéine-ligand d'une manière additive⁷⁰, et estimer que l'énergie libre est valable avec un coût computationnel léger.

A- Fonction de score se basant sur les champs de force :

Le champ de force est une fonction mathématique qui exprime l'énergie d'un système par la somme de divers termes issus de la mécanique moléculaire. L'utilisation de champ de force dans le calcul de l'énergie libre d'un système comme fonction de score est le résultat des travaux du Prof. Irwin Kuntz à l'université de Californie à San Francisco aux USA⁵⁴, qui a été suivi par d'autres comme le groupe de recherche de Shoichet et celui de Abagyn^{71, 72}. Ce type de fonction de score est similaire aux fonctions de score empiriques du fait qu'elles estiment l'énergie libre d'interaction d'un complexe récepteur-ligand par addition de plusieurs contributions individuelles des différents types d'interactions. La fonction de score « champ de force » utilise des fonctions d'énergie dérivées de la mécanique moléculaire⁵⁵, et en général, quantifie cette somme en deux termes, l'énergie d'interaction entre le récepteur et le ligand (interactions intermoléculaires) et l'énergie interne du ligand. La première composante qui représente l'énergie intermoléculaire, est elle-même le résultat d'une sommation de plusieurs termes énergétiques: terme de Van der Waals (décrit par un potentiel de Lennard-Jones), un terme électrostatique (décrit par une formulation coulombienne avec une fonction diélectrique dépendante de la distance qui réduit les contributions des interactions charge - charge)⁷³. Par ailleurs, les fonctions qui décrivent l'énergie interne du ligand sont usuellement similaires aux termes décrivant les interactions intermoléculaires [elles contiennent des termes de VDW et électrostatique]. Ces fonctions de score sont généralement sensibles aux petites variations de coordonnées atomiques, ce qui limite leur champ d'application⁷³. Cet inconvénient peut être résolu en adoucissant le

potentiel de VDW, où la contribution de la composante répulsive sera limitée afin d'autoriser quelques clashes stériques sans trop pénaliser le mode d'interaction correspondant. Les fonctions de score qui se basent sur les champs de force sont par exemple: D-score (basée sur le champ de force Tripos)⁷⁴, Goldscore⁷⁵. De même les plus rigoureux comme AMBER⁷⁶, CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics)⁷⁷, GROMOS (GRONingen MOlecular Simulation System)⁷⁸ et OPLS (Optimized Potentials for Liquids simulation)⁷⁹ peuvent eux aussi être utilisés quoiqu'ils représentent un coût computationnel énorme.

B- Fonctions de score empiriques :

L'idée fondamentale des fonctions de score empiriques est que l'énergie d'interaction d'un complexe récepteur ligand peut être interprétée comme une sommation d'interactions chimiques localisées⁸⁰. En d'autres termes, l'énergie d'interaction est partitionnée en plusieurs composantes de reconnaissance. Ces méthodes essaient d'estimer l'énergie d'interaction en réunissant d'une manière intuitive les termes que l'expérience a défini comme fondamentaux. Les fonctions de score empiriques contiennent usuellement des termes décrivant les interactions ioniques, interactions hydrophobiques, les ponts ou liaisons hydrogène et les interactions engendrées par le changement d'entropie (pénalité d'entropie). Ceci dit, ces fonctions de score somment ces différents termes en les pondérant à des termes décrivant les différents types d'interactions moléculaires⁸¹.

C- Fonctions de score basées sur des données ou fonctions statistiques :

Ces fonctions de score qui représentent des potentiels d'interaction, dérivent des données statistiques qui ont été obtenues par analyse expérimentale des fréquences d'interactions entre atomes au sein d'un complexe protéine-ligand. Ces fonctions statistiques sont dérivées selon deux principes fondamentaux. Le premier, qui considère qu'un complexe protéine-ligand est supposé être dans son état d'équilibre, donc stable thermodynamiquement ce qui lui confère un minimum global d'énergie (Enthalpie libre du complexe). Le deuxième, celui de la distribution des molécules à l'état microscopique, qui suit et obéit la distribution de Boltzmann. Ceci nous mène à dire qu'il y a une corrélation entre l'état thermodynamique du complexe qui forme un système et la probabilité de trouver ce complexe dans un état microscopique donné. Alors, si ces fréquences sont converties en enthalpie libre (énergie) grâce à une distribution de Boltzmann, les potentiels sont donc nommés potentiels de force moyenne (Potential of Mean Force: PMF). Ce dernier a été utilisé dans l'étude par simulation, des repliements des protéines ; et par la suite dans l'étude des interactions protéine-ligand⁸².

Il y a deux aspects importants pour la construction du PMF, d'abord, il faut définir l'état de référence. Celui-ci correspond à l'état où il n'y a pas d'interactions entre les deux entités chimiques (protéine et ligand). Il n'est pas toujours facile de définir cet état de référence, car la plupart des complexes protéine-ligands se trouvent dans des états liés, ce qui impose des approximations à ce niveau. Dans ce cas cet état de référence, sera décrit par une valeur spécifique empirique ou par un potentiel calculé à partir de toutes les données disponibles et avec une correction appropriée. Enfin, le deuxième point important est la façon dont sont collectées les statistiques d'interactions. Elles sont dépendantes des distances et donc doivent permettre de bien dissocier l'état entre deux atomes où l'interaction existe ou n'existe pas.

Afin de prendre en compte les distances d'interaction entre deux atomes, deux approches sont mises au point. La première, qui peut être considérée comme grossière, consiste à prendre une distance limite entre deux atomes, et considérer qu'il y a interaction en dessous de cette distance, et non pas au-delà. La deuxième approche consiste à évaluer le potentiel d'interaction de manière continue le long de la distance interatomique, cette approche est plus fine que la précédente.

Ces fonctions statistiques, dépendent de leurs groupes d'apprentissage (expérience), elles ne peuvent modéliser que les interactions qui existent dans leurs bases de données expérimentales. Par conséquent, avec ce type de fonctions, il est difficile de modéliser les interactions qui ne dévient pas trop de leur modèle. L'un des potentiels les plus simples est le PLP (Piecewise Linear Potential)⁸³. Il est basé sur quatre types d'atomes et prend en compte les interactions stériques et les ponts hydrogènes. Les distances interatomiques sont prises en compte en dessous de 5 Å. De même l'état de référence est défini comme étant un complexe entre les deux entités chimiques qui n'interagissent pas.

D- Fonctions de score consensus :

Les fonctions de score consensus⁸⁴, combinent les informations obtenues à partir des différents scores, afin de compenser les erreurs des fonctions de scores individuelles. Plusieurs études ont montré que ces fonctions permettent l'évaluation des énergies d'interactions protéine-ligand mieux que les fonctions individuelles⁸⁵. Un exemple de fonction de score consensus est X-CSCORE⁸⁶ qui combine un PMF⁸⁷, et ChemScore⁸⁸.

Références Bibliographiques

1. K. D. J. B. Nikiéma, J. Simporé *Ethnopharmacologia*, 2009, **43**, 47-51.
2. R. Schmitz, *Pharm Hist*, 1985, **27**, 61-74.
3. O. Lafont, 2007, **94**, 209-216.
4. J. A. L. J.G. Lombardino, *Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**, 853-862.
5. N. LAGARDE, ÉCOLE DOCTORALE Abbé Grégoire 2014.
6. S. Morgan, P. Grootendorst and J. Lexchin, *Health Policy*, 2011, **100**, 4-17.
7. A. M. Davis, S. J. Teague and G. J. Kleywegt, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, 2003, **42**, 2718-2736.
8. P. W. Corr, *National Academy Press (US)*, 2009, Institute of Medicine (US) Committee on Conflict of Interest in Medical Research, Editor.
9. A. C. Cheng, R. G. Coleman and K. T. Smyth, *Nat Biotechnol*, 2007, **25**, 71-75.
10. G. Vistoli, A. Pedretti and B. Testa, *Drug Discov. Today*, 2008, **13**, 285-294.
11. E. D. Zanders, D. S. Bailey and P. M. Dean, *Drug Discov Today*, 2002, **7**, 711-718.
12. J. P. Hughes, S. Rees and S. B. Kalindjian, *Br J Pharmacol*, 2011, **162**, 1239-1249.
13. T. Tuccinardi, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 2009, **12**, 303-314.
14. N. Moitessie, P. Englebienne and D. Lee, *Br J Pharmacol*, 2008, **153** S7-26.
15. Y. Tanrikulu, B. Kruger and E. Proschak, 2013, **18**, 358-364.
16. L. Peltason and J. Bajorath, *Future Med Chem*, 2009, **1**, 451-466.
17. R. E. Hubbard, *Mol. BioSyst*, 2005, **1**, 391-406.
18. B. C. Duffy, L. Zhu and H. Decornez, *Bioorg Med Chem*, 2012, **20**, 5324-5342.
19. W. P. Walters, M. T. Stahl and M. A. Murcko, *Drug Discov. Today*, 1998, **3**, 160-178.
20. M. Stahl and *Wiley-VCH*, 2000, 229-264.
21. G. Schneider and H.-J. Böhm, *Drug Discov. Today* 2002, **7**, 64-69.
22. Y. ASSES, Université Henri Poincaré 2011.
23. D. E. Clark, *Expert Opin. Drug Discov*, 2008, **3**, 841-851.
24. R. Perez-Pineiro, A. Burgos and D. C. Jones, *J Med Chem*, 2009, **52**, 1670-1680.
25. H. Koeppen, J. Kriegl and U. Lessel, *C. Sottriffer, Editor*, 2011, 536.
26. A. Bender and R. C. Glen, *Org Biomol Chem*, 2004, **2**, 3204-3218.
27. P. Willett, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 1998, **38**, 983-996.
28. P. Willett, *Methods Mol Biol*, 2011, **672**, 133-158.
29. O. F. Guner and J. P. Bowen, *J Chem Inf Model*, 2014, **54**, 1269-1283.
30. L. B. Kier, *Mol Pharmacol*, 1967, **3**, 487-494.
31. C.-G. Wermuth, C. R. Gannelin and P. Lindberg, *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 1998, **J.A. Bristol, Editor**, 385-395.
32. D. Horvath, *A.T. Varnek, A., Editor*, 2008, 338.
33. Hansch, *Acc. Chem. Res*, 1969, **2**, 232-239.
34. A. K. Debnath, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2001, **I**, 187-195.
35. M. Grover, B. Singh, M. Bakshi and S. Singh, *Pharm. Sci. Tech. Today*, 2000, **3**, 50-57.

36. A. Rezza and P. N. Kourounakis, *Ed. Taylor & Francis Group, LLC. Etats Unies*, 2008.
37. A. K. Ghose and V. N. Viswanadhan, *Ed. Marcel Dekker, Inc. Etats Unies*, 2001.
38. F. Li, H. Wu, L. Li, X. Li and J. Zhao, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2012, **80**, 273-279.
39. A. S. Reddy, S. Kumar and R. Garg, *J Mol Graph Model*, 2010, **28**, 852-862.
40. M. Zhao, Z. Li, L. Peng, Y. R. Tang, C. Wang, Z. Zhang and S. Peng, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 2815-2826.
41. A. Tropsha, P. Gramatica and K. V. Gombar, *QSAR Comb. Sci.*, 2003, **22**, 69-77.
42. A. A. Toropov, A. P. Toropova, E. Benfenati, G. Gini, D. Leszczynska, J. Leszczynski and G. D. Nucci, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2013, **432**, 214-225.
43. P. Gramatica, E. Giani and E. Papa, *J. Mol. Graph. Mod.*, 2007, **25**, 755-766.
44. T. Scior, J. L. Medina-Franco and Q. T. Do, *Curr Med Chem*, 2009, **16**, 4297-4313.
45. W. Sippl, T. L. Puzyn and K. Cronin, *M.T.D., Editor*, 2010, 414.
46. R. D. Cramer and M. Milne, *American Chemical Society Meeting*, 1979, **Computer Chemistry Section**.
47. B. S. Cummings, *Biochem. Pharmacol.*, 2007, **74**, 949-959.
48. D. J. Diller and R. Li, *J Med Chem*, 2003, **46**, 4638-4647.
49. G. Hessler and K.-H. Baringhaus, *Drug Discov Today Technol.*, 2010, **7**, 203-270.
50. O. Dror, A. Shulman-Peleg and R. Nussinov, *Curr Med Chem*, 2004, **11**, 71-90.
51. C. Laggner, G. Wolber and J. Kirchmair, *A. Varnek, Editor*, 2008, 338.
52. P. W. Finn, *Drug Discovery Today*, 1996, **1**, 363-370.
53. G. Schneider and U. Fechner, *Nat Rev Drug Discov.*, 2005, **4**, 649-663.
54. I. D. Kuntz, J. M. Blaney and S.J. Oatley, *J Mol Biol.*, 1982, **161**, 269-288.
55. D. B. Kitchen, H. Decornez and J. R. Furr, *Nat Rev Drug Discov.*, 2004, **3**, 935-949.
56. E. Yuriev, M. Agostino and P. A. Ramsland, *J. Mol. Recognit.*, 2011, **24**, 149-164.
57. J. L. B. R. A. Friesner, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, *J Med Chem*, 2004, **47**, 1739-1749.
58. A. D. Vogt and E. D. Cera, *Biochemistry*, 2013, **52**, 5723-5729.
59. V. Mohan, A. C. Gibbs, M. D. Cummings, E. P. Jaeger and R. L. DesJarlais, *Curr. Pharm. Des.*, 2005, **11**, 323-333.
60. S.F.Sousa, P. A. Fernandes and M. J. Ramos, *Proteins*, 2006, **65**, 15-26.
61. A. N. Jain, *J Med Chem*, 2003, **46**, 499-511.
62. T. J. Ewing, S. Makino, A. G. Skillman and I. D. Kuntz, *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 2001, **15**, 411-428.
63. S. Y. Huang and X. Zou, *Int J Mol Sci*, 2010, **11**, 3016-3034.
64. J. Y. Trosset and H. A. Scheraga, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** 8011-8015.
65. N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M.N.Rosenbluth, A.H.Teller and E. Teller, *J. Chem. Phys.*, 1953, **21**, 1087-1092.
66. C. A. Baxter, C. W. Murray and D. E. Clark, *Proteins*, 1998, **33**, 367-382.
67. J. Böhm and M. Stahl, *Med Chem Res*, 1999, **9**, 445-462.
68. A. E. Mark and W. F. vanGunsteren, *J. Mol.Biol.*, 1994, **240**, 167.
69. D. Williams and B.Bardsley, *Persp. DrugDisc. and Design*, 1999, **17**, 43.
70. T. J. Stout, C. R. Sage and R. M. Stroud, *Structure*, 1998, **6**, 839.

71. M. Totrov and R. Abagyan, *Proteins*, 1997, **Suppl 1**, 215-220.
72. U. Rester, *Qsar & Combinatorial Science*, 2006, **25**, 605-615.
73. P. ERRARA, H. GOHLKE, J. P. D., G. KLEBE and C. L. BROOKS, *J. Med. Chem*, 2004, **47**, 3032-3047.
74. B. Kramer, M. Rarey and T. Lengauer, *Proteins*, 1999, **37** 228-241.
75. M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray and R. D. Taylor, *Proteins* 2003, **52**, 609-623.
76. S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. T. Nguyen and D. A. Case, *J Comput Chem*, 1986, **7** 230-252.
77. L. Nilsson and M. Karplus, *J Comput Chem* 1986, **7** 591-616.
78. W. F. v. Gunsteren and H. C. Berendsen, *Angew Chem Int*, 1990, **29**, 992-1023.
79. H. Madariaga, P. C. Lee, L. A. Heitlinger and E. Lebenthal, *Digestive diseases and sciences*, 1988, **33**, 1020-1024.
80. M. K. HOLLOWAY, *J. Med. Chem*, 1995, **38**, 305-317.
81. C. PEREZ, M. PASTOR, A. R. ORTIZ and F. GAGO, *J. Med. Chem*, 1998, **41**, 836-852.
82. W.P.Russ and R. Ranganathan, *Curr. Opin. Struct. Biol*, 2002, **12**, 447-452.
83. G. Verkhivker, K. Appelt, S. T. Freer and J. E. Villafranca, *Prot. Engineering Design Selection*, 1995, **8**, 677-691.
84. I. Halperin, B. Ma, H. Wolfson and R. Nussinov, *Proteins*, 2002, **47**, 409-443.
85. G. E. Terp, B. N. Johansen, I. T. Christensen and F. S. Jorgensen, *J. Med. Chem*, 2001, **44**, 2333-2343.
86. R. X. Wang, L. H. Lai and S. M. Wang, *J. Comput. Aided. Mol. Des*, 2002, **16**, 11-26.
87. I. Muegge, *J. Med. Chem*, 2006, **49**, 5895-5902.
88. M. D. Eldridge, C. W. Murray, T. R. Auton, G. V. Paolini and R. P. Mee, *J. Comput. Aided. Mol. Des*, 1997, **11**, 425-445.
89. D. C. Rees, *Nature Rev. Drug. Discov*, 2004, **3**, 660-672

Partie II :
Résultats et discussions

Chapitre I :
Criblage par Docking d'une
chimiothèque de xanthones

1. Choix d'une cible à intérêt biologique:

Dans Le cadre de notre thématique de recherche qui porte sur le développement de nouveaux inhibiteurs de l' α -glucosidase, l'enzyme Maltase Glucoamylase (MGAM) intestinale de souche humaine (EC: 3.2.1.20) de la famille GH31¹ a été sélectionnée comme cible biologique pour réaliser notre criblage qui vise le développement de nouveaux dérivés de xantones inhibiteurs de l' α -glucosidase en tant que substances médicamenteuses candidates.

La structure tridimensionnelle de format Pdb de la protéine qui représente le domaine catalytique de MGAM (ntMGAM), co-cristallisée avec le Miglitol est disponible dans la Protein Data Bank sous le code PDB 3L4W avec une résolution de 2.0Å. Ce récepteur est un monomère de protéine avec une séquence d'une longueur de 875 acides aminés. Le miglitol identifié précédemment en tant qu'excellent inhibiteur de MGAM a été utilisé au cours de cette étude comme inhibiteur de référence afin d'identifier le site actif du récepteur.

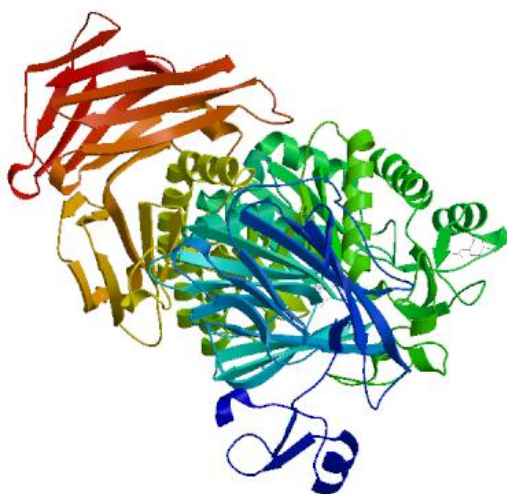


Figure I. 1. Structure de Maltase GlucoAmylase (PDB : 3L4W)

2. Chimiothèque de ligands : Création et préparation

Notre choix s'est porté sur une famille de ligands cibles ayant prouvé leur effet inhibiteur sélectif vis-à-vis de l' α -glucosidase : les dérivés de xantones². Une sélection de ces dérivés à partir de la littérature a mené à la construction d'une chimiothèque virtuelle à cribler comprenant 189 dérivés de xantones qui n'ont pas encore montré une activité

inhibitrice vis-à-vis de l' α -glucosidase. Leurs structures moléculaires sont illustrées dans l'annexe (X₁ à X₁₈₉).

On peut noter que certains ligands ne sont pas décrits dans la littérature. En effet, ils ont été sélectionnés après avoir apporté quelques modifications structurales virtuelles, dans le but d'enrichir notre librairie et de générer une base de ligands divers en terme de structure, en variant les groupements fonctionnels portés par le squelette de base dibenzo- γ -pyrone.

Après avoir créé la librairie, les structures des ligands ont été dessinées, transformées en 3D en format SDF et ensuite minimisées afin d'obtenir une conformation de basse énergie pour chaque ligand à l'aide du logiciel Hyprechem7 en utilisant la méthode semi-empirique PM3.

3. Le processus du docking moléculaire:

Tous les docking effectués lors de cette étude ont été assistés par Molegro Virtual Docker (MVD 2012.5.5.0, Molegro ApS). Notre choix de ce logiciel est justifié par sa meilleure performance pour étudier et prédire le mode d'interaction ligand-récepteur en comparaison avec d'autres logiciels fréquemment utilisés tels que Autodock, Superflex, Flex and Gold³⁻⁵.

Pour une meilleure visualisation après les simulations du docking, les résultats obtenus ont été stockés et traités avec le logiciel PyMol⁶.

3.1. Post-préparation du récepteur et des ligands par MDV:

Les fonctions de préparation automatique intégré dans MVD permettent d'importer le complexe cible et les ligands dans l'espace de travail «work space» dans lequel le récepteur est considéré comme un corps rigide en gardant les résidus fixes et les ligands sont flexibles avec l'exclusion des molécules d'eau. Les préparations sont principalement :

- ajout des hydrogènes explicites
- assignement des charges
- correction des types des liaisons (simple ou double).
- détection des torsions et les liaisons rotatives.

3.2. Détection des cavités et définition du site actif :

Molegro virtual Docker (MVD) possède un algorithme de détection de cavités moléculaires dans le volume tridimensionnel du récepteur afin de prédire les sites d'interactions possibles. Cet algorithme basé sur une grille « grid-based » fonctionne comme suit:

Une grille discrète d'une résolution de 0,8 Å couvrant tout le volume de la protéine est créée. A chaque point de cette grille, une sphère de rayon 1,4 Å est placée en vérifiant l'intersection de ces sphères avec celles de Van der Waals des atomes de protéine. Les points de grille qui chevauchent avec les atomes de protéine sont définis comme points inaccessibles et les autres sont considérés points accessibles.

Chaque point accessible de cette grille sera analysé afin de vérifier s'il fait partie de la cavité par l'insertion des lignes de directions aléatoires à partir de ce point jusqu'à franchir les limites de la grille. Si la majorité des directions franchissent d'autres points accessibles au cours de leurs chemin (à revoir défaut au moins 12 sur 16 directions différents testés), ce point est considéré faisant partie d'une cavité. Ceci est répété un certain nombre de fois pour définir tous les points accessibles des cavités. La dernière étape consiste à déterminer les régions de cavités en connectant les points voisins. Les cavités trouvées sont ensuite classées en fonction de leur volume.

Par le biais de cet algorithme, nous avons détecté cinq cavités pour la MGAM (Figure2)

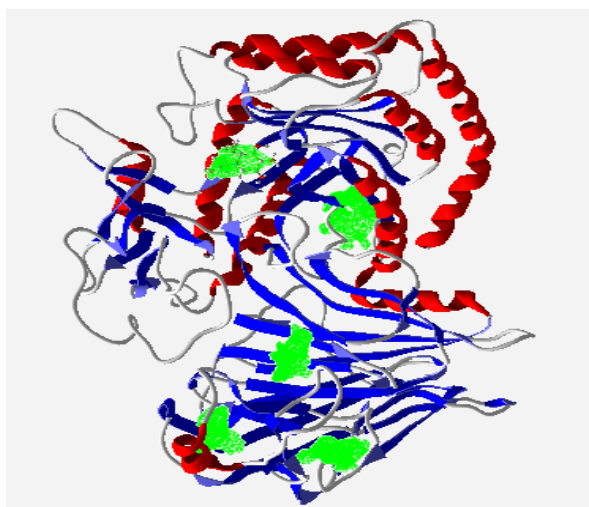


Figure I. 2. Illustration des cinq cavités du MGAM détectées (en vert) par l'algorithme de détection de MVD

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthones

Les cavités sont classées selon leur volume (tableau 1).

Tableau I. 1: les cavités détectées avec l'algorithme de détection de MVD pour 3L4W

Cavité détectée	Volume (\AA^3)	Surface (\AA^2)	Coordonnées (X,Y,Z)
Cavité 1	86.02	312.32	(50.44, 111.11, 21.79)
Cavité 2	68.09	240.64	(55.10, 77.11, -7.6)
Cavité 3	62.46	179.2	(41.55, 76.92, -3.55)
Cavité 4	53.76	188.16	(54.08, 73.55, 8.67)
Cavité 5	51.2	147.2	(44.95, 91.39, 35.06)

Lors de notre investigation des cavités candidates pour un éventuel site d'interaction de notre étude docking, à l'aide de l'algorithme de prédiction de cavités, nous avons remarqué que le ligand de référence (miglitol) est co-cristallisé dans la cavité 5 et entouré par les résidus catalytiques. Nous avons donc décidé de conserver cette cavité pour la considérer comme centre de recherche (research center) pour le processus du docking. Cette sphère de recherche couvre tous les résidus du site actif avec un rayon de 15 \AA .

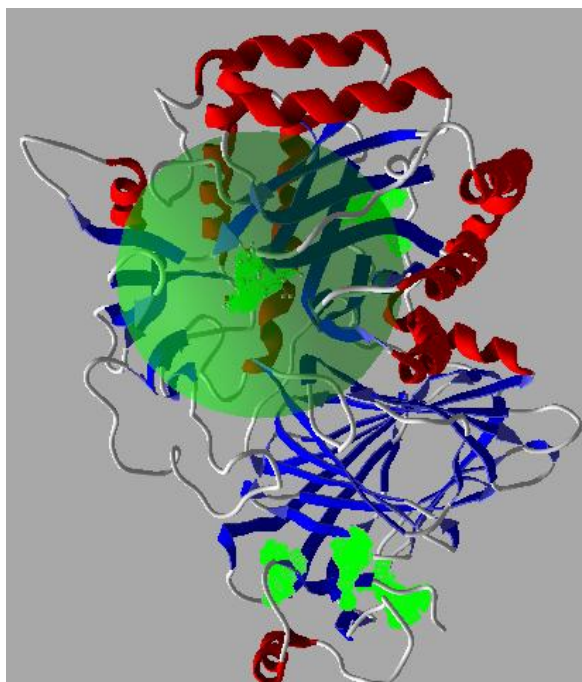


Figure I. 3. Illustration de l'espace de recherche

3.3. Protocole et validation :

3.3.1. Algorithme de recherche :

L'algorithme de recherche MolDock Optimizer utilisé dans MVD est un algorithme évolutionnaire basé sur une évolution différentielle guidée (Guided Differential Evolution). L'innovation dans cet algorithme introduite par Storn et Price⁷, en comparaison avec d'autres algorithmes évolutionnaires connus, consiste en une approche différente pour sélectionner et modifier les solutions de candidats (individus). La principale idée innovante dans le DE est la création de solutions dites "enfants" à partir d'une différence par rapport aux individus initiaux "parents" de la population.

-Représentation des individus de la population :

Seules les propriétés des ligands sont représentées pour les individus puisque la protéine reste rigide lors du docking. Ainsi, chaque solution est encodée en représentant sa position, son orientation et sa conformation avec des coordonnées cartésiennes, un vecteur de rotation, un angle de rotation et un angle de torsion pour chaque liaison flexible.

Ces paramètres sont attribués initialement au ligand de manière aléatoire pour définir les individus "parents" de la population. Pour chaque individu de la population initiale, une position aléatoire à l'intérieur de l'espace de recherche (déjà défini) est attribuée. L'initialisation de l'orientation se déroule en choisissant simplement l'axe d'orientation (entre -1,0 et +1,0, suivi par la normalisation des valeurs pour former un vecteur unitaire) et l'angle de rotation compris entre -180° et $+180^\circ$. Les angles flexibles de torsion (le cas échéant) se voient attribuer également un angle aléatoire entre -180° et $+180^\circ$.

-Principe de l'algorithme:

Une des raisons pour lesquelles l'algorithme évolutionnaire différentielle est attribué au MVD c'est sa capacité à nous permettre l'exploitation d'une diversité importante de la population: la progression des solutions parentales ,initialement générées de manière aléatoire avec une grande variation, entrainera la création de nouvelles solutions "enfants" largement différentes.

Cet algorithme converge vers les meilleures solutions évaluées à l'aide d'une fonction de score, ce qui a pour résultat la diminution de la taille de la population et la création de meilleurs solutions enfants. Ensuite, les solutions enfants remplacent les parents, si et

seulement si elles sont plus adaptées. Dans le cas contraire, le parent survit et est transmis à la prochaine génération (appelé itération de l'algorithme) (figure 4). Ce processus est exécuté aussi longtemps que la condition de fin de recherche n'est pas remplie.

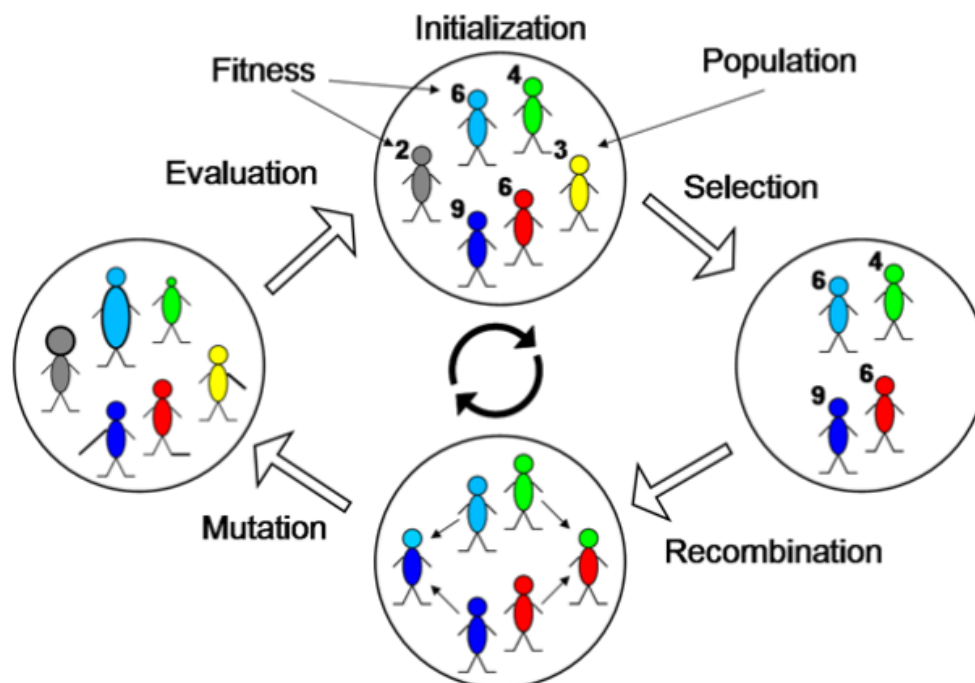


Figure I. 4. Principe de l'algorithme évolutionnaire différentiel de MDV

Nous avons utilisé Moldock optimizer comme algorithme de recherche avec le réglage algorithmique suivant:

- Nombre de tours (runs) : 100
- Taille de population : 150
- Itération maximale de l'algorithme: 2000
- Taux de croisement = 0,9
- Fin de recherche : basée sur la variation «variation-based»

3.3.2. Fonction de score:

Lors de la simulation du docking plusieurs poses candidates peuvent être obtenus pour chaque ligand, ici, nous sélectionnons les meilleures poses avec les énergies les plus basses par le biais de la fonction de score basée sur une grille «MolDock Score [Grid]» qui précalcule les valeurs d'énergies d'interaction sur une grille cubique régulièrement espacée

afin de réduire le temps de calcul. Cette fonction de score utilisée par MVD est un dérivé amélioré des fonctions de score PLP (piecewise linear potential) initialement proposées par Gehlhaar et al.^{8, 9} et développées plus tard par Yang et al.¹⁰ avec l'insertion de nouveaux termes de liaisons hydrogène et de charges.

La fonction de score, E_{score} , est définie par les termes d'énergie suivants:

$$E_{\text{score}} = E_{\text{inter}} + E_{\text{intra}} \quad \text{eq. 1}$$

Avec : E_{inter} : énergie d'interaction ligand-protéine

E_{intra} : énergie d'interaction intramoléculaire du ligand

L'énergie d'interaction ligand-protéine E_{inter} est donnée par l'équation suivante:

$$E_{\text{inter}} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{proteine}} \left[E_{\text{PLP}}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad \text{eq. 2}$$

Cette équation prend en compte tous les atomes lourds (i) du ligand et les atomes lourds (j) de la protéine ainsi que les atomes des cofacteurs et des molécules d'eau (le cas échéant).

- E_{PLP} : le potentiel linéaire PLP

- $332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2}$: décrit les interactions électrostatiques entre les atomes chargés. La

valeur numérique 332.0 est donnée pour fixer l'unité de l'énergie électrostatique en Kcal/mol.

- $D(r) = 4r_{ij}$: constante diélectrique

- q_i et q_j : représentent respectivement les charges des atomes du ligand et des atomes de la protéine.

Des exemples de charges des atomes sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau I. 2: Templates de charges prisent en compte par MolDock Score [Grid].

Atomes de ligand	Atomes de protéines	Charges
Les atomes N dans $-C(NH_2)_2$	His (atomes N) Arg (atomes N)	0.5
Les atomes N dans - $N(CH_3)_2$ et $-(NH_3)$	Lys (atomes N)	1.0
Les atomes O dans - COO, $-SO_4$, $-PO_2$	Asp (atomes O) Glu (atomes O)	-0.5
Les atomes O dans $-PO_3$		-0.66
Les atomes O dans $-SO_3$		-0.33
Les atomes N dans $-SO_2NH$		-0.1
Ions métalliques tel que Na^+		+1.0
Ions métalliques tel que Ca^{+2} et Fe^{+2}		+2.0

Le potentiel E_{PLP} prend en considération principalement deux paramètres; le premier optimise les interactions stériques (Van der Waals) entre les atomes et l'autre optimise les potentiels des liaison hydrogènes.

Une liaison est considérée comme une liaison hydrogène si l'un des atomes peut donner un atome d'hydrogène et l'autre atome peut l'accepter. Les types d'atomes qui peuvent contribuer à la formation de liaisons hydrogène sont classés selon le tableau 3.

Tableau I. 3: Type d'atomes contribuant à la formation d'une liaison hydrogène.

Atomes	Types
N et O sans H liés	Accepteur
N et S avec un ou plusieurs H liés	Donneur
O avec H attachés	Accepteur et donneur

L'équation suivante représente l'énergie d'interaction intramoléculaire du ligand

E_{intra} :

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligand}} \sum_{j \in \text{ligand}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{liaisons flexibles}} A [1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad \text{eq. 3}$$

Le premier terme de cette équation correspond à la somme d'énergies d'interaction entre toutes les paires d'atomes du ligand. Le second terme représente l'énergie de torsion, cette énergie dépend essentiellement de l'hybridation des atomes liés (tableau 4). θ est l'angle de torsion de la liaison, cet angle ne correspond pas nécessairement à une seule torsion, une moyenne est définie dans le cas où plusieurs torsions sont déterminées. Le dernier terme, E_{clash} , correspond à une constante de pénalité attribuée à l'équation afin d'éliminer les conformations **infaisables** du ligand; la valeur de cette constante est de 1000 si la distance entre deux atomes lourds est inférieure à 2,0 Å. Si un atome lourd du ligand est situé en dehors de la région du site d'interaction (l'espace de recherche) une constante de pénalité E_{clash} de 10000 est attribuée.

Tableau I. 4: Les paramètres correspondant à l'énergie de torsion.

Liaison	θ_0	m	A
sp ² -sp ³	0.0	6	1.5
sp ³ -sp ³	π	3	3.0
sp ² -sp ²	0.0	2	3.0

A la fin du processus du docking, un ensemble de poses prometteuses est généré et les termes d'énergie calculés (tableau 5) sont stockés et regroupés dans un fichier de format «mvdresults» destiné à être inspecté dans le «work space» du MVD ou avec Molegro Data Modeller.

Tableau I. 5: Les termes d'énergie calculés avec la fonction de score MolDock Optimizer.

Terme d'énergie	Signification
E_{Tolat}	Energie totale MolDock Score
E_{Inter} (protein - ligand)	Energie d'interaction MolDock Score totale entre le ligand et la proteine).
E_{Steric}	Energie d'interaction stérique entre la protéine et le ligand (calculé par PLP).
H_{Bond}	Energie de liaison hydrogène entre la protéine et le ligand (calculé par PLP).
Electro	Energie d'interaction électrostatique protéine-ligand pour courte distance interatomique ($r < 4.5 \text{ \AA}$)
ElectroLong	Energie d'interaction électrostatique protéine-ligand pour longue distance interatomique ($r > 4.5 \text{ \AA}$)
E_{Intra}	Energie total MolDock Score interne du ligand (interactions intramoléculaires).
E_{Intra} (steric)	Energie d'interaction stérique du ligand (calculé par PLP).
E_{Intra} (hbond)	Energie de liaison hydrogène du ligand (calculé par PLP).
E_{Intra} (elec)	Energie d'interaction électrostatique du ligand
E_{Intra} (tors)	Energie de torsion du ligand

3.3.3. Validation du protocole de docking:

Pour valider notre protocole du docking basé sur une combinaison de l'algorithme de recherche Moldock Optimizer et la fonction de score Moldock Score [Grid], nous avons évalué la précision de positionnement de la meilleure pose (top-scoring) du ligand de référence "Miglitol". Cette pose est obtenue après application du protocole du docking sur le complexe miglitol-site actif qui a généré plusieurs poses. La meilleure est choisie selon l'énergie totale d'interaction (MolDock Score) la plus basse d'une valeur de -81.747 Kcal /mol.

Cette énergie sera également utilisée comme énergie de référence avec les autres ligands de la chimiothèque à cribler. Cette validation nécessite deux étapes.

La première étape est le «Re-docking», considéré comme la méthode d'évaluation la plus populaire. Elle a pour but la détermination de la capacité du protocole du docking à générer une pose avec un positionnement dans le site d'interaction identique ou très proche à celui de la structure cristallographique originale. Cette méthode s'intéresse à l'écart quadratique moyen « RMSD » (Root Mean Square Deviation)¹¹, qui est une mesure géométrique de la distance entre les positions atomiques du ligand de référence co-cristallisé expérimentalement avec les coordonnées $(x_{cristal}, y_{cristal}, z_{cristal})$ et celles de la structure prédite ligand (pose) $(x_{pose}, y_{pose}, z_{pose})$ repositionnée après application du protocole du docking dans le site d'interaction. L'écart RMSD est donné par l'équation suivante:

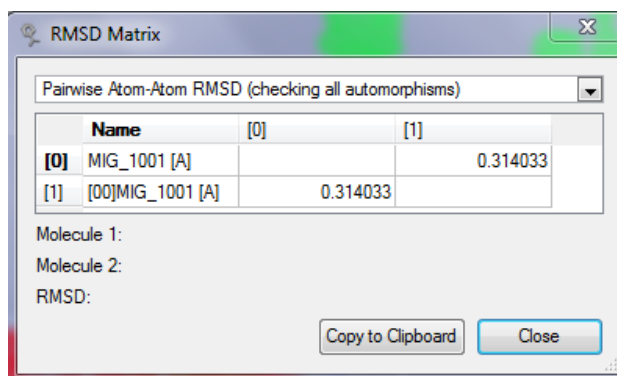
$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_{cristal_i} - x_{pose_i})^2 + (y_{cristal_i} - y_{pose_i})^2 + (z_{cristal_i} - z_{pose_i})^2} \quad eq.4$$

Avec :

- n : le nombre total d'atomes lourds.
- $(x_{cristal_i}, y_{cristal_i}, z_{cristal_i})$ et $(x_{pose_i}, y_{pose_i}, z_{pose_i})$ sont respectivement les coordonnées cartésiennes des atomes identiques de la structure expérimentale et de la structure prédite.

Il est considéré que les meilleurs protocoles du docking génèrent des valeurs RMSD inférieure à 2,0Å, cette valeur est un seuil au-dessus duquel la précision du positionnement est jugée mauvaise, entraînant l'invalidation du protocole¹².

Pour notre étude, le calcul de la valeur RMSD est effectué avec MVD en appliquant le protocole du docking décrit précédemment avec définition du miglitol co-cristallisé comme un ligand de référence. La simulation du re-docking a généré un RMSD équivalent à 0.31 Å (figure 5), largement inférieur au seuil, ce qui indique que notre protocole a réussi et qu'il est applicable pour le reste de cette étude.



Name	[0]	[1]
[0] MIG_1001 [A]		0.314033
[1] [0]MIG_1001 [A]	0.314033	

Figure I. 5. Matrice de RMSD générée par MDV après la simulation du re-docking

La superposition du miglitol et sa meilleure pose générée (figure 6), visualisée par Pymol, confirme la précision du positionnement et la génération d'une conformation quasi similaire à celle cristallographique originale.

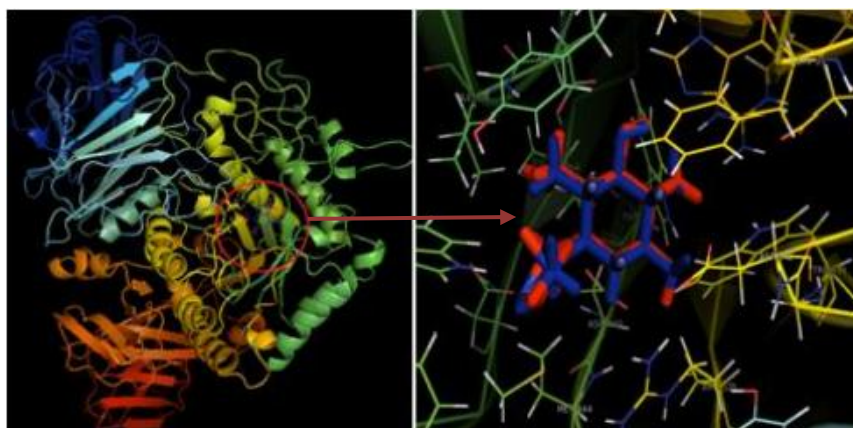


Figure I. 6. La superposition de la structure cristallographique du ligand (en bleu) et la pose obtenue après re-docking (en rouge), RMSD = 0.31 Å

La deuxième partie consiste en une classification de précision du positionnement basée sur les interactions «interactions-based accuracy classification (IBAC)» qui repose sur une inspection visuelle des structures co-cristallisées et prédites¹³, le grand avantage de cette classification par rapport au RMSD est la prise en compte des interactions. Cette classification débute par une inspection visuelle du complexe co-cristallisé ligand-site d'interaction pour déterminer précisément l'ensemble des interactions, suivie par une autre inspection du complexe pose prédite-site d'interaction. Le positionnement de la pose prédite est dit correct si la conformation et son orientation ainsi que toutes les interactions clés sont similaires à celles de la structure originale du ligand de référence. Dans le cas contraire, le positionnement est déclaré incorrect.

En inspectant visuellement le site d'interaction du complexe cristallographique 3L4W, le miglitol montre une bonne affinité avec les résidus du site actif et notamment les résidus catalytiques. Cette affinité qui est à l'origine de son potentiel inhibiteur, se traduit par la formation de liaisons hydrogène intéressantes avec les résidus Asp 327, His 600, Arg526 et notamment avec les résidus catalytiques Asp 443 et Asp542.

En observant de plus près les résidus en interaction avec la pose (Figure 7), nous avons pu constater que cette pose interagit avec la même manière que le ligand cristallographique, grâce à des liaisons hydrogène de les même résidus: Asp 327, His 600, Arg526, le catalyseur nucléophile Asp 443 et le catalyseur acide / base Asp542.

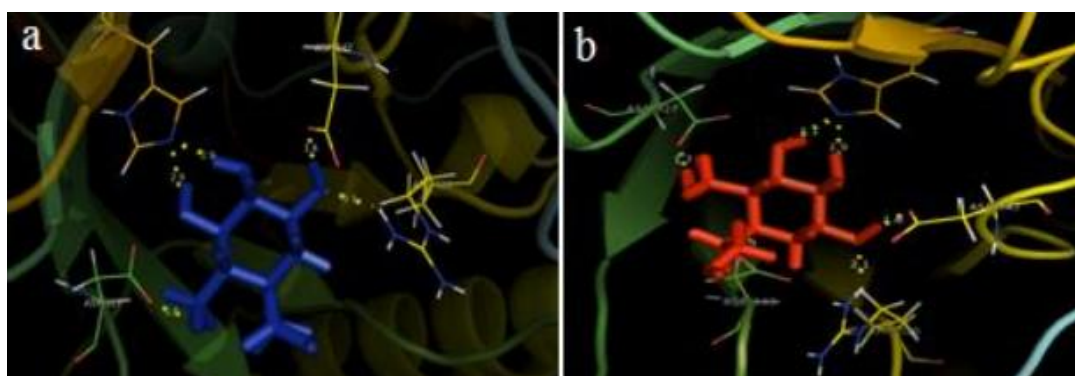


Figure I. 7. visualisation comparative entre le mode d'interaction du ligand cristallographique avec les résidus adjacents (a), et celui de la pose dans le même site d'interaction (b)

La conformation et l'orientation de la pose prédite quasi identiques à celles du ligand de référence prouvé avec un RMSD de 0.31Å et les modes d'interaction très similaires indiquent une excellente précision de positionnement validant ainsi notre protocole.

4. Criblage de la chimiothèque :

Le criblage débute par l'importation de tous les ligands de notre chimiothèque de 189 dérivés xanthone dans le «work space» du MVD, les ligands subissent une post-préparation avec l'outil de préparation automatique du logiciel afin de vérifier et de s'assurer que les propriétés structurales de chaque ligand sont prises en compte par le logiciel.

Une fois la chimiothèque importée, tous les ligands seront orientés vers l'espace de recherche déjà défini en appliquant le protocole précédemment décrit et validé. Le «scoring» des poses obtenues pour chaque ligand (après 100 tours de recherche) mène à un classement des meilleures poses basé sur leurs énergies d'interaction «Moldock score». Ainsi, pour chaque élément de la chimiothèque, une seule pose prédite est sélectionnée, et donc 189 poses

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthones

prédites sont retenues et classées dans un ordre décroissant de l'énergie d'interaction (tableau 6).

Tableau I. 6: Les énergies d'interaction Moldock score des meilleurs poses obtenues pour chaque ligand de la chimiothèque.

Ligand (pose)	Moldock Score (Kcal/mol)	Ligand (pose)	Moldock Score (Kcal/mol)	Ligand (pose)	Moldock Score (Kcal/mol)
X170	-151.543	X115	-123.833	X72	-117.307
X117	-149.164	X116	-122.717	X119	-117.138
X103	-143.448	X173	-122.479	X88	-116.38
X138	-140.546	X165	-122.157	X86	-116.319
X120	-138.459	X166	-122.07	X93	-116.098
X156	-136.894	X94	-121.972	X118	-116.074
X47	-136.033	X164	-121.058	X139	-115.772
X111	-135.549	X54	-120.915	X65	-115.522
X113	-135.197	X162	-120.237	X187	-114.676
X161	-134.515	X158	-120.167	X188	-114.648
X108	-133.964	X21	-120.018	X106	-114.043
X112	-133.583	X186	-119.016	X14	-113.7
X110	-133.411	X163	-118.77	X183	-113.681
X105	-132.543	X68	-118.565	X64	-113.315
X107	-128.99	X169	-118.142	X184	-113.071
X102	-128.323	X167	-118.023	X80	-113.024
X109	-127.288	X92	-117.815	X189	-112.496
X114	-126.51	X67	-117.722	X91	-112.186
X168	-124.736	X160	-117.676	X76	-112.158
X155	-124.574	X96	-117.319	X23	-112.15

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthones

X83	-111.908	X74	-106.701	X8	-95.1364
X13	-111.884	X135	-106.556	X129	-95.0649
X26	-111.826	X63	-105.919	X60	-94.6729
X97	-111.575	X182	-105.917	X123	-104.515
X22	-111.555	X24	-104.311	X157	-94.3818
X66	-111.492	X79	-104.099	X133	-93.9119
X90	-111.017	X75	-103.353	X5	-93.846
X185	-110.806	X101	-103.039	X141	-83.1848
X12	-110.624	X16	-102.659	X73	-93.2205
X62	-110.545	X27	-102.008	X6	-92.8537
X82	-110.491	X70	-101.95	X179	-92.8321
X128	-110.221	X95	-101.529	X7	-92.7068
X28	-109.538	X172	-101.425	X44	-92.3004
X85	-109.502	X71	-100.683	X152	-91.9796
X78	-109.474	X61	-100.605	X124	-91.7566
X19	-109.33	X25	-100.289	X2	-90.5626
X84	-108.752	X126	-100.043	X3	-90.4382
X171	-108.711	X100	-100.013	X153	-90.2744
X81	-108.577	X143	-99.3059	X69	-89.601
X20	-108.264	X51	-98.9741	X149	-89.14
X104	-107.691	X99	-98.4858	X59	-89.1134
X87	-107.454	X77	-98.2944	X89	-89.078
X9	-107.215	X127	-97.766	X30	-89.0268
X17	-106.932	X50	-97.6604	X11	-88.8986
X104	-107.691	X159	-96.385	X154	-88.712

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthones

X87	-107.454	X29	-95.7395	X35	-88.0682
X9	-107.215	X55	-95.6543	X178	-87.9111
X17	-106.932	X137	-95.4874	X98	-87.4397
X56	-87.336	X4	-84.1264	X136	-78.8679
X18	-87.3201	X40	-83.6227	X46	-77.8856
X180	-87.2636	X52	-83.4102	X34	-76.0164
X49	-87.1513	X36	-82.68	X140	-75.9925
X48	-87.11	X39	-82.2888	X32	-75.9676
X121	-100.688	X37	-82.2576	X151	-75.6734
X38	-86.8129	X43	-81.9355	X174	-74.4626
X1	-86.4932	X122	-81.8997	X58	-72.662
X41	-86.6608	X33	-81.4748	X31	-71.4507
X53	-86.1501	X130	-81.3877	X145	-70.4481
X150	-84.8449	X131	-80.9616	X144	-69.5229
X15	-84.658	X42	-80.3901	X45	-67.5541
X176	-84.5479	X148	-80.1889	X177	-66.9966
X10	-84.4045	X125	-79.7396	X146	-64.8531
X142	-84.3002	X57	-79.3222	X147	-64.3883
X175	-84.1594	X132	-79.1058		

Parmi ces 189 poses, dont les énergies Moldock score varient entre -151.54 et -64.38 Kcal/mol, nous avons sélectionné les 20 meilleures dites « Top-scoring » (figure 8), ayant les valeurs énergétiques d'interaction les plus basses.

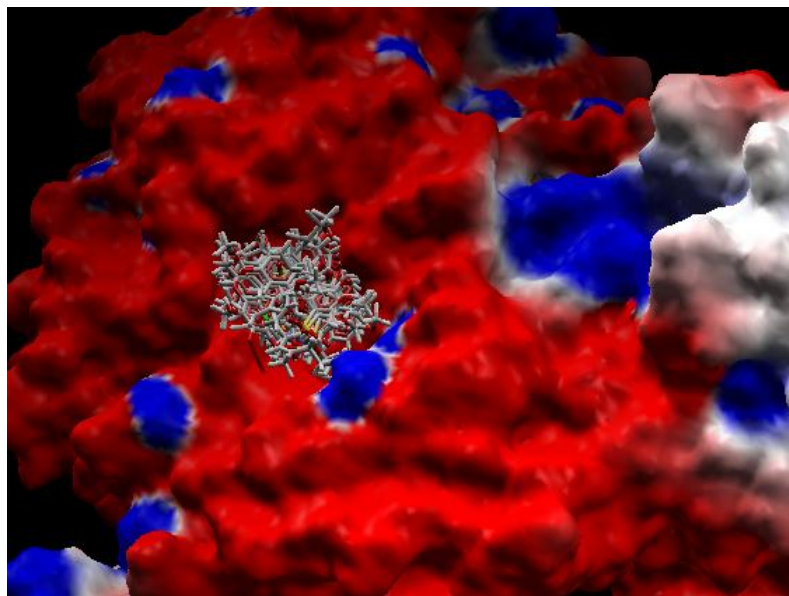


Figure I. 8. Positionnement des vingt «Top-scoring» poses représentant les ligands de la chimiothèque dans le site d'interaction.

Ces vingt ligands représentent, du point de vue énergétique, une bonne affinité avec les résidus du site actif (tableau 7). Cette affinité est due essentiellement à la présence des interactions de liaisons hydrogène représentées par une valeur énergétique «H_{bond} Score», et des interactions hydrophobiques de type π - π (Van Der Walls) «VDW».

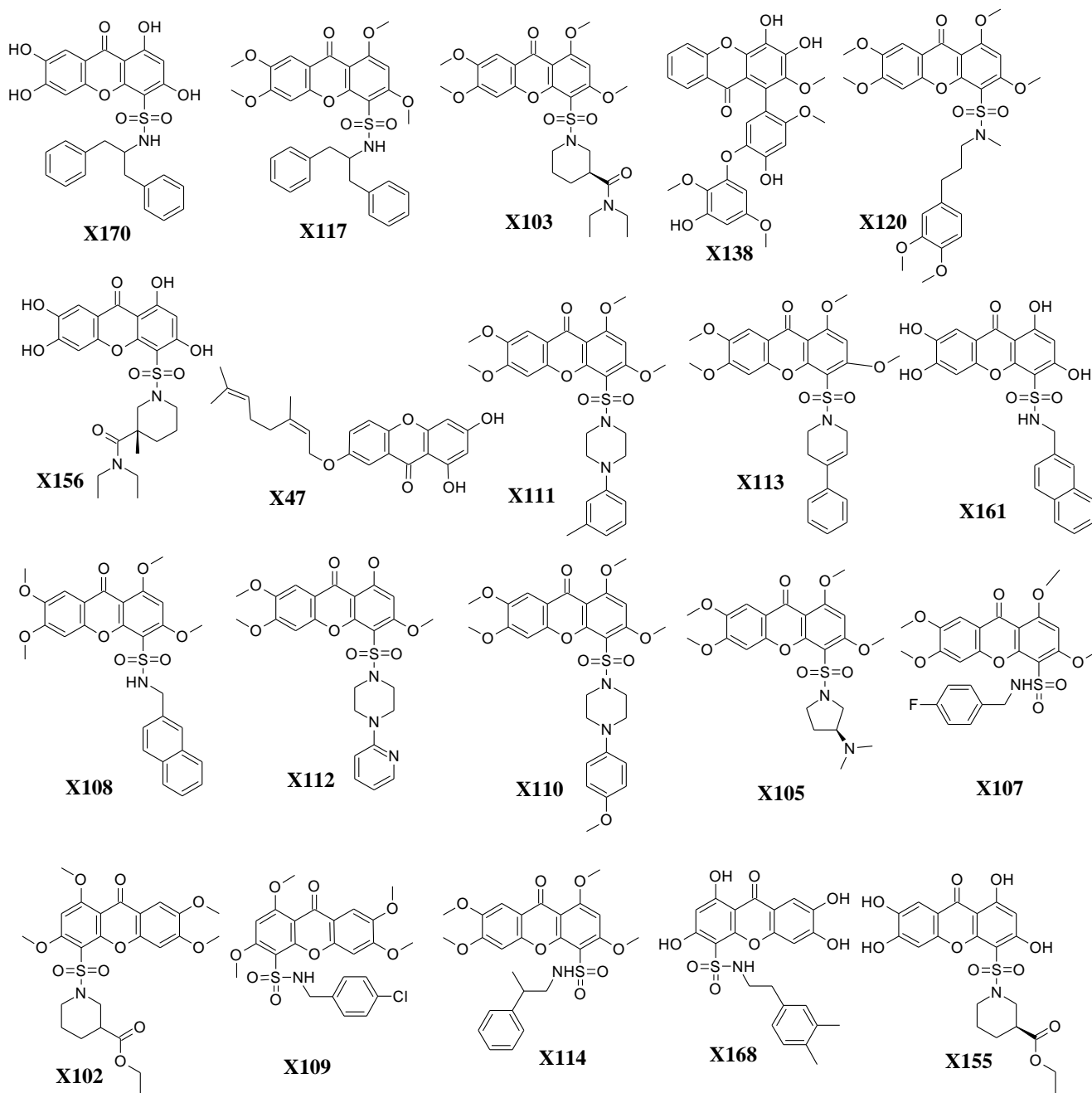
Tableau I. 7: Les énergies d'interaction MolDock Score, Hbond Score et VDW des 20 meilleurs poses sélectionnés et le miglitol.

Ligand	Moldock Score (Kcal/mol)	Hbond Score (Kcal/mol)	VDW (Kcal/mol)
Miglitol	-81.747	-17.684	-24.123
X170	-151.543	-21.8045	-39.408
X117	-149.164	-6.3648	-53.0356
X103	-143.448	-7.63514	-48.5584
X138	-140.546	-6.87024	-54.0503
X120	-138.459	-3.51585	-17.657

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthones

X156	-136.894	-17.0098	-15.9694
X47	-136.033	-8.82717	-45.187
X111	-135.549	-5.95684	-17.7255
X113	-135.197	-8.62535	-51.6191
X161	-134.515	-19.0537	-34.748
X108	-133.964	-6.80362	-49.0377
X112	-133.583	-11.0071	-53.647
X110	-133.411	-5.08771	-50.5477
X105	-132.543	-6.15226	-47.8284
X107	-128.99	-7.89712	-44.7367
X102	-128.323	-4.98946	-47.9053
X109	-127.288	-7.77745	-42.9553
X114	-126.51	-5.28926	-44.4706
X168	-124.736	-19.1923	-12.2206
X155	-124.574	-19.9812	-31.3819

Les valeurs d'énergie d'interaction Moldock score des vingt dérivés de xanthone sélectionnés varient de -151.54 à -124.574 kcal/mol, tandis que celle du miglitol est de -81.747 kcal/mol, ce qui indique que ces composés pourraient être d'une affinité comparable à celle de la référence ce qui confère une stabilité meilleure dans le site actif. Les énergies des liaisons hydrogène et de VDW sont également importantes en comparaison avec le miglitol.



Il est primordial de remarquer et noter que dix-huit composés, parmi les vingt ligands choisis (Figure 9), sont des xanthones sulfonamide. Cette remarque nous a mené à prédire un caractère inhibiteur prometteur de cette famille.

X170 et X117 qui sont les meilleurs xanthones sulfonamide dans cette série avec des énergies d'interaction de -151.543 et -149.164 kcal/mol respectivement ont des structures

similaires ce qui explique ces valeurs énergétique très proches. Il est également intéressant de noter que des interactions significatives de type liaison hydrogène ont été détectées pour X170 avec H_{bond} score équivalent à -21.80 kcal/mol, supérieur à celui de la référence. Cette énergie d'interaction est le résultat de la présence de six liaisons hydrogène avec les résidus du site actif (Figure 10) :

- ✓ X170-OH avec Gln603-carbonyl et Gln603-NH (O-O: $d = 2.3$ Å et O-N: $d = 2.8$ Å respectivement)
- ✓ X170-OH avec Gln603-carbonyl (O-O: $d = 2.6$ Å)
- ✓ X170-OH avec Thr205-OH (O-O: $d = 2.7$ Å)
- ✓ X170-OH avec Asp203-CO₂H (O-O: $d = 2.0$ Å)
- ✓ X170-O (du groupement sulfonamide) avec Arg526-NH₂ (O-N: $d = 2.1$ Å).

Des interactions de type VDW sont également présentes avec les résidus Trp406, Tyr605 et Ala576 avec une énergie de -39.408 kcal/mol, due à la présence de plusieurs groupements aromatiques.

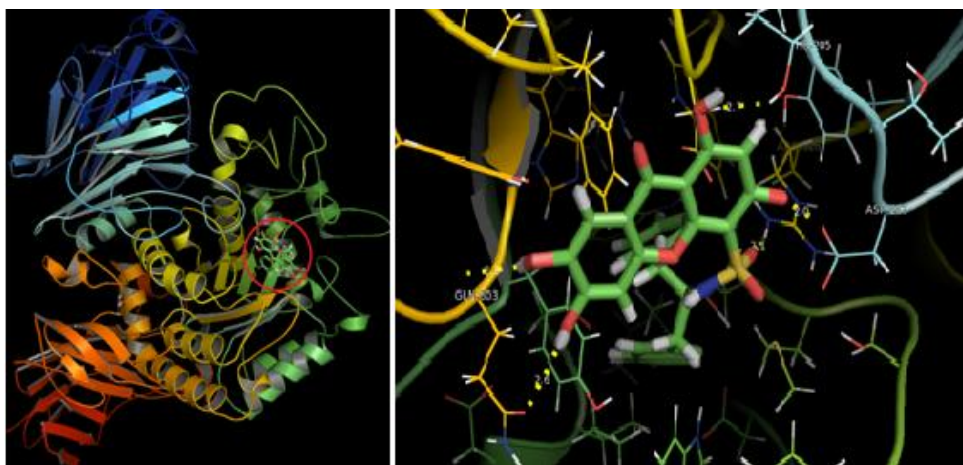


Figure I. 10. Interactions de type liaison hydrogène entre X170 et les résidus du site d'interaction; Arg526, Asp203, Thr205 et Gln603.

Le composé X117 possède 4 groupements methoxy au lieu des hydroxyles dans X170, ce qui s'est manifesté par une diminution importante de l'énergie H_{bond} (-6.365 kcal/mol) expliquée par la détection de trois liaison hydrogène uniquement (Figure 11) :

- ✓ X117-OMe avec Trp406-NH (O-N: $d = 2.5$ Å)
- ✓ X117-O (du groupement sulfonamide) avec Thr205-OH (O-O: $d = 2.3$ Å)
- ✓ X117-N (du groupement sulfonamide) avec Asp542-CO₂H (N-O: $d = 1.8$ Å).

La diminution des liaisons hydrogène est compensée par de fortes interactions hydrophobiques de type VdW (-53.036 kcal/mol) avec Phe450 et Phe575 .

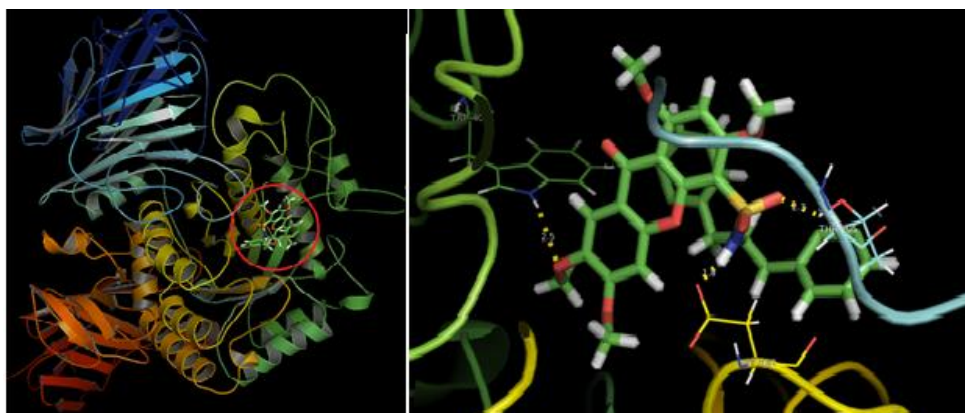


Figure I. 11. Interactions de type liaison hydrogène entre X117 et les résidus du site d'interaction; Trp406, Thr205 et le résidu catalytique Asp542.

La présence des liaisons hydrogène dans le cas du composé non hydroxylé X117 est due essentiellement à la présence du groupement fonctionnel sulfonamide qui a contribué à établir des interactions avec Thr205 et le résidu catalytique Asp542.

X108 et X161 sont également des analogues, le premier possède des groupements méthoxy et le deuxième est tétrahydroxylé, avec des énergies d'interaction très proches: -134.515 et -133.964 kcal/mol respectivement. Ces composés ont montré des modes d'interaction similaires à ceux des composés X170 et X117, dont la présence des groupements hydroxyles dans le composé X161 a favorisé la formation des liaisons hydrogène avec une énergie d'interaction H_{bond} de -19.05 kcal/mol, par contre l'énergie H_{bond} de son analogue tétraméthoxylé X108 est beaucoup moins intéressante (-6.80 kcal/mol). Pour ce dernier, trois liaisons hydrogène ont été détectées entre les atomes du groupement sulfonamide et les résidus du site actif (Figure 12) :

- ✓ X108-O (du groupement sulfonamide) avec Thr205-OH (O-O: $d = 1.9 \text{ \AA}$)
- ✓ X108-N (du groupement sulfonamide) avec Asp542-CO₂H (N-O: $d = 1.9 \text{ \AA}$).
- ✓ X108-O (du groupement sulfonamide) avec Tyr214-OH (O-O: $d = 2.3 \text{ \AA}$)

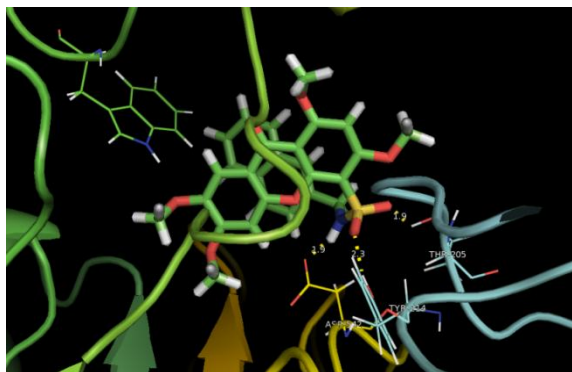


Figure I. 12. liaisons hydrogène entre X108 et les résidus du site d'interaction; Tyr214, Thr205 et le résidu catalytique Asp542.

Pour X161 plusieurs liaisons hydrogène ont été établies entre les quatre groupement hydroxyles et les résidus du site actif (Figure 13) ce qui explique la valeur énergétique intéressante H_{bond} pour ce composé:

- ✓ X161-OH avec Gln603-carbonyle et Tyr299-OH (O-O: $d = 2.4 \text{ \AA}$ et O-O: $d = 2.1 \text{ \AA}$ respectivement)
- ✓ X161-OH avec Gln603-carbonyle et Gln603-NH (O-O: $d = 2.1 \text{ \AA}$ et O-N: $d = 2.2 \text{ \AA}$ respectivement)
- ✓ X161-OH avec Tyr605-OH (O-O: $d = 1.9 \text{ \AA}$)
- ✓ X161-OH avec Thr205-OH (O-O: $d = 1.6 \text{ \AA}$)
- ✓ X161-O (du carbonyle) avec Asp542-CO₂H (O-O: $d = 1.7 \text{ \AA}$).

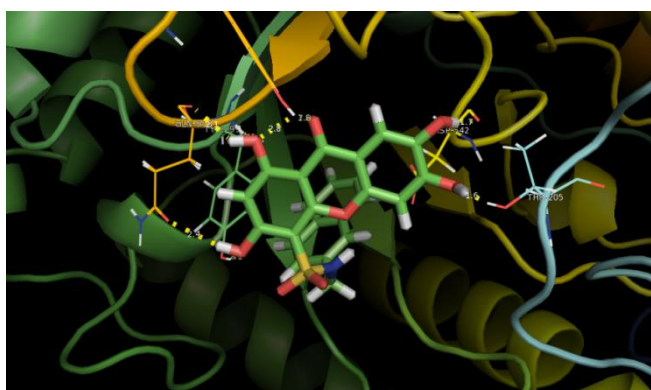


Figure I. 13. liaisons hydrogène entre X161 et les résidus du site d'interaction; Tyr299, Asp542, Thr205, Gln603 et Tyr605.

La présence de plusieurs groupements aromatiques pour X108 et X161 a contribué à la formation de fortes interactions hydrophobiques de type VdW (-49.04 kcal/mol et -34.75 kcal/mol respectivement)

En ce qui concerne les autres dérivés xanthone sulfonamides, des comportements d'interaction similaires en été observés pour les composés tetrahydroxylés X156, X168 et X155 :

- des énergies de liaisons hydrogène H_{bond} importantes de -17.01, -19.19 et -19.98 kcal/mol, dont les groupement hydroxyles et le groupement sulfomanide sont à l'origine de ces interaction (Figure 14).
- des interactions de type VDW avec des valeurs énergétiques de -15.96 , 12.31 et 31.38 kcal/mol.

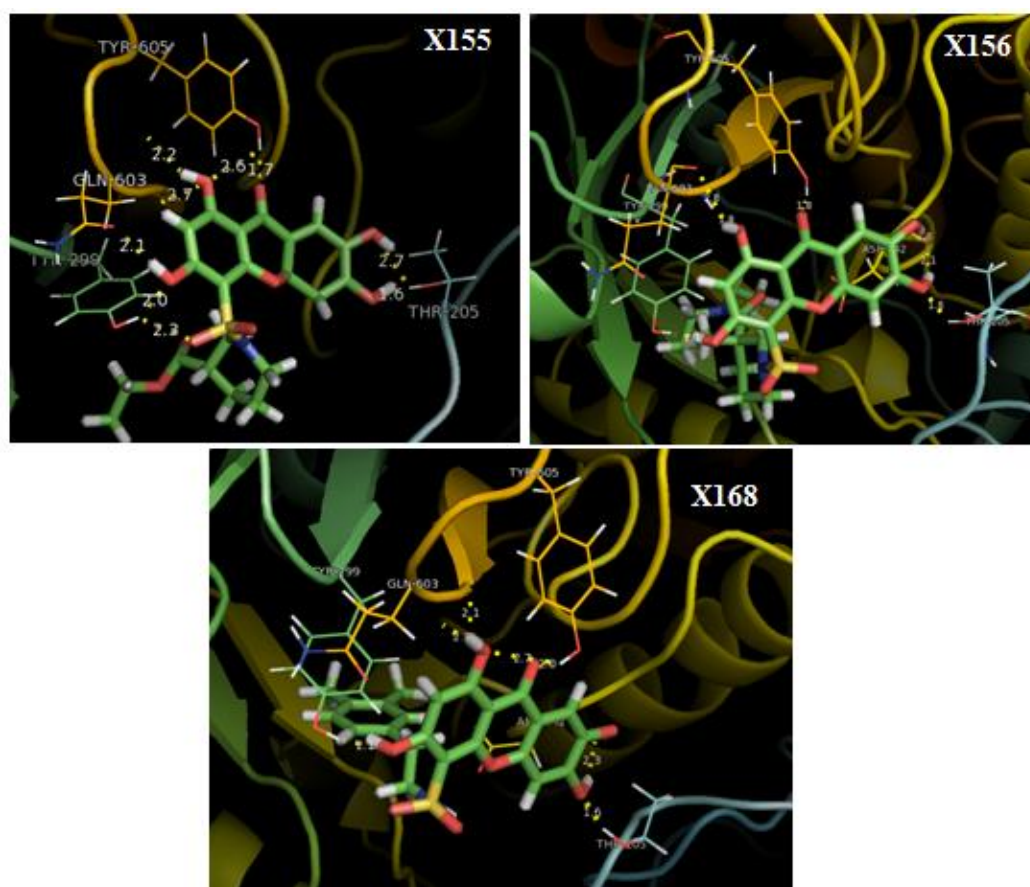


Figure I. 14. liaisons hydrogène établis entre X155, X156 ,X168 et les résidus du site actif.

Les composés tetramethoxy-xanthones sulfonamides X103, X120, X111, X112, X113, X10, X105, X107, X102, X109 et X114 ont également montré des modes d'interaction très similaires, avec des liaisons hydrogène établies entre le groupement sulfonamide ,les groupements methoxy et le carbonyle du xanthone , avec des énergies H_{bond} variant de -4.99 à -11.07 kcal/mol. En revanche, les interaction de types VDW pour ces composés se sont révélées beaucoup plus importantes allant jusqu'à 53.65 kcal/mol.

Comme mentionné précédemment, parmi les vingt ligands top-scoring, seulement deux composés X138 et X47 ne sont pas des dérivés de xanthone sulfamides. En comparant les interactions de liaison hydrogène pour les complexes X138-site d'interaction et X47- site d'interaction (figure 15), les résidus Asp327, Arg526 et Trp406 forment des liaisons hydrogène avec les deux ligands X47 et X138. Il est à noter que X138 et X47 forment également des liaisons hydrogène avec les résidus catalytiques clés Asp542 et His600, respectivement. Des interactions de type Van der Waals ont également été détectées pour les deux complexes (tableau 8).

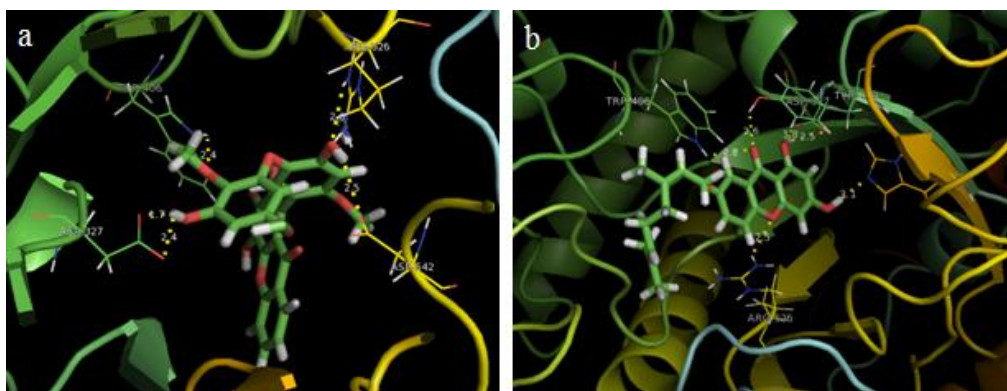


Figure I. 15. Interactions de type liaison hydrogène pour X138 (a) et pour X47 (b)

L'analyse de l'ensemble des interactions établis par les vingt dérivés de xanthone (top-scoring) avec les résidus du site actif, montre trois modes d'interaction; le premier concerne les dérivés tetramethoxy-xanthone sulfonamide, pour lesquels les interaction de type VDW ont été favorisées par rapport aux liaisons hydrogène formées par le groupement sulfonamide qui ont été beaucoup moins intéressantes. Le deuxième mode d'interaction est celui des xanthone sulfonamide tetrahydroxylés, contrairement au mode précédent, les liaisons hydrogène détectées ont été très importantes grâce à la présence de quatre groupements hydroxyle et un groupement sulfonamide, les liaisons de type VDW on été moins intéressantes sauf pour certains dérivés possédant plusieurs groupements aromatiques tels que les composés X117 et X108.

Le troisième mode est celui des dérivés X138 et X47, les groupements hydroxyle ont été à l'origine de l'établissement des liaisons hydrogène.

Certains résidus du site actif ont montré une bonne affinité avec des ligands étudiés tels que le résidu catalytique Asp542 qui a interagi manifestement avec dix ligands et le résidu

Thr205 qui a établi des interactions avec tous les dérivés xanthones sulfonamides. En outre, des liaisons hydrogène dans la plupart des complexes sont établis avec les résidus Tyr299, Tyr605 et Gln603 (tableau 8).

Par ailleurs, les interactions de type VDW ont également contribué à cette affinité dans tous les complexes notamment pour les tetramethoxy-xanthones sulfonamide. Ces affinités favorisent la fixation des ligands étudiés ce qui aurait pour résultat une potentiel inhibition de l'enzyme cible.

Chapitre I. Criblage par docking d'une chimiothèque de xanthones

Residues H _{Bond}	Top-scoring Ligands																			
	X170	X117	X103	X138	X120	X156	X47	X111	X113	X161	X108	X112	X110	X105	X107	X102	X109	X114	X168	X155
Asp327				XX			XX													
His600							X													
Asp542		X		X	X	XX		X		X	X				X		X	X	XX	
Asp443														X						
Arg526	X			X			X					X								
Trp406		X		X			X								X		X	X		
Thr205	X	X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	XX	X	X	X	X	XX	XX
Gln603	XX		X		X	XX		X		XX									X	XX
Asp203	X																			
Tyr605			X			X			XX	XX		X	X						XX	XX
Tyr299			X			X	X	X	X	XX		X							XX	XX
Tyr214											X				X	X	X			
Arg202														X						
VDW																				
Trp406	X		X	X	X		X	X	X	X	X	X						X		X
Met444			X	X		X		X												
Phe450		X					X				X				X		X	X		
Phe575		X	X		X	X		X		X									X	X
Thr205			X			X						X	X	X		X				
Tyr605	X		X	X	X	X				X									X	X
Ala576	X					X				X			X						X	
Tyr299						X		X												
Ser448							X													
Trp441							X	X	X										X	
Tyr214											X		X							

Tableau I. 8: Les interactions de type liaisons hydrogène «H_{Bond}» et de Van der Waals «VDW» des meilleurs dérivés de xanthone «20 top-scoring» établis avec les résidues du site actif. **X** indique l'établissement d'une seule interaction, **XX** l'établissement de plusieurs interactions.

5. Conclusion :

Dans cette partie de travail nous avons appliqué un criblage, basé sur une simulation de docking moléculaire, sur une librairie de 189 dérivés de xanthone afin d'étudier leurs mode d'interaction vis-à-vis de notre cible d'intérêt biologique (l' α -glucosidase). La structure tridimensionnelle de cette enzyme hydrolase de souche humaine est obtenue à partir de la banque des données PDB avec l'identifiant 3L4W en complexe avec le « miglitol ». Le processus du docking est assisté par le programme Molegro Virtual Docker (MVD) avec un protocole basé essentiellement sur l'algorithme évolutionnaire différentiel « MolDock Optimizer » et la fonction de score « MolDock Score » avec une population qui peut aller jusqu'à 150 individus durant les 100 tours de docking. La validation de ce protocole a été réalisée par un re-docking du ligand de référence co-cristallisé avec un RMSD de 0.3Å.

Le classement et l'analyses des énergies d'interactions des 189 dérivés en comparaison avec l'inhibiteur de référence, ont montré que certains xanthones ont une affinité avec les résidus du site actif comparable à celle de la référence. Parmi les meilleurs composés en terme d'énergie d'interactions « top-scoring » nous avons sélectionné vingt, pour une analyse approfondie des types d'interactions et une inspection visuelle. Cette analyse a montré l'affinité favorable des xanthones sulfonamides possédant des énergies d'interaction basées essentiellement sur la formation des liaisons hydrogène et l'établissement des interaction de type VDW. Ces affinités traduisent la stabilité du ligand étudié dans le site actif et favorisent leur fixation ce qui aurait pour résultat une inhibition potentielle de l'enzyme cible.

Ces résultats intéressants nous ont incités à entamer une étude expérimentale sur cette famille de xanthones sulfonamide afin de vérifier l'effet inhibiteur de ces composés vis-à-vis de l' α -glucosidase.

Références Bibliographiques

1. K. J. L. Sim, S. Mohan, R. Nasi, B. D. Johnston, B. M. Pinto, D. R. Rose, *Biochemistry*, 2010, **49**, 443-451.
2. K. Kraim, D. Khatmi, Y. Saihi, F. Ferkous and M. Brahimi, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2009, **97**, 118-126.
3. W. F. D. A. G. Heberlé *Curr. Med. Chem*, 2011, **18**, 1339 -1352.
4. M. H. C. R. Thomsen, *J Med Chem*, 2006, **11**, 3315-3321.
5. J. A. L. J. Q. Araújo, A. da C. Pinto, R. B. de Alencastro, M. G. Albuquerque and *J. Mol. Model*, 2011, **17**, 1401-1412.
6. T. P. M. G. system, ed. L. Schrodinger, 1.8 edn.
7. R. Storn and K. Price, *Tech-report, International Computer Science Institute, Berkley*, 1995.
8. G. V. D. K. Gehlhaar, P. A. Rejto, D. B. Fogel, L. J. Fogel, S. T. Freer *Proceedings of the Fourth International Conference on Evolutionary Programming*, 1995, 615-627.
9. D. B. D. K. Gehlhaar, P. A. Rejto, *Proceedings of the Seventh International Conference on Evolutionary Programming* 1998, 449-461.
10. J. M. Yang and C. C. Chen, *Proteins*, 2004, **55**, 288-304.
11. J. Kirchmair, P. Markt and S. Distinto, *J Comput Aided Mol Des*, 2008, **22**, 213-228.
12. J. L. B. R. A. Friesner, R. B. Murphy, T. A. Halgren, J. J. Klicic, *J Med Chem*, 2004, **47**, 1739-1749.
13. R. T. Kroemer, A. Vulpetti and J. J. McDonald, *J Chem Inf Comput Sci*, 2004, **44**, 871-881.

Chapitre II :

Synthèse de dérivés de xanthone
et étude de leur effet inhibiteur

1. Voie de Synthèse de quelques dérivés de xanthes sulfamide sélectionnés à partir du criblage :

Pour tenter d'apporter une confirmation des résultats du screening virtuel par une approche de docking moléculaire menée sur notre chimiothèque de 189 dérivés de xanthone, la synthèse de quelques dérivés de xanthone sulfonamides élues de ce criblage a été mise au point afin de pouvoir tester l'inhibition de ces dérivés vis-à-vis de l' α -glucosidase.

La synthèse a été effectuée selon la séquence réactionnelle (schéma 1) décrite précédemment par Hu et al¹., légèrement modifiée.

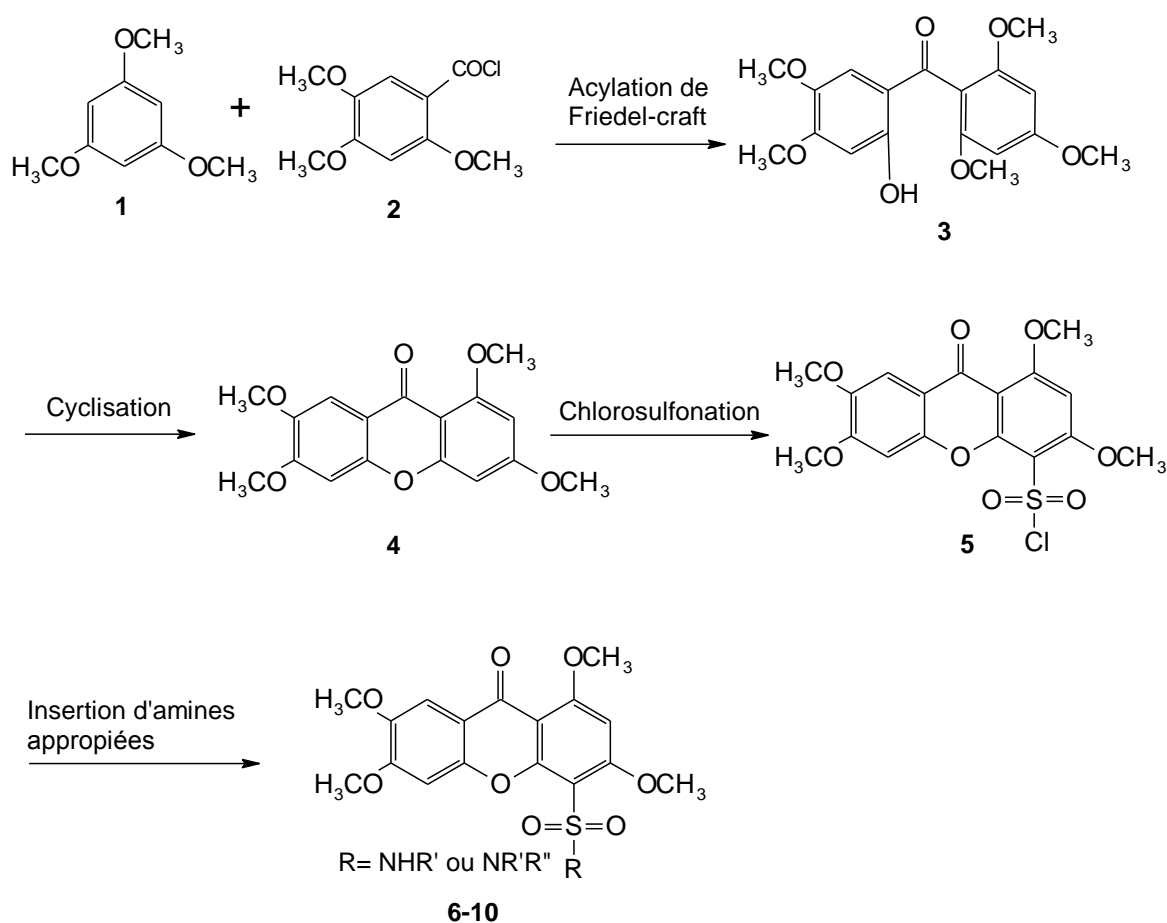


Schéma II. 1. Schéma de synthèse des dérivés de xanthes sulfamides

Dans un premier temps, nous synthétiserons le xanthone précurseur 1,3,6,7-tétraméthoxyxanthone (4) en deux étapes (schéma 2). Dans la première étape, une acylation classique de Friedel-Crafts de la 1,3,5-triméthoxybenzène (1) est mise en jeu en présence de chlorure de 2,4,5-triméthoxybenzoyl pour former la benzophénone avec un hydroxyle libre (3) avec un rendement de 68%². Puis, une réaction de cyclisation est effectuée par le

traitement de benzophénone (3) avec une solution 25% d'hydroxyle de tétrabutyl ammonium dans de la pyridine et de l'eau, menant ainsi au xanthone souhaité (4) avec un bon rendement (90%)³.

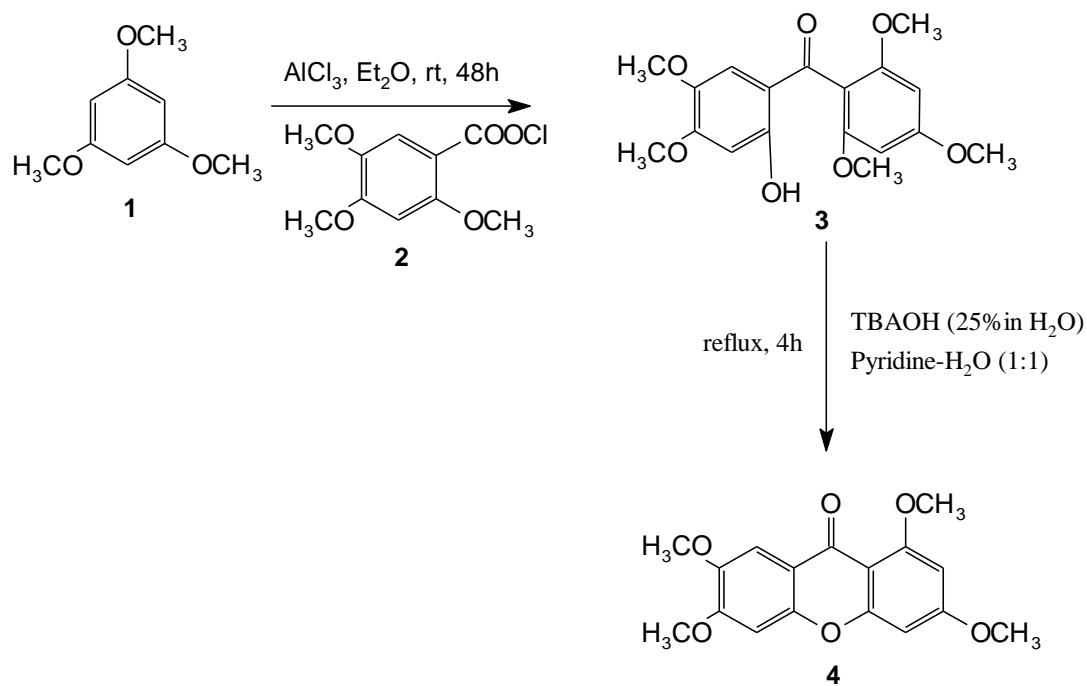


Schéma II. 2. Voie de synthèse du précurseur 1,3,6,7-tetraméthoxyxanthone (4)

Une fois le précurseur (4) obtenu, sa chlorosulfonation est mise en œuvre en présence d'acide chlorosulfonique à 0°C pour donner le composé (5) avec un rendement de 81%. Le traitement de cet intermédiaire clé avec l'amine appropriée dans le 1,4-dioxane permet l'accès aux xanthonés sulfamide (6-10)⁴.

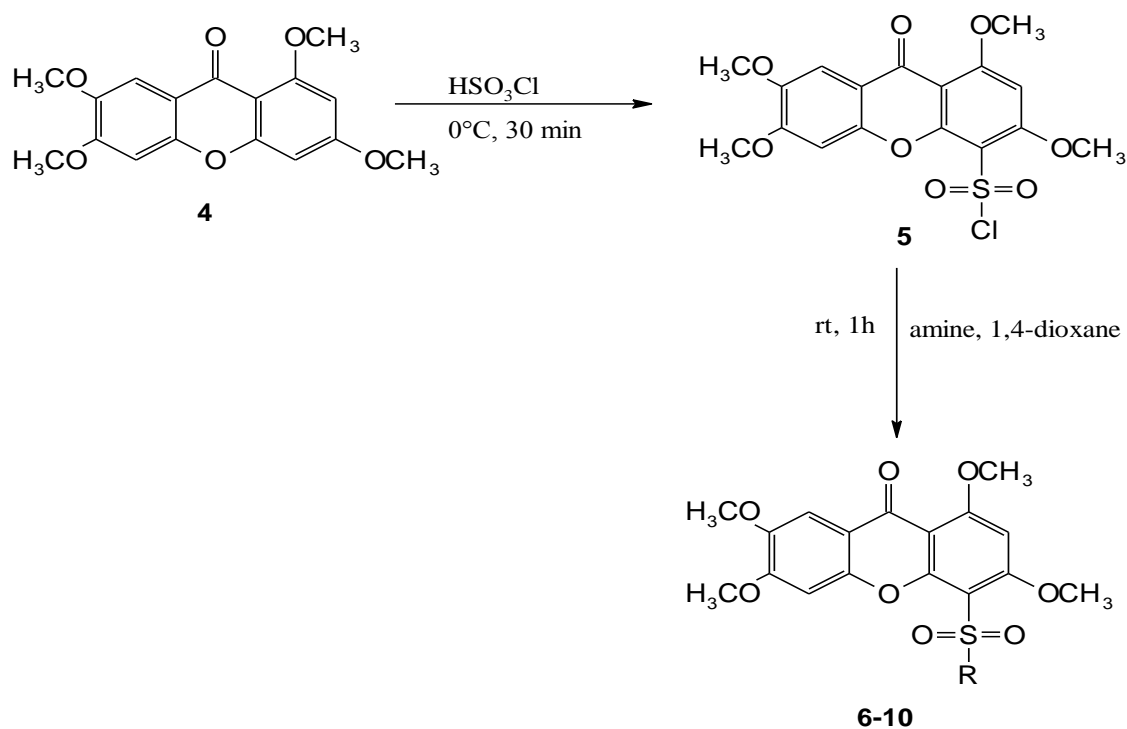


Schéma II. 3. Voie d'accès aux dérivés de xanthone sulfamide à partir du précurseur (4)

Tableau II. 1. structure des tetramethoxy-xanthones sulfamides synthétisés

composé	Encodé dans la chimiothèque	R	Rdt (%)
6	X109		59.7%
7	X107		62%
8	X102		53%
9	X117		46%
10	X108		54.7%

2. Evaluation de l'activité inhibitrice :

En raison de la non-disponibilité de l'enzyme choisie comme cible MGAM, nous avons orienté notre évaluation biologique vers un test in-vitro sur l' α -glucosidase (EC 3.2.1.20) à partir de levure *Saccharomyces cerevisiae*⁵. Le *p*-nitrophényl glucopyranoside (*p*NP-glucose) a été utilisé comme substrat qui s'hydrolyse en présence de l' α -glucosidase pour produire le glucose et le *p*-nitrophénol. En milieu basique, la formation du *p*-nitrophénolate manifeste une coloration jaune mesurée par absorbance à $\lambda=405$ nm avec Spectrophotomètre UV-visible. Le taux de libération de *p*-nitrophénolate permet, ainsi de mesurer l'activité inhibitrice. Plus la quantité de *p*-nitrophénolate sera élevée, moins l'inhibiteur sera actif. L'acarbose a été utilisé comme un inhibiteur de référence.

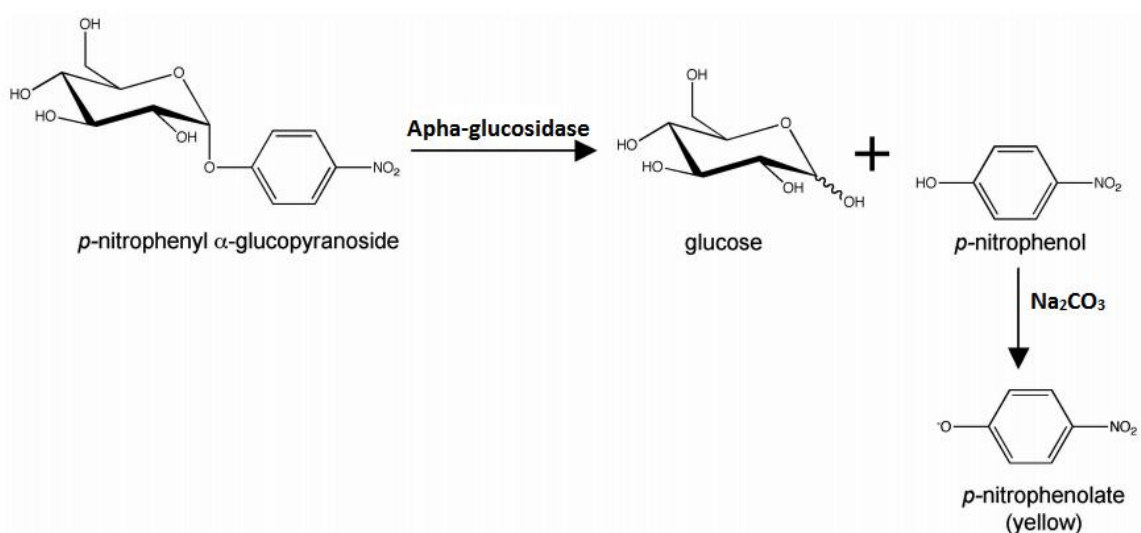


Schéma II. 4: Réaction enzymatique en présence du *p*-nitrophényl glucopyranoside comme substrat.

Chaque test est effectué trois fois (triplicatas) en diluant les composés à différentes concentrations dans du DMSO. Les pourcentages d'inhibition sont calculés selon l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Avec:

- A_{control} : absorbance en absence de l'inhibiteur (appelée test control)

Chapitre II. Synthèse des dérivés de xanthone et étude de leurs effet inhibiteur

- A_{test} : absorbance en présence de l'inhibiteur en interaction avec l'enzyme en prenant en considération l'absorbance de l'inhibiteur seul (A_{blanc}) pour éviter toute interférence.

Puis, l' IC_{50} (concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de la protéine) de chaque produit s'obtient en corrélant le pourcentage d'inhibition et les différentes concentrations du produit nécessaires pour obtenir cette inhibition. Une régression non-linéaire obtenue après traitement statistique donne accès à cette valeur caractéristique de chaque composé (tableau 2).

Tableau II. 2. Evaluation de l'activité inhibitrice des xanthonés sulfamide (6-10)

composé	Encodé dans la chimiothèque	IC_{50} (μM)
6	X109	NA
7	X107	NA
8	X102	NA
9	X117	NA
10	X108	NA
Acarbose	/	675

NA : Non actif, Acarbose: inhibiteur de référence

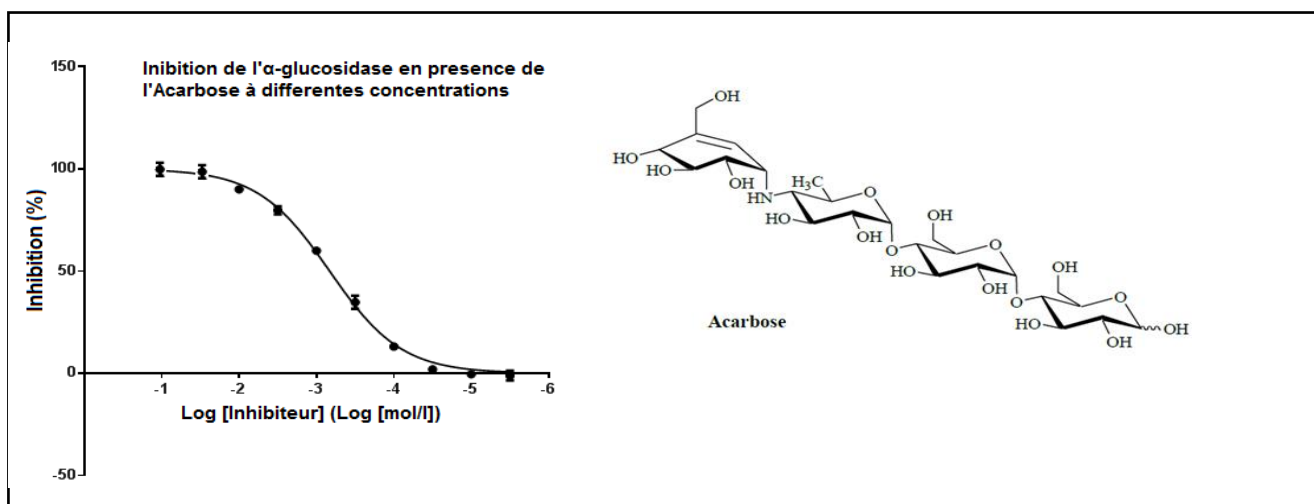


Figure II. 1. Détermination graphique de l' IC_{50} de l'Acarbose.

L'acarbose est considéré comme inhibiteur de référence pour confirmer la mise au point du protocole du test in-vitro et sa valeur d'IC₅₀ est considérée comme une référence pour le reste de ce travail.

Cette évaluation montre l'absence d'une activité inhibitrice vis-à-vis de l' α -glucosidase pour l'ensemble des dérivés tetramethoxyxanthone sulfonamides synthétisés.

Il est nécessaire de rappeler que, du point de vue énergétique, lors du docking; l'affinité de ces composés synthétisés tetra-methoxylés est principalement due à de fortes interactions de type VDW (variant entre -53.03 et -42.95 Kcal/mol) et à d'autres, beaucoup moins fortes de types ponts hydrogène (variant entre -7.89 et -4.98 Kcal/mol) et largement inférieures à celles de la référence (-17.68 Kcal/mol). Par contre, pour les xanthonnes sulfonamide tetrahydroxylés les liaisons hydrogène détectées ont été très importantes grâce à la présence de quatre groupements hydroxyle et le groupement sulfonamide.

Cette révision des résultats du docking suggère que l'absence d'une activité inhibitrice des tetramethoxy-xanthonnes sulfonamides synthétisés vis-à-vis de l' α -glucosidase peut être expliquée par la formation de faibles liaisons hydrogène dans les complexes ligand-enzyme et par l'utilisation de deux cibles différentes (la MGAM Humaine pour le docking et l' α -glucosidase du *Saccharomyces cerevisiae* pour le test in -vitro). Ce qui nous a orienté vers l'évaluation des composés possédant des groupement hydroxyle afin de pouvoir apporter une explication.

3. Déméthylation des composés synthétisés:

Avant d'effectuer une deméthylation des xanthonnes sulfamide, nous avons synthétisé l'analogue tétra-hydroxylé du précurseur (4) suivie d'une évaluation de son potentiel inhibiteur. Cette réaction a été mis en œuvre en présence de BBr₃ dans le dichlorométhane pour donner 1,3,6,7-tetrahydroxy xanthone (4') (schéma 4) avec un rendement de 73.3%⁶.

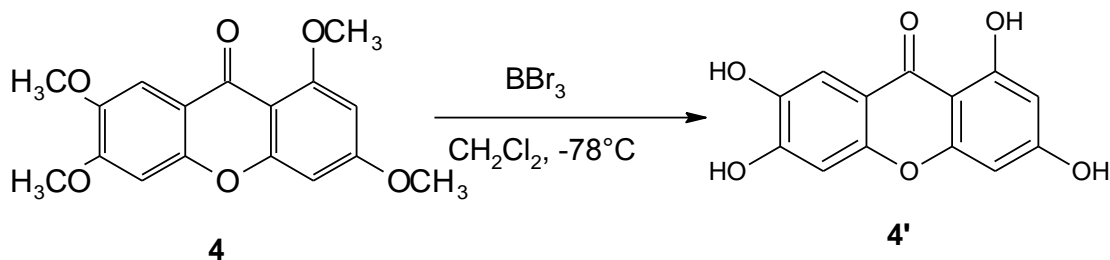


Schéma II. 5. Voie de synthèse de 1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (4')

Chapitre II. Synthèse des dérivés de xanthone et étude de leurs effet inhibiteur

Une fois le composé (4') obtenu, une évaluation de son potentiel d'inhibition vis-à-vis de l' α -glucosidase est effectuée avec le même protocole décrit précédemment. Ce composé a montré une activité inhibitrice intéressante avec un IC_{50} de 11.69 μ M.

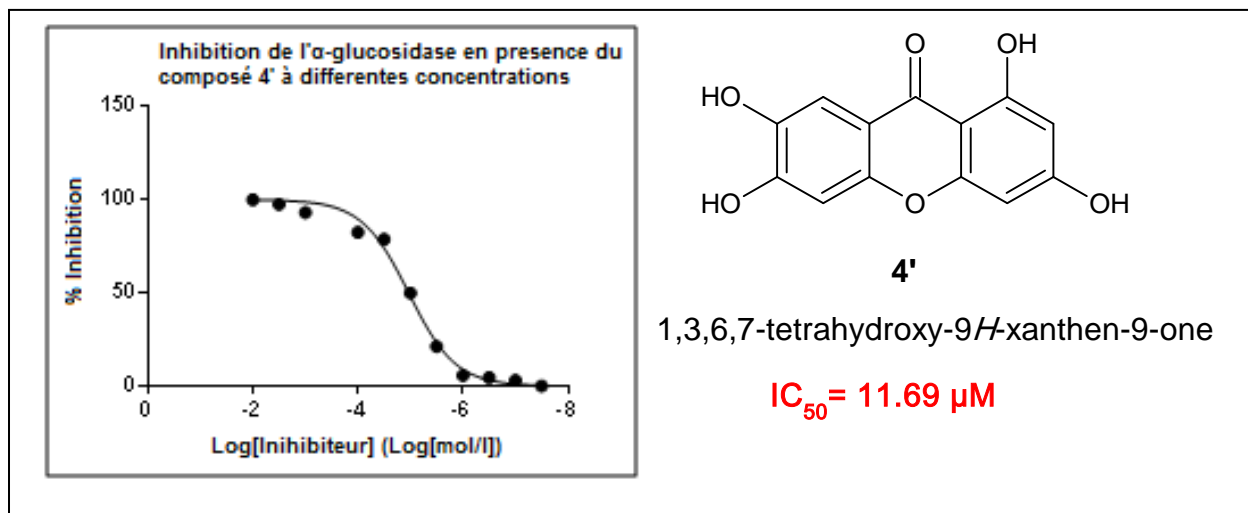


Figure II. 2. Détermination graphique de l' IC_{50} du composé (4').

Les cinq analogues hydroxylés des xanthones sulfamide ont été synthétisés en suivant le même protocole (schéma 5) avec des rendements variables.

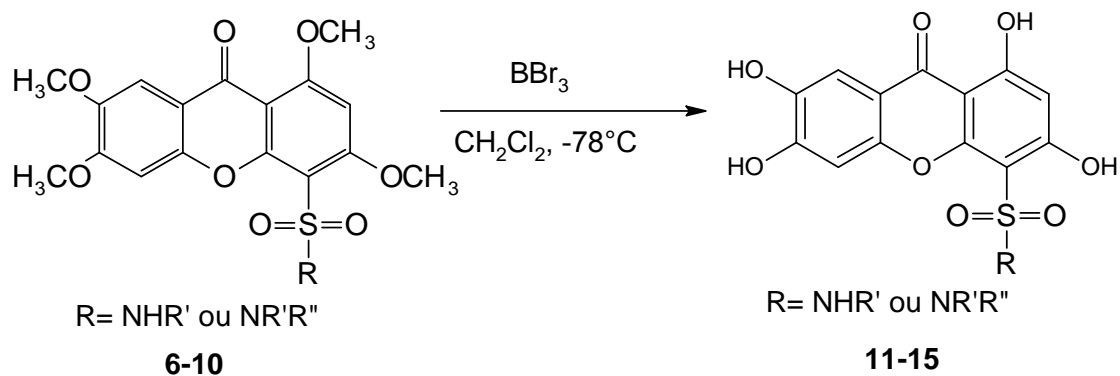
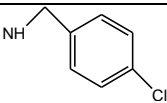
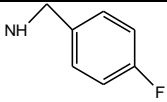
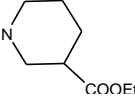
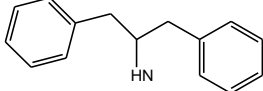
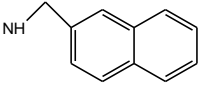


Schéma II. 6. Voie de synthèse des composés (11-15)

Tableau II. 3. structure des tetrahydroxy-xanthones sulfamides synthétisés

composé	R	Rdt (%)
11		45%
12		44%
13		38%
14		43%
15		51%

4. Evaluation biologique des dérivés tetra-hydroxyxanthone sulfonamides :

L'activité de ces composés tétra-hydroxylés (11 à 15) a été testée in vitro sur la cible α -glucosidase.

Tableau II. 4. Evaluation de l'activité inhibitrice des xanthones sulfamide (11-15)

composé	IC ₅₀ (μ M)
11	30.78
12	30.75
13	47.85
14	47.25
15	133.6
Acarbose	675

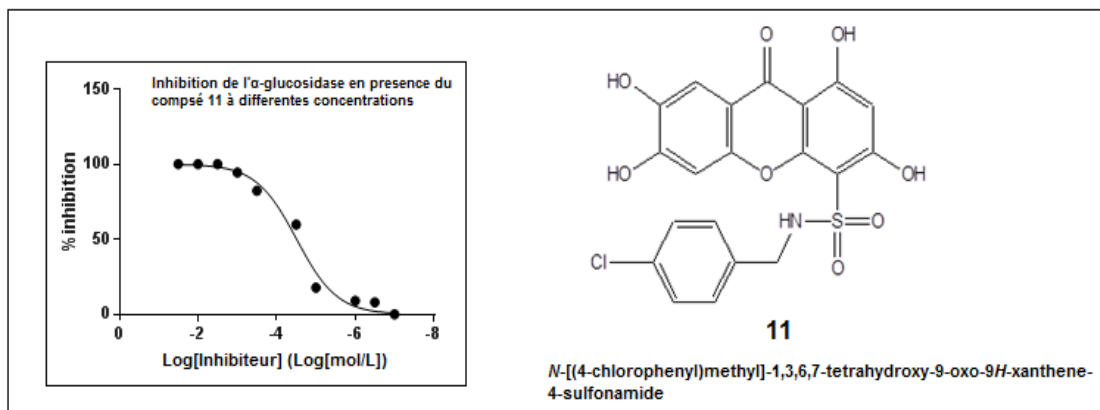


Figure II. 3. Détermination graphique de l'IC₅₀ du composé (11).

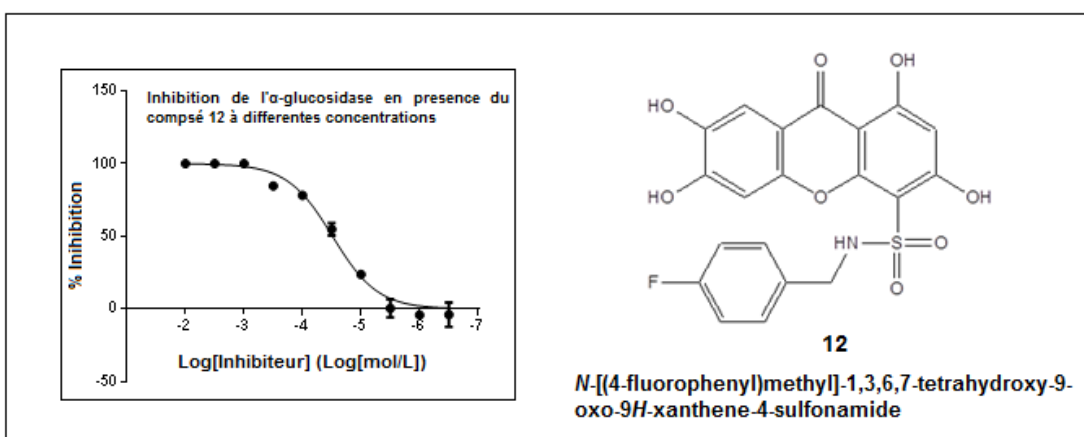


Figure II. 4. Détermination graphique de l'IC₅₀ du composé (12).

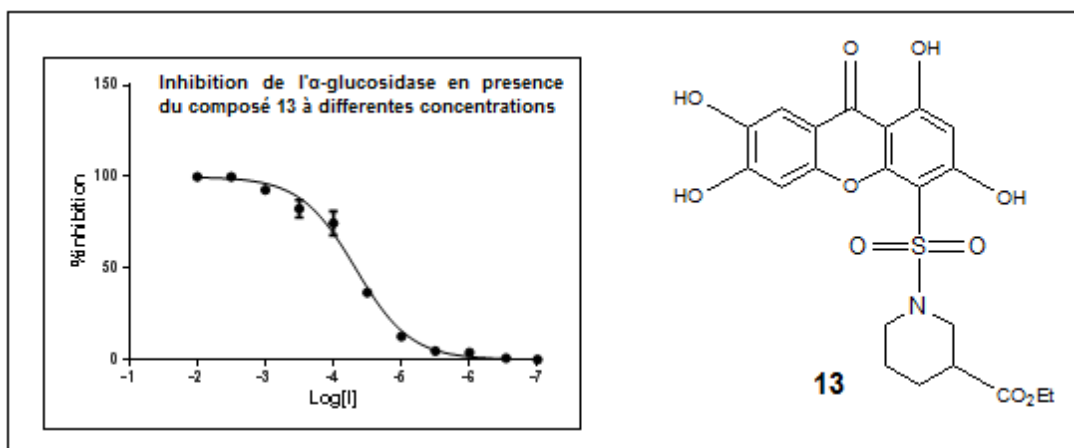


Figure II. 5. Détermination graphique de l'IC₅₀ du composé (13).

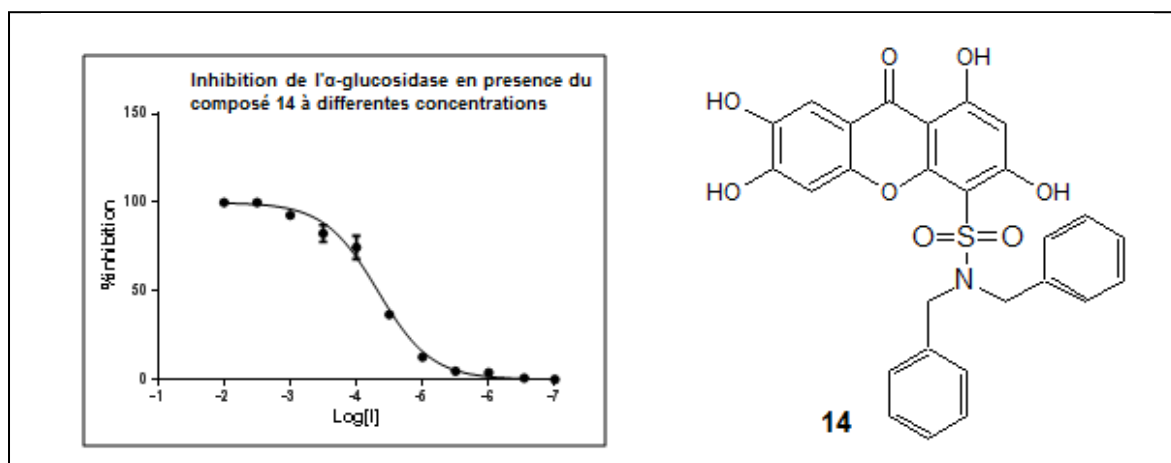


Figure II. 6. Détermination graphique de l'IC₅₀ du composé (14).

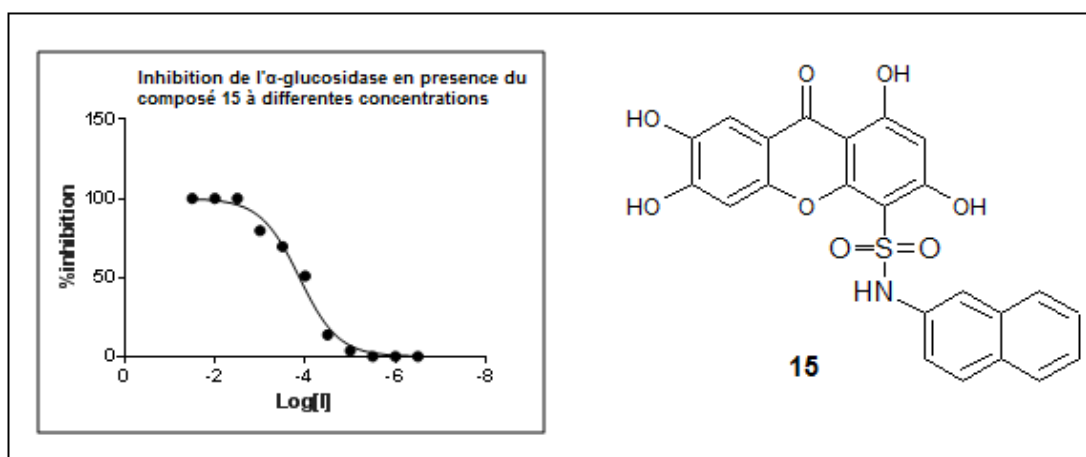


Figure II. 7. Détermination graphique de l'IC₅₀ du composé (15) .

Ces résultats montrent que la substitution des groupes methoxy par des groupes hydroxy dans les xanthones sulfonamide, confère à ces derniers une forte activité inhibitrice.

5. Cinétique enzymatique :

Dans le but de déterminer le type d'inhibition des dérivés de xanthone sulfonamides vis-à-vis de l'α-glucosidase, nous avons réalisé une étude cinétique enzymatique de type Michaelis menten et tracé un graphe selon Lineweaver-Burke (double inverse) pour le composé (11). Comme décrit précédemment⁷, deux concentrations de l'inhibiteur (11) autour de la valeur IC₅₀ (25μM et 40μM) ont été choisies. Pour chaque concentration, l'activité de l'α-glucosidase a été testée en variant les concentrations du substrat [S] pNP-glycoside. Cette réaction enzymatique a été réalisée sous les mêmes conditions de protocole du test en

effectuant une lecture toute les 60s par spectrophotométrie à 400 nm. Les variations de la vitesse on été déterminées par régression non-linéaire de type Michaelis-Menten (Figure 8)

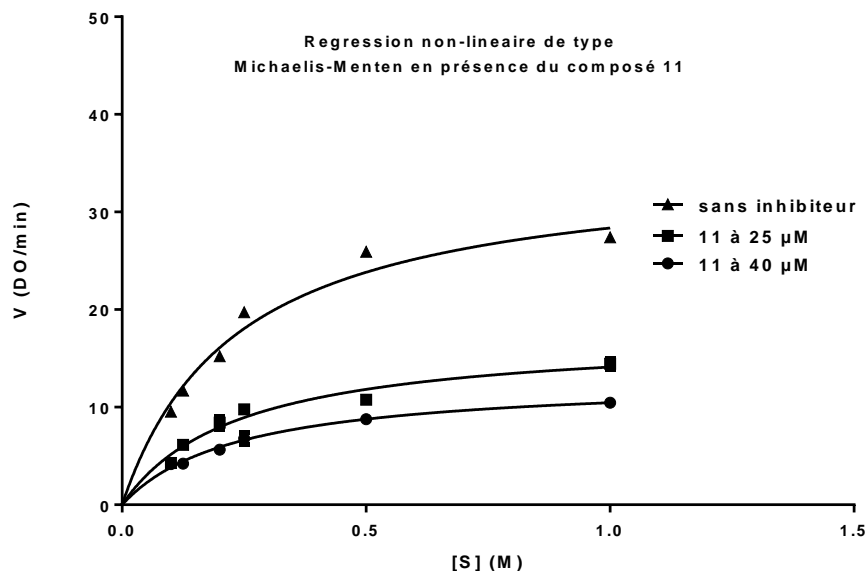


Figure II. 8. Détermination graphique de la variation de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration du substrat, sans et en présence du composé 11.

On observe dans ce graphe représentant la vitesse initiale en fonction de la concentration de substrat que la vitesse maximum change en fonction de la concentration de l'inhibiteur.

La valeur de la constante de Michaelis K_m , sans et en presence de l'inhibiteur, n'est pas modifiée (tableau 5). Cela peut signifier que l'affinité de l'enzyme libre (E) et celle du complexe (EI) pour le substrat (S) ne sont pas modifiées.

Tableau II. 5. variation de V_{max} et K_m en fonction de la presence de l'inhibiteur 11

[I] (μM)	0	25	40
V_{max} (Do/min)	35.04	17.49	12.96
K_m (M)	0.236	0.237	0.235

Nous avons également déterminé ces paramètres cinétiques en traçant la courbe double inverse selon Lineweaver-Burk $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[S]}\right)$ (figure 9).

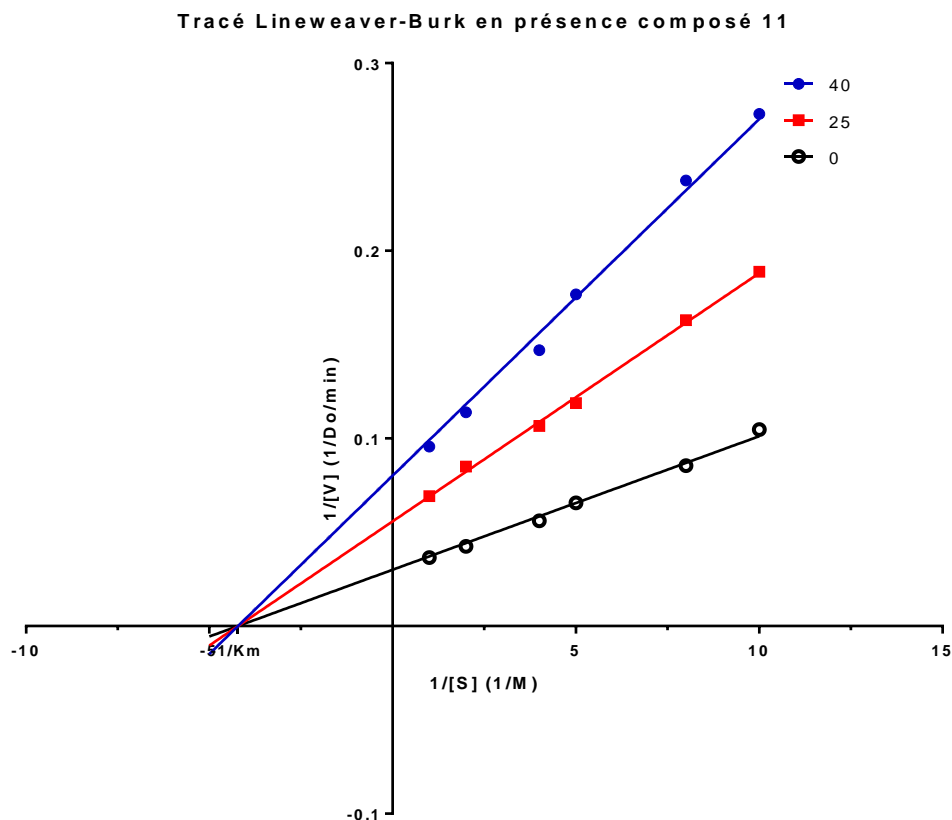


Figure II. 9. tracé double inverse de Lineweaver-Burk en présence de différentes concentrations du composé 11.

Les droites obtenues en présence de différentes concentrations de notre inhibiteur (11) se rencontrent en un seul point de l'axe des abscisses, ce point est l'inverse de la valeur de K_m ($-\frac{1}{K_M} = -4.22$). Ces droites coupent l'axe des ordonnées en différents points représentant l'inverse des vitesses maximale apparentes ($\frac{1}{V_{max}}$) qui augmente avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur pour.

Ces résultats suggèrent l'inhibition non compétitive du composé 11 avec une constante d'inhibition K_i de 25.92 μM .

6. Etude de mode d'interaction des dérivés synthétisés :

6.1. Génération de la structure 3D de l'enzyme cible par homologie :

Vu le manque d'informations structurales sur l' α -glucosidase (à partir de *Saccharomyces cerevisiae*) utilisée pour nos tests d'inhibition et étude cinétique, et la non disponibilité de sa structure 3D dans les bases de données telle que PDB (Protein Data Bank),

Chapitre II. Synthèse des dérivés de xanthone et étude de leurs effet inhibiteur

nous avons décidé d'utiliser la modélisation par homologie qui s'avère utile et qui a été utilisée avec succès pour plusieurs travaux sur notre enzyme cible⁸⁻¹⁰.

C'est une technique comparative qui part de l'hypothèse que des protéines qui ont des séquences homologues ont des structures proches¹¹. Cette approche débute par la génération d'une séquence d'acide aminés de l' α -glucosidase de levure à partir de la base des données «the UniProt protein knowledge base» (www.uniprot.org) sous l'identifiant **P53341** comprenant 584 résidus.

Cette séquence, utilisant le serveur de modélisation SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>)^{12, 13}, est nécessaire pour identifier la structure de protéine dite «patron» (Template) à partir de la banque des protéines PDB par l'outil de «Blast» et «HHblits»^{14, 15}. A la fin de cette étape plusieurs structures cristallographiques seront fournies avec des pourcentages d'identité et de similarité en ordre décroissant(**tableau 6**).

Tableau II. 6:Liste des meilleurs Templates PDB générés par Swiss-model.

Template	Seq Identity	Oligo-state	Found by	Method	Resolution	Seq Similarity	Coverage	Description
3aj7.1.A	72.68	monomer	BLAST	X-ray	1.30Å	0.54	1.00	Oligo-1,6-glucosidase
3axh.1.A	72.51	monomer	BLAST	X-ray	1.80Å	0.54	1.00	Oligo-1,6-glucosidase IMA1
3aj7.1.A	72.21	monomer	HHblits	X-ray	1.30Å	0.54	1.00	Oligo-1,6-glucosidase
3axh.1.A	72.21	monomer	HHblits	X-ray	1.80Å	0.54	1.00	Oligo-1,6-glucosidase IMA1
4maz.1.A	45.76	monomer	BLAST	X-ray	1.60Å	0.44	0.93	Oligo-1,6-glucosidase 1
4m8u.1.A	45.76	monomer	BLAST	X-ray	1.45Å	0.44	0.93	Oligo-1,6-glucosidase 1
4m56.1.A	45.76	monomer	BLAST	X-ray	2.30Å	0.44	0.93	Oligo-1,6-glucosidase 1
4mb1.1.A	45.57	monomer	BLAST	X-ray	1.40Å	0.44	0.93	Oligo-1,6-glucosidase 1
4m56.1.A	42.91	monomer	HHblits	X-ray	2.30Å	0.43	0.94	Oligo-1,6-glucosidase 1
4maz.1.A	43.07	monomer	HHblits	X-ray	1.60Å	0.43	0.94	Oligo-1,6-glucosidase 1
4m8u.1.A	42.88	monomer	HHblits	X-ray	1.45Å	0.43	0.94	Oligo-1,6-glucosidase 1
4mb1.1.A	42.88	monomer	HHblits	X-ray	1.40Å	0.43	0.94	Oligo-1,6-glucosidase 1
1uok.1.A	41.02	monomer	BLAST	X-ray	2.00Å	0.42	0.94	OLIGO-1,6-GLUCOSIDASE

Chapitre II. Synthèse des dérivés de xanthone et étude de leurs effet inhibiteur

Les résultats ont montré que l'oligo-1,6-glucosidase (PDB ID: 3AJ7) révèle la meilleure identité avec un pourcentage de 72.68% (largement supérieur au seuil de 35%¹¹) et une similarité de 54%. L'alignement des deux séquences (figure 10) et la comparaison visuelle des structures 3D (figure 11) montrent une haute homologie ce qui suggère l'obtention d'une structure 3D du modèle d' α -glucosidase de haute qualité avec la conservation du site actif pour lequel les résidus sont déterminés à partir de ceux du Template Asp69, His112, Arg213, Asp215, Arg442, His351 et les résidus catalytiques Asp352 et Glu277¹⁶, qui correspondent respectivement dans le modèle aux Asp68, His111, Arg212, Asp214, Arg 439, His348, Asp349 et Glu276.

```
Target      MTISD-HPETEPKWWKEATFYQIYPASFKDSNNDGWGDLKGITSKLQYIKDLGVDAIWVCPFYDSPQCIMGYDISNYEKV 79
3aj7.1.A    MTISSAHPETEPKWWKEATFYQIYPASFKDSNDDGWGDMKGIASKLEYIKELGADAIWISPFYDSPQCIMGYDIANYEKV 80

Target      WPTYGTNEDCFELIDKTHKLGMKFITDLVINHCSTEHEWFKESRS SKTNPKRDWFFWRPPKGYDAEGKPIPPNNWKSFFG 159
3aj7.1.A    WPTYGTNEDCFALIEKTHKLGMKFITDLVINHCSEHEWFKESRS SKTNPKRDWFFWRPPKGYDAEGKPIPPNNWKS YFG 160

Target      GSAWTFDETTNEFYLRFLFASRQVDLNWENEDCRRAIFESAVGFWLDHGVDGFRIDTAGLYSKRPGLPDSPIFDKTSKLQH 239
3aj7.1.A    GSAWTFDEKTQEFYLRFLFCSTQPDLNWENEDCRRAIYESAVGYWLDHGVDGFRIDVGSLSYKRVVGLPDAPVVDKNS TWQS 240

Target      PNWGS HNGPRIHEYHQELHRFMKNRVKDGREIMTVGSEVAHGS DNA--LYTSAARYEVSEVFSFTHVEVGTSPFFRYNIVP 317
3aj7.1.A    SDPYTLNGPRIHEFHQEMNQFIRNRVKDGREIMTVGSEMQHASDETKrLYTSAARHELSELFNFSHTDVGTSPLFRYNLVP 320

Target      FTLKQWKEAIASNFLFINGTDSWATTYIENHDQARSITRFADDSPKYRKISGKLLTLLECSLTGTLYVYQGQEIIGQINFK 397
3aj7.1.A    FELKDWKIALAELFRYINGTDCWSTIYLENHDQPRSITRFGDSPKNRVISGKLLSVLLSALTGTLYVYQGQELGQINFK 400

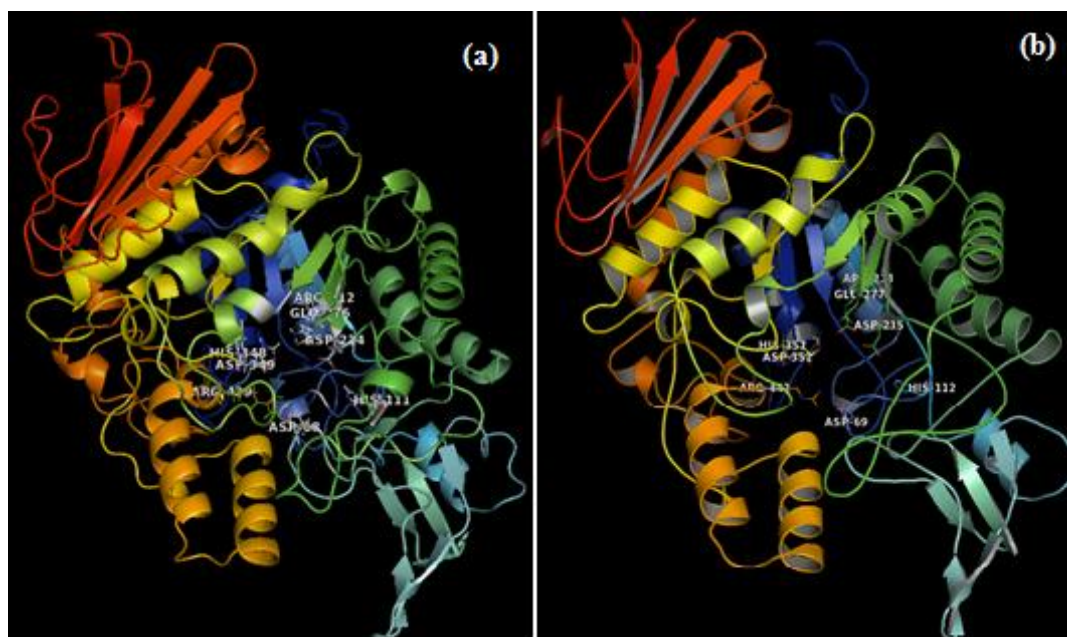
Target      EWPIEKYEDVDVKNNYELIKKSF GKNSKEMKDFFKGIALLSHDHRTMPMPWTKDKPNAGFTGPDVKPFLLNESFEQGIN 477
3aj7.1.A    NWPVEKYEDVEIRNNYNAIKKEEHGENSEEMKFLAIALISHDHARTPMQWSREEPNAGFSGPSAKPWFYLNDSFREGIN 480

Target      VEQESRDDDSVLNFWKRALQARKKYKELMIYGYDFQFIDLSDSQIFSFSTKEYEDKTLFAALNFSGEEIEFSLPREGASLS 557
3aj7.1.A    VEDEIKDPNSVLNFWKEALKFRKAHKDITVYGYDFEFIDLDNKKLFSFTKKNKTLFAALNFS SDATDFKIPNDDSSFK 560

Target      FILGNY--DDTDVSSRVLKPWEGRIYL 582
3aj7.1.A    LEFGNYpkKEVDASSRTLKPWEGRIYI 587
```

Figure II. 10. Alignement des séquences de l' α -glucosidase cible et le Template (3AJ7). (les résidus identiques sont représentés en rouge, non-identiques en bleu et ceux du site actif sont surlignés).

Le serveur automatisé SWISS-MODEL utilise la structure cristallographique (PDB ID : 3AJ7) choisie comme «template», pour créer une structure 3D pour notre cible en effectuant un alignement des deux structures (figure 11).



1Figure II. 11. Comparaison entre la structure du modèle de l' α -glucosidase créé par homologie (a) et la structure du Template 3AJ7 (b) avec la conservation des résidus catalytiques.

5.2. Docking Moléculaire :

Les simulations de docking ont été réalisées avec le programme Molegro Virtual Docker (MVD). La structure homologue de l' α -glucosidase est importée dans son «work space» et préparée avec l'outil de préparation automatique et les cavités sont détectées avec l'algorithme de détection des cavités du MVD.

Avant d'étudier le mode d'interaction du composé 11 avec l'enzyme cible en tant qu'inhibiteur non-compétitif, il nous sera d'abord nécessaire de déterminer les sites d'interaction les plus plausibles. Pour ce fait, nous avons défini un espace de recherche (une sphère de rayon de 40Å) qui couvre tout l'espace 3D du récepteur, y compris le site actif et les sites allostériques (figure 12).

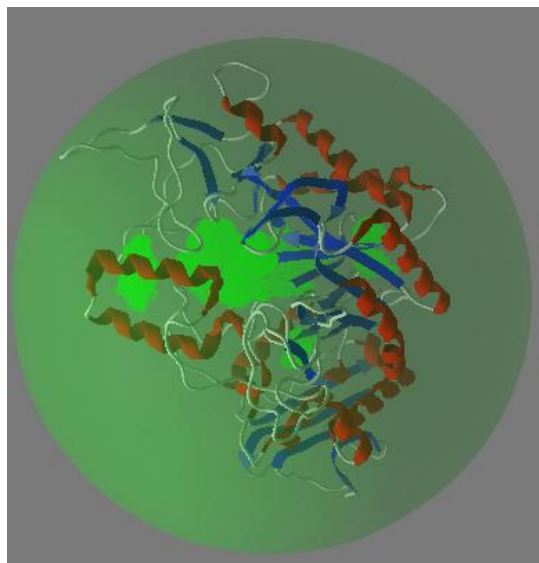


Figure II. 12. Illustration de l'espace de recherche qui couvre toute la structure 3D de la cible

Dans cet espace de recherche, un processus de docking est lancé pour le composé 11 et la référence Acarbose; en utilisant l'algorithme de recherche Moldock Optimizer, la fonction de score Moldock Score [Grid], 100 tours (runs) de docking et une population de 150 individus. à la fin du processus un clustering est effectué utilisant un rmsd de 2.0Å pour garder les 100 meilleures solutions avec les différentes conformations possibles.

Les résultats du docking montrent l'orientation de la totalité des poses obtenues vers un même site proche du site actif (figure 13).

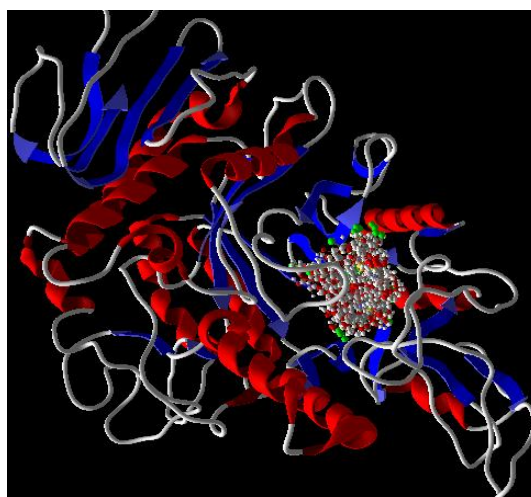


Figure II. 13. Distribution et orientation des poses du composé 11 obtenues dans la structure 3D de l'enzyme cible.

La pose top-scoring du composé 11 est sélectionnée selon la meilleure énergie d'interaction avec la cible. On a observé que le site d'interaction pour le composé 11 est proche de la poche du site actif (Fig. 14).

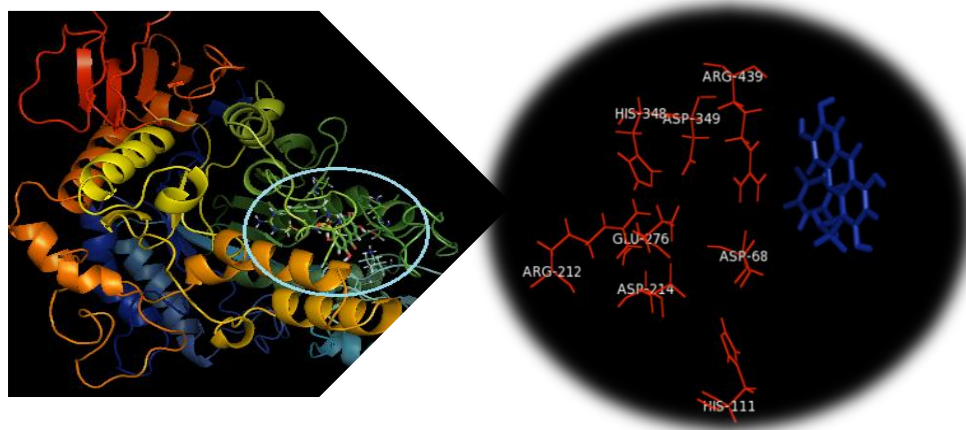


Figure II. 14. Orientation du composé 11 (en bleu) vers un site d'interaction proche du site actif (en rouge).

le composé 11 forme quatre liaisons hydrogène dont trois établies par les groupement hydroxyles et les résidus du site d'interaction (Figure 15)

- ✓ composé11-OH avec Lys155-carbonyle (O-O: d = 2.4 Å)
- ✓ composé11-OH avec Ser308--carbonyle (O-O: d = 1.8 Å)
- ✓ composé11-OH avec Thr207-OH (O-O: d = 2.6 Å)
- ✓ composé11-O (du carbonyle) avec Arg312-NH (O-N: d = 1.7 Å)

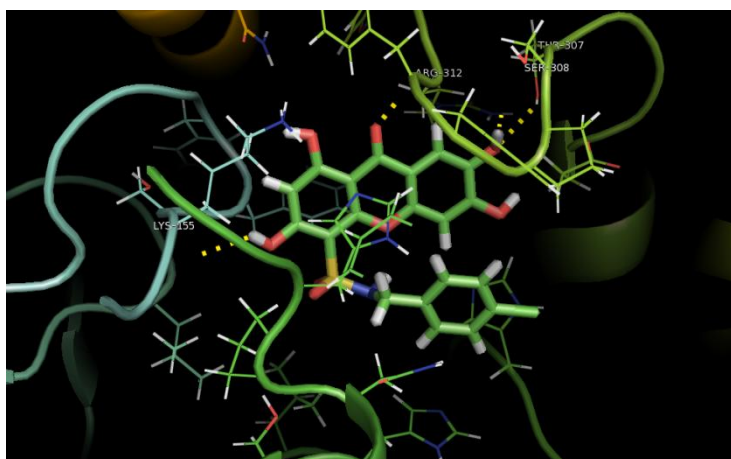


Figure II. 15. liaisons hydrogène entre le composé 11 et les résidus du site d'interaction.

Pour confirmer cette approche de docking adaptée pour notre inhibiteur non compétitif, nous avons décidé d'appliquer ce protocole sur le ligand de référence (inhibiteur

Chapitre II. Synthèse des dérivés de xanthone et étude de leurs effet inhibiteur

compétitif) qui, lui, doit s'orienter vers le site actif. Pour cela, une simulation de docking pour l'acarbose identique à celle effectuée pour docker le composé 11 est nécessaire.

Les résultats de ce docking ont montré l'orientation des poses générées de l'acarbose vers le site actif (Figure 16).

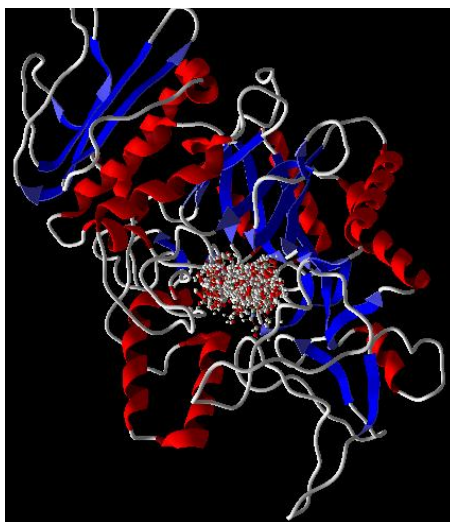


Figure II. 16. Distribution et orientation des poses de l'acarbose obtenues dans la structure 3D de l'enzyme cible.

L'analyse visuelle de la meilleure pose de l'acarbose montre que ce dernier est entouré par les résidus du site actif définis précédemment, confirmant ainsi son orientation vers ce site qui est proche de celui du composé 11, ce qui valide la capacité de notre protocole à prédire un site d'interaction (figure 17)

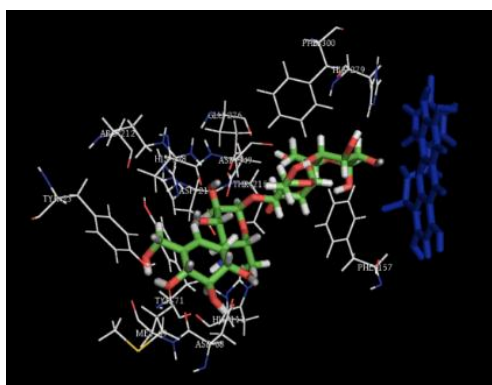


Figure II. 17. Orientation de l'acarbose dans le site actif proche du site d'interaction déterminé pour le composé 11 avec le site actif.

L'application de ce protocole sur les autres xanthones sulfonamide synthétisés (composé 12-15), prédit l'orientation de ces composé vers le même site d'interaction que celui du composé 11 avec des modes d'interaction très similaires notamment la formation des

liaisons hydrogène entre les groupement hydroxyles, le groupement sulfonamide et les résidus du site d'interaction (figure 18).

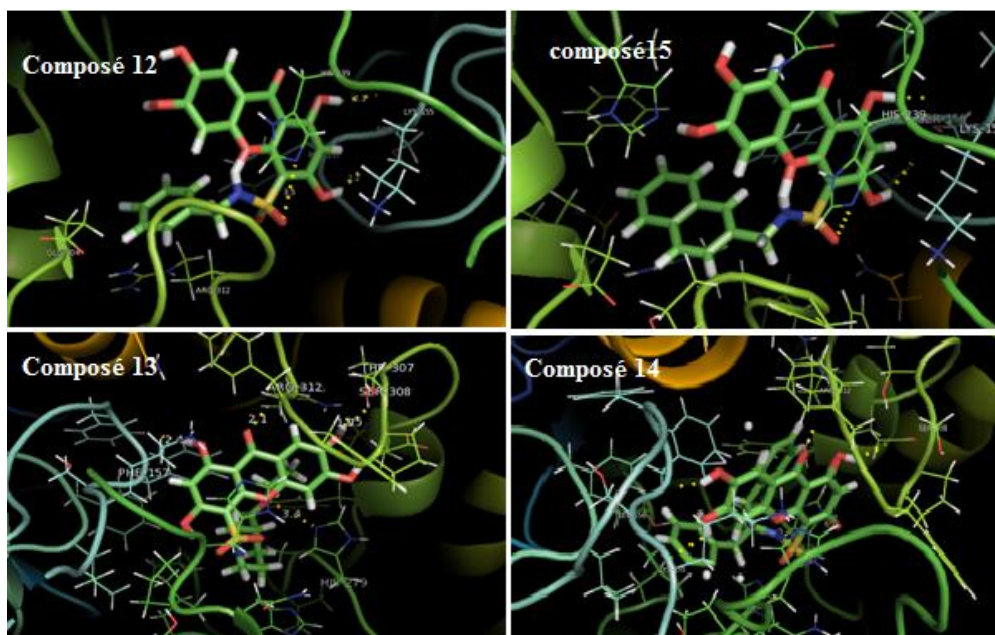


Figure II. 18. Mode d'interaction des composés 12-15 sans le site d'interaction déterminé.

6. Conclusion :

Dans cette partie, nous avons mis en œuvre la synthèse de quelques dérivés de xanthone sulfonamide issus de l'étude docking afin de pouvoir évaluer leur inhibition vis-à-vis de l' α -glucosidase avec un test in vitro.

La synthèse et l'évaluation biologique de cinq dérivés tetramethoxyxanthone sulfonamide a montré que ces derniers ne présentent aucun effet inhibiteur sur l' α -glucosidase, ce qui a été expliqué par la formation de faibles liaisons hydrogène dans les complexes ligand-enzyme et par l'utilisation de deux cibles différentes ; la maltase glucoamylase de souche humaine pour le docking et l' α -glucosidase de souche *Saccharomyces cerevisiae* pour l'évaluation biologique.

Ces résultats nous ont orienté vers le remplacement des groupements methoxy des xanthone sulfonamide par des groupements hydroxyles afin d'améliorer l'inhibition. Les cinq composés tetrahydroxy xanthone sulfonamide obtenus ont montré une bonne inhibition vis-à-vis de l'enzyme cible a été prouvée. Une étude cinétique enzymatique nous a, ensuite permis de déterminer que cette inhibition était de type non-compétitif.

Chapitre II. Synthèse des dérivés de xanthone et étude de leurs effet inhibiteur

Enfin, une étude docking a été menée dans le but de déterminer le mode d'interaction des composés inhibiteurs. Vu le manque d'informations structurales sur l' α -glucosidase (à partir de *Saccharomyces cerevisiae*) utilisée pour nos tests d'inhibition et étude cinétique, et la non disponibilité de sa structure 3D dans les bases de données telle que la PDB (Protein Data Bank), nous avons généré cette structure par homologie utilisant le serveur SWISS-MODEL. Le modele obtenu a été avec une identité de 72.68% et une similarité de 54% avec l'enzyme Template.

Les résultats du docking ont montré l'orientation des xanthones sulfonamides tertarhydroxylés vers un site d'interaction proche du site actif ce qui confirme le caractère non-complétif issu des résultats de la cinétique enzymatique. L'analyse des interactions en jeu, a montré que cette affinité est principalement due aux liaisons hydrogène favorisées par la présence de plusieurs groupements hydroxyles et le groupement sulfonamide.

Références Bibliographiques

1. H.Hu, H. Liao, J. Zhang, W. Wu, J. Yan, Y. Yan, Q. Zhao, Y. Zou, X. Chai, S. Yu and Q. Wu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010, **20**, 3094-3097.
2. A. J. Quillinan and F. Scheinmann, *J. Chem. Soc., Perkin Trans*, 1973, **1**, 1329.
3. C. N. Lin, S. S. Liou, F. N. Ko and C. M. Teng, *J. Pharm. Sci*, 1992, **81**, 1109.
4. M. H. A. Elgamal, M. M. M. Shalaby, H. Duddeck and D. Rosenbaum, *J. Heterocycl.Chem*, 1987, **24**, 721.
5. Y. Liu, L. Zou, L. Ma, W. H. Chen, B. Wang and Z. L. Xu, *Bioorg. Med. Chem*, 2006, **14**, 5683 –5690.
6. S. Punna, S. Meunier and M. G. Finn, *Org. Lett*, 2004, **6**, 2777.
7. L. M. Y.F. Wang, C. Pang, M.J. Huang, Z.S. Huang L.Q. Gu, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 2004, **14**, 2947-2950.
8. H. Park, K. Y. Hwang, Y. H. Kim, J. Y. Lee and K. Kim, *Bioorg. Med.Chem*, 2008, **16**, 284 –292.
9. H. Park, K. Y. Hwang, Y. H. Kim, K. H. Oh, J. Y. Lee and K. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 2008, **18**, 3711 –3715.
10. S. B. .Ferreira, A. C. R. Sodero, M. F. C. Cardoso, E. S. Lima, C. R. Kaiser, F. P. Silva and V. F. Ferreira, *J. Med. Chem*, 2010, **53**, 2364 – 2375.
11. A. M. L. C. Chothia, *EMBO. J*, 1986, **5**, 823-826.
12. K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp and T. Schwede, 2006, **22**, 195-201.
13. G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T. G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli and T. Schwede, *Nucleic Acids Research* 2014, **42**, 252-258.
14. S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A.Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**, 3389-3402.
15. M. Remmert, A. Biegert, A. Hauser and J. Soding, *Nat Methods*, 2012, **9**, 173-175.
16. K. Yamamoto, H. Miyake, M. Kusunoki and S.Osaki, 2010, **277**, 4205-4214.

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans le cadre de la thématique de recherche de notre équipe, l'objectif primordial de notre travail était le développement d'inhibiteurs potentiel de l' α -glucosidase.

Pour cela nous avons choisi la MGAM de souche humaine comme cible thérapeutique. Ensuite, une chimiothèque à cribler de 189 dérivés de xanthone choisis à partir de la littérature a été construite à la recherche de dérivés de xanthonnes qui inhibent efficacement l'enzyme cible.

Avant d'effectuer le criblage virtuel basé sur la structure de la cible (docking moléculaire) avec le programme Molegro Virtual Docker, toutes les structures des composés à cribler et de l'enzyme ont été préparées. Le protocole de docking, qui se base essentiellement sur un algorithme de recherche différentiel évolutionnaire et une fonction de score faisant évaluer les solutions générées, a été validé par un RMSD de 0.3Å calculé après le re-docking du ligand de référence cristallisé.

L'application de ce protocole sur la chimiothèque des dérivés xanthone a conduit au classement des 189 ligands en fonction des valeurs énergétiques d'interaction traduisant l'affinité et la stabilité de fixation des ligand dans le site actif.

Nous avons sélectionné les 20 ligands «Top-scoring» issus de ce criblage, parmi lesquels les xanthonnes sulfonamides ont été majoritaires. Cependant, les cinq dérivés tetramethoxyxanthone sulfonamide synthétisés n'ont montré, malheureusement, aucun potentiel inhibiteur pour l' α -glucosidase de souche *Saccharomyces cerevisiae*.

Ces résultats, nous ont orienté vers une modification structurale des xanthonnes sulfonamide en remplaçant les groupements methoxy par des hydroxy dans le but de favoriser la formation de liaisons hydrogène. Ces tetrahydroxyxanthone sulfonamide ont montré une excellente inhibition en comparaison avec l'inhibiteur de référence «Acarbose» utilisé comme test positif.

Une étude cinétique a été également réalisée, montrant l'inhibition non-compétitive des composés synthétisés. Nous avons alors étudié le mode d'interaction de ces composés avec le site allostérique approprié de l'enzyme cible dont la structure tridimensionnelle a été obtenue par homologie.

Conclusion Générale

Nous avons identifié les dérivés de xanthone sulfonamide tétrahydroxylés en tant qu'inhibiteurs non compétitifs de l' α -glucosidase, dont l'affinité a été favorisée essentiellement par la formation de liaisons hydrogène entre les groupements hydroxyl et le groupement sulfonamide et les résidus du site d'interaction ainsi que l'établissement des interactions de type VDW moins intéressantes.

Pour élucider en détail l'effet de cette famille de xanthone sulfonamide vis-à-vis de l' α -glucosidase il serait intéressant de synthétiser plusieurs dérivés afin d'évaluer leur effet inhibiteur et établir un modèle 3D-QSAR pour cette famille.

Il serait également intéressant d'appliquer le criblage par docking moléculaire sur des banques de molécules disponibles afin de découvrir d'autres structures moléculaires capables d'être de bons inhibiteurs de l' α -glucosidase.

Partie expérimentale

1. Synthèse des dérivés de xanthone :

1.1. Généralités :

Tous les réactifs et les solvants utilisés sont obtenus auprès des firmes commerciales (Sigma-Aldrich, Acros Organic) et utilisés sans autre purification. Certains solvants ont été purifiés et séchés par les procédures standard, lorsque cela est nécessaire. Les chromatographies sur couches minces (CCM) ont été effectuées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F254 (MERCK) et la révélation a été réalisée par exposition sous rayons ultraviolets pour suivre le déroulement de la réaction. Les chromatographies sur colonne ont été réalisées sur gel de silice GEDURAN Kieselgel Si 60 (40-63 μm , MERCK).

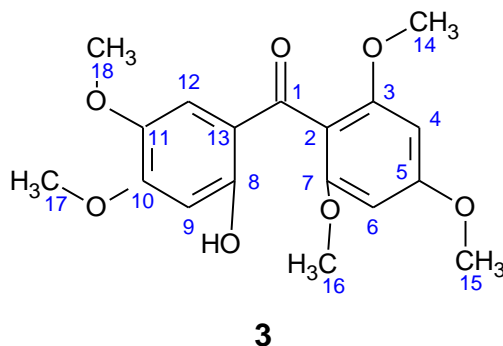
Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance 400 UltraShield 400 (^1H : 400 MHz ; ^{13}C : 100,1 MHz). Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et déterminés par rapport au solvant deutéré utilisé (diméthylsulfoxyde (DMSO)- d_6 ou chloroforme CDCl_3), qui est précisé pour chaque composé. Les constantes de couplage (J) sont reportées en hertz. Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont les suivantes : s; singulet, d; doublet, t ;triplet, dd : doublet dédoublé, q : quadruplet, m : multiplet.

Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil de point de fusion Buchi 434 et sont non corrigés.

1.2. Synthèse des dérivés 1,3,6,7-teraméthoxy-xanthone sulfamide:

1.2.1. Synthèse des précurseurs:

➤ Synthèse de 2,4,6-Triméthoxy-2'-hydroxy-4',5'-diméthoxybenzophénone (3):



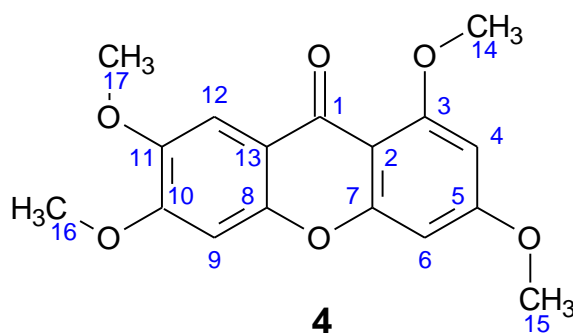
Partie Expérimentale

A une solution de 1,3,5-trimethoxybenzene (**1**) (1.57 g, 9.33 mmol) et de chlorure de 2,4,5-Trimethoxybenzoyle (**2**) (2 g, 8.11 mmol) dans de l'éther anhydre (54.5 mL), sous atmosphère d'argon, on ajoute le trichlorure d'aluminium AlCl₃ (3.63 g, 26.7 mmol). La solution est agitée à température ambiante pendant 48 heures et ensuite hydrolysée avec une solution de HCl (5%). La phase organique est extraite à l'aide de 3 fois 50 ml d'EtOAc et ensuite lavée à l'aide d'une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée avec MgSO₄ anhydre, filtré et concentrée sous pression réduite. Le produit (**3**) est obtenu après recristallisation dans le MeOH, sous forme de cristaux de coloration jaune (1.92 g, 68%); PF, 158°C.

¹HNMR (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ 12.09 (s, 1H, C₈OH), 7.39 (s, 1H, C₉H), 6.42 (s, 2H, C₆H, C₄H), 6.11 (s, 1H, C₁₂H), 3.89 (s, 3H, OC₁₅H₃), 3.8170 (s, 6H, OC₁₇H₃, OC₁₈H₃), 3.66 (s, 6H, OC₁₄H₃, OC₁₆H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 191.63 (C₁), 161.56 (C₅), 158.16 (C₇, C₃), 156.22 (C₈), 153.99 (C₁₀), 143.03 (C₁₁), 120.68 (C₁₂), 115.36 (C₁₃), 113.67 (C₂), 97.85 (C₉), 90.66 (C₄, C₆), 57.23 (C₁₇), 56.29 (C₁₈), 56.02 (C₁₄), 55.91 (C₁₆), 55.40 (C₁₅).

➤ Synthèse de 1,3,6,7-Tetramethoxyxanthone (**4**):



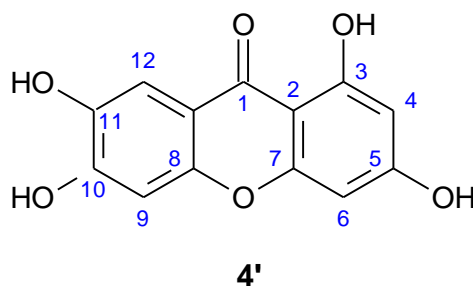
Un mélange de composé (**3**) (1.9 g, 5.45 mmol) et une solution aqueuse d'hydroxyle de tetrabutylammonium (4.5 ml) dans de la pyridine (31.7 ml) et H₂O (15.9 mL), est chauffé à reflux pendant 8h puis hydrolysé avec de l'eau glacée et acidifié avec HCl (5%). La phase organique est extraite à l'aide de 3 fois 65 ml de DCM et ensuite lavée à l'aide d'une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée avec MgSO₄ anhydre, filtré et concentrée sous pression réduite. Pour donner le produit (**4**) après recristallisation dans le MeOH sous forme de poudre blanche (1.54 g, 90%). PF, 224°C.

¹HNMR (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ 7.62 (s, 1H, C₁₂H), 6.77 (s, 1H, C₉H), 6.42 (d, 1H, J = 2.2 Hz, C₆H), 6.31 (d, 1H, J = 2.2 Hz, C₄H), 3.95 (m, 9H, C₁₄H₃, C₁₅H₃, C₁₆H₃), 3.87 (s, 3H, C₁₇H₃).

Partie Expérimentale

^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 174.73 (C_1), 164.30 (C_5), 161.81(C_3), 159.76 (C_7), 154.40 (C_{10}), 150.84 (C_8), 146.51 (C_{11}), 115.99 (C_{13}), 106.95 (C_{12}), 105.80 (C_2), 98.91 (C_9), 95.04 (C_4), 92.61 (C_6), 56.37 (C_{14}), 56.32 (C_{15}), 56.29 (C_{16}), 55.69 (C_{17}).

➤ Synthèse de *1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthone (4')*:



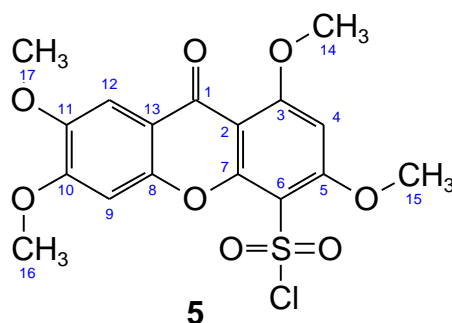
A une solution du composé (**4**) (200 mg , 0.632 mmol) dans le DCM (10 ml), on ajoute le BBr_3 (5.04 ml d'une solution de 1.0 M dans le DCM) à -78°C (bain Acetone/carboglance) puis le mélange réactionnel revient à la température ambiante avec une forte agitation pendant 72h . A la fin de la réaction, suivie par CCM, le mélange est refroidi (0°C), avant addition de l'eau pour arrêter la réaction.

Le DCM restant dans le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. la phase organique est extraite avec (2×50 ml) d'AcOEt lavée à l'aide d'une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée avec MgSO_4 anhydre, filtrée, concentrée sous pression réduite et purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : EtOAc/Hexane : 65/35) pour donner (120.6 mg, 73.3%) une poudre jaune. PF, 319°C .

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 13.17 (s, 1H, C_3OH), 10.84 (s, 1H, C_5OH), 10.70 (s, 1H, C_{10}OH), 9.78 (s, 1H, C_{11}OH), 7.39 (s, 1H, C_{12}H), 6.88 (s, 1H, C_9H), 6.34 (s, 1H, C_6H), 6.16(s, 1H, C_4H).

^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 179.35 (C_1), 165.14 (C_5), 163.06 (C_3), 157.78 (C_7), 154.48 (C_{10}), 151.37 (C_8), 144.20 (C_{11}), 112.25 (C_{13}), 108.49 (C_{12}), 103.12 (C_9), 102.03 (C_2), 98.14 (C_4), 94.06 (C_6).

➤ Synthèse de 1,3,6,7-Tetramethoxyxanthone-4-sulfonyl chlorure (5):



A une température de 0°C, on ajoute l'acide chlorosulfonique (3 mL) goutte à goutte sur le composé (4) (1.5 g, 4.74 mmol) puis on applique une agitation forte pendant 30 min. Le mélange réactionnel sera ensuite versé dans le mélange eau glacée-AcOEt avec une bonne agitation suivie d'une décantation pour récupérer la phase organique, qui est ensuite lavée à l'aide d'une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée avec MgSO₄ anhydre, filtrée et concentrée sous pression réduite. Le composé (5) est obtenu et caractérisé dans son état brut sous forme d'une poudre jaune pâle (1.6 g, 81%). PF, 238°C.

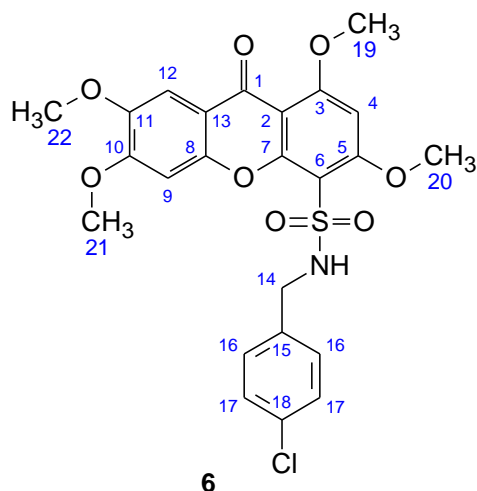
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, TMS): δ 7.58 (s, 1H, C₁₂H), 6.95 (s, 1H, C₄H), 6.39 (s, 1H, C₉H), 4.09 (s, 3H, OC₁₄H₃), 4.07 (s, 3H, OC₁₅H₃), 4.02 (s, 3H, OC₁₆H₃), 3.97 (s, 3H, OC₁₇H₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.98 (C₁), 168.58 (C₃), 162.97 (C₅), 157.32 (C₁₀), 155.04 (C₈), 150.41 (C₁₁), 147.43 (C₇), 115.51 (C₁₃), 112.97 (C₂), 106.88 (C₁₂), 105.13 (C₄), 99.63 (C₉), 90.59 (C₆), 56.78 (C₁₄), 56.71 (C₁₅), 56.60 (C₁₆), 56.32 (C₁₇).

➤ Protocole générale pour la synthèse des dérivés de tetraméthoxy-xanthone sulfonamide:

Le composé (5) (150 mg, 0.36 mmol) est traité avec l'amine appropriée (0.72 mmol) dans le 1,4-dioxane (7.5 mL) à température ambiante pendant 3 à 8 heures en vérifiant l'avancement de la réaction par CCM jusqu'à disparition du composé (5). A la fin de la réaction, le solvant est évaporé sous pression réduite et le brut obtenu est purifié par recristallisation.

• **1,3,6,7-Tetramethoxy-9-oxo-9H-xanthene-4-sulfonicacid 4-chloro-benzylamide (6)**

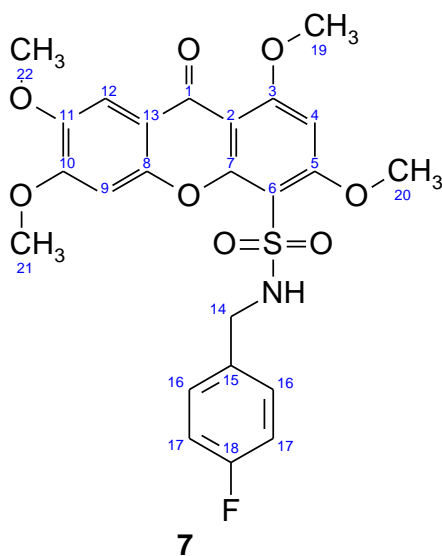


Le composé (6) est obtenu sous forme de poudre blanche (112 mg, 59.7%). PF, 297°C.

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.03 (s, 1H, NH) , 7.50 (m, 2H, C₁₆), 7.38 (s, 1H, C₁₂), 7.19 (s, 1H, C₉) 7.14 (m, 2H, C₁₇), 6.53 (s, 1H, C₄), 4.11 (s, 2H, C₁₄), 4.00 (s, 1H, C₁₉) , 3.99 (s, 1H, C₂₀), 3.93 (s, 1H, C₂₁), 3.86 (s, 1H, C₂₂).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172.25 (C₁), 163.98 (C₃), 162.07 (C₅), 155.56 (C₁₀), 154.53 (C₇), 149.77 (C₈), 146.69 (C₁₁), 136.38 (C₁₅), 133.06 (C₁₈), 130.90 (C₁₆), 128.51 (C₁₈), 114.62 (C₁₃), 109.14(C₂), 105.41(C₁₂), 104.58(C₆), 100.15(C₉), 91.96 (C₄), 56.98 (C₁₉) , 56.64 (C₂₀), 56.39 (C₂₁), 55.76 (C₂₂), 45.62 (C₁₄).

• **1,3,6,7-Tetramethoxy-9-oxo-9H-xanthene-4-sulfonicacid 4-fluoro-benzylamide (7)**



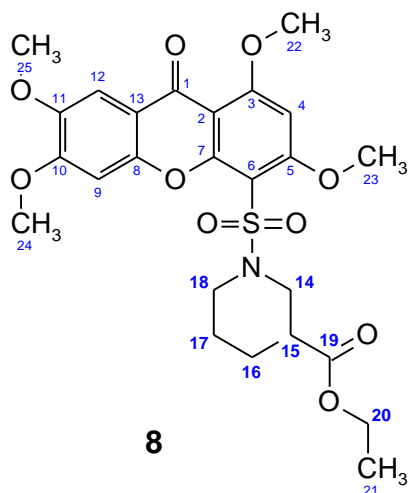
Partie Expérimentale

Le composé (7) est obtenu sous forme de poudre blanche (112.69 mg, 62%). PF, 286°C.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 7.56 (t, 1H, $J = 6.6$ Hz, C_{12}), 7.37 (s, 1H, C_9), 7.23 (m, 3H, C_4 , C_{16}), 6.90 (m, 2H, C_{17}), 6.54 (s, 1H, NH), 4.11 (d, 2H, $J = 6.2$ Hz), 4.01 (s, 3H, C_{19}), 3.98 (s, 3H, C_{20}), 3.94 (s, 3H, C_{21}), 3.86 (s, 3H, C_{22}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, DMSO) δ 172.27(C_1), 163.70 (C_3), 132.37 (C_{18}), 161.91 (C_5), 155.50 (C_{10}), 154.49 (C_7), 149.74 (C_8), 146.64 (C_{11}), 133.52 (C_{15}), 131.24 (C_{16}), 115.33 (C_{17}), 114.56 (C_{13}), 109.16(C_2), 105.39(C_{12}), 104.50 (C_6), 100.12 (C_9), 91.96 (C_4), 56.95 (C_{19}), 56.58 (C_{20}), 56.28 (C_{21}), 55.60 (C_{22}), 45.42 (C_{14}).

• **1-((1,3,6,7-Tetramethoxyxanthone-4-yl)-sulfonyl)-3-carbethoxy-piperidine (8)**



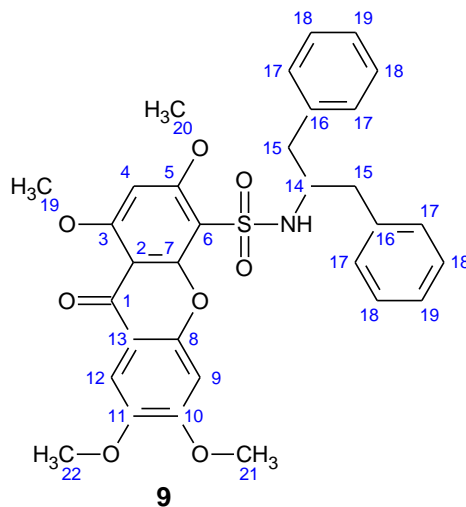
Le composé (8) est obtenu sous forme de poudre blanche (105.6 mg, 54.7%). PF, 305°C.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.58 (s, 1H, C_{12}), 6.95 (s, 1H, C_9), 6.38 (s, 1H, C_4), 4.21 (m, $J = 11.3$ Hz, 2H, C_{20}), 4.11 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H, $\text{C}_{14(a)}$), 4.07 (s, 3H, C_5), 4.05 (s, 3H, C_3), 4.00 (s, 3H, C_{10}), 3.96 (s, 3H, C_{11}), 3.85 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, $\text{C}_{14(b)}$), 2.9 (m, $J = 11.4$ Hz, 1H, C_{15}), 2.64 (m, 2H, C_{18}), 2.09 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, $\text{C}_{16(a)}$), 1.79 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, $\text{C}_{16(b)}$), 1.65 (m, $J = 12.2$ Hz, 1H, $\text{C}_{17(a)}$), 1.46 (m, $J = 21.6, 11.6$ Hz, 1H, $\text{C}_{16(b)}$), 1.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H, C_{21}).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 174.12 (C_1), 172.98 (C_{19}), 164.97 (C_3), 162.97 (C_5), 157.48 (C_{10}), 155.04 (C_{17}), 150.50 (C_8), 147.20 (C_{11}), 115.51 (C_{13}), 107.86 (C_2), 106.88 (C_6), 105.18 (C_{12}), 99.53 (C_4), 90.68 (C_9), 60.69 (C_{20}), 56.78 (C_{22}), 56.71 (C_{23}), 56.60, 56.32 (C_{24}), 47.91 (C_{25}), 45.87 (C_{15}), 27.03 (C_{16}), 24.67 (C_{16}), 14.17(C_{21}).

Partie Expérimentale

- ***N*-(dibenzyl)-(1,3,6,7-Tetramethoxyxanthone-4-yl)-sulfonamide (9):**

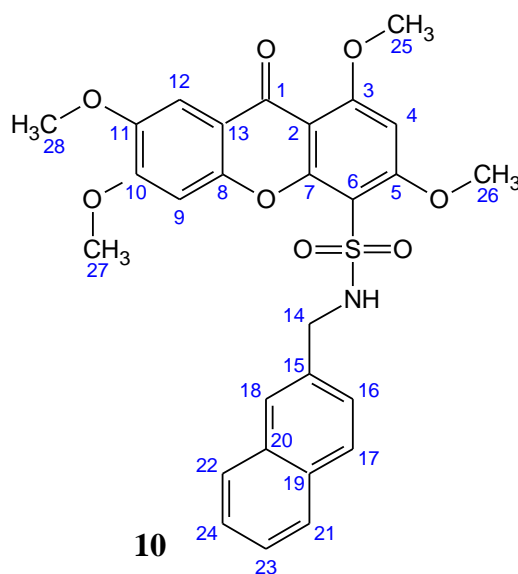


Le composé (9) est obtenu sous forme de poudre blanche (98 mg, 46%). PF, 312°C.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.60 (s, 1H, C₁₂), 7.41-7.25 (m, 8H, C_{16,17}), 7.08-6.98 (m, 2H, C₁₈), 6.87 (s, 1H, C₉), 6.63 (s, 1H, C₄), 4.16 (s, 4H, C₁₄), 4.06 (s, 3H, C₁₉), 4.03 (s, 3H, C₂₀), 3.86 (s, 6H, C_{21,22})

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.24 (C₁), 164.14 (C₃), 162.14 (C₅), 156.36 (C₁₀), 154.57 (C₇), 149.62 (C₈), 146.72 (C₁₁), 130.01 (C₁₅), 128.75- 128.16 (10C, C_{16,17,18}), 114.70 (C₁₃), 108.92 (C₂), 105.74 (C₁₂), 104.68 (C₆), 99.28 (C₄), 92.15 (C₉), 57.15 (C₁₉), 56.68 (C₂₀), 56.18 (C₂₁), 55.73 (C₂₂), 49.88 (C₁₄).

- ***N*-(2-naphthyl)-methyl-(1,3,6,7-Tetramethoxyxanthone-4-yl)-sulfonamide(10):**



Le composé (10) est obtenu sous forme de poudre blanche (102.4 mg, 53%). PF, 289°C.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6 , TMS): δ 8.07 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, C₂₁), 8.02 (t, 1H, NH), 7.69 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, C₂₂), 7.56 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, C₁₈), 7.32 (m, 4H, C₁₂, C₁₆, C₂₃, C₂₄), 7.20 (s, 1H, C₉), 7.05 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H, C₁₇), 6.17 (s, 1H, C₄), 4.58 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz, C₁₄), 3.91 (s, 3H, C₂₅), 3.85 (s, 9H, C₂₆, C₂₇, C₂₈).

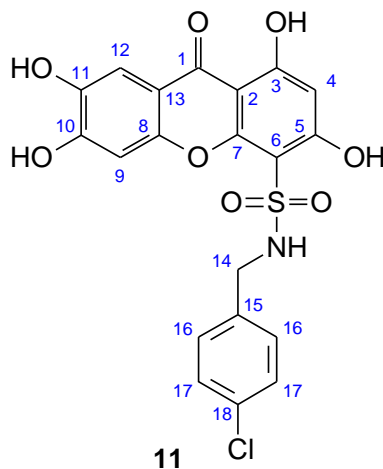
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 172.07 (C₁), 163.35 (C₃), 161.56 (C₅), 154.96 (C₁₀), 154.33 (C₇), 149.61 (C₈), 146.50 (C₁₁), 133.18 (C₁₅), 132.94 (C₂₀), 132.03 (C₁₉), 128.98 (C₁₇), 128.61 (C₂₂), 127.22 (C₂₁), 126.70 (C₁₈), 126.19 (C₁₀), 125.32 (C₂₄), 123.45 (C₂₃), 114.58 (C₁₃), 109.08 (C₂), 105.00 (C₆), 104.41 (C₁₂), 100.18 (C₉), 91.34 (C₄), 56.62 (C₂₅), 56.34 (C₂₆), 55.71 (C₂₇), 44.36 (C₁₄).

➤ Protocole générale pour la synthèse des dérivés de tetrahydroxy-xanthone sulfonamide:

A une solution du composé tetramethoxy-xanthone sulfonamide approprié (**6-10**) (1 eq) dans le DCM, on ajoute le BBr₃ (8 eq d'une solution de 1.0 M dans le DCM) à -78°C (bain Acetone/carboglace) puis le mélange réactionnel revient à la température ambiante avec une bonne agitation pendant 72h. À la fin de cette réaction suivie par CCM, le mélange est refroidi (0°C), avant addition de l'eau pour arrêter la réaction.

Le DCM restant dans le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. La phase organique est extraite avec (2 × 50 ml) d'EtOAc, lavée à l'aide d'une solution aqueuse de NaCl saturée, séchée avec MgSO₄ anhydre, filtrée, concentrée sous pression réduite et purifiée par chromatographie sur gel de silice (éluant : EtOAc/Hexane) pour donner les xanthes sulfonamide tetra-hydroxylés (**11-15**).

• 1,3,6,7-Tetrahydroxy-9-oxo-9H-xanthene-4-sulfonicacid 4-chloro-benzylamide (11)

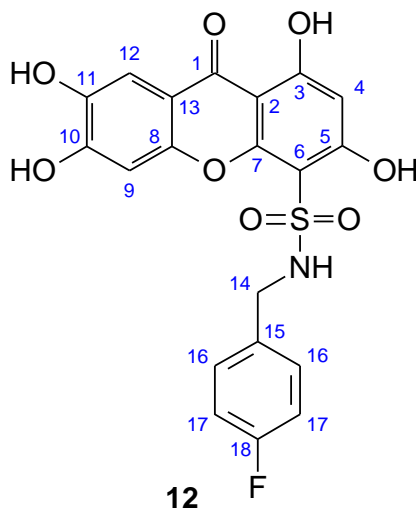


Le composé (11) est obtenu sous forme de poudre jaunâtre (44.3 mg, 45%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.78 (s, 1H, OHC₃), 11.06 (s, 1H, OHC₅), 10.86 (s, 1H, OHC₁₀), 10.01 (s, 1H, OHC₁₁), 8.58 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, NH), 7.37 (s, 1H, C₁₂), 7.20 (s, 1H, C₉), 7.11 (m, $J = 8.3$ Hz, 2H, C₁₇), 7.03 (m, $J = 8.3$ Hz, 2H, C₁₆), 6.21 (s, 1H, C₄), 4.14 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, C₁₄).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 178.54 (C₁), 170.31 (C₅), 165.12 (C₃), 162.28 (C₁₀), 154.44 (C₇), 150.67 (C₈), 144.54 (C₁₁), 135.85 (C₁₅), 131.69 (C₁₈), 129.27 (C₁₆), 127.60 (C₁₇), 111.50 (C₁₃), 107.32 (C₁₂), 104.07 (C₉), 103.67 (C₆), 101.61 (C₂), 98.06 (C₄), 45.36 (C₁₄).

• 1,3,6,7-Tetrahydroxy-9-oxo-9H-xanthene-4-sulfonicacid 4-fluoro-benzylamide (12)



•

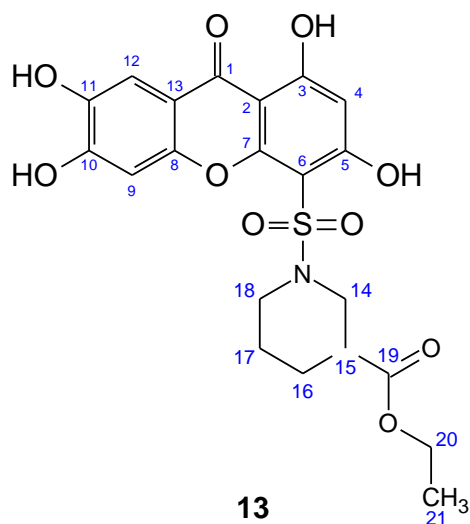
Partie Expérimentale

Le composé (12) est obtenu sous forme de poudre jaunatre (54.6 mg, 51%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 13.76 (s, 1H, OHC₃), 11.06 (s, 1H, OHC₅), 10.87 (s, 1H, OHC₁₀), 10.01 (s, 1H, OHC₁₁), 8.57 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, NH), 7.38 (s, 1H, C₁₂), 7.22 (s, 1H, C₉), 7.16 (dd, $J = 8.6, 5.6$ Hz, 2H, C₁₆), 6.83 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H, C₁₇), 6.22 (s, 1H, C₄), 4.16 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H, C₁₄).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ 178.55 (C₁), 165.04 (C₃), 162.27 (C₁₈), 159.96 (C₁₀), 154.46 (C₇), 150.70 (C₈), 144.56 (C₁₁), 133.07 (C₁₅), 129.41 (C₁₆), 114.52 (C₁₇), 111.47 (C₁₃), 107.30 (C₁₂), 104.10 (C₆), 103.69 (C₉), 101.61 (C₂), 97.57 (C₄), 45.34 (C₁₄).

• **1-((1,3,6,7-Tetrahydroxanthone-4-yl)-sulfonyl)-3-carbethoxy-piperidine (13)**

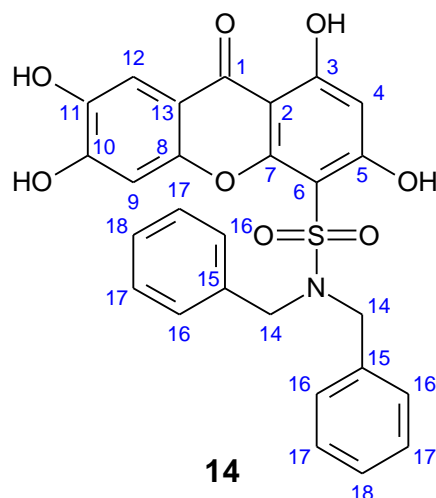


Le composé (13) est obtenu sous forme de poudre jaunatre (37.4 mg, 38%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.75 (s, 1H, C₃OH), 11.15 (s, 1H, C₅OH), 10.9 (s, 1H, C₁₀OH), 10.02 (s, 1H, C₁₁OH), 7.39 (s, 1H, C₁₂), 6.89 (s, 1H, C₉), 6.31 (s, 1H, C₄), 4.02 (m, $J = 6.6$ Hz, 1H, C_{14(a)}), 4.24 (m, $J = 10.8$ Hz, 2H, C₂₀), 4.35 (d, $J = 6.3$ Hz, 1H, C_{14(b)}), 3.01 (m, $J = 11.1$ Hz, 1H, C₁₅), 2.98 (m, 2H, C₁₈), 1.71 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, C_{16(a)}), 1.61 (d, $J = 11.7$ Hz, 1H, C_{16(b)}), 1.47 (m, $J = 12.1$ Hz, 2H, C₁₇), 1.21 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H, C₂₁).

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 183.98 (C₁), 179.02 (C₁₉), 170.65 (C₅), 168.50 (C₃), 160.61 (C₈), 159.95 (C₇), 155.73 (C₁₀), 149.86 (C₁₁), 116.81 (C₁₃), 112.78 (C₁₂), 107.85 (C₉), 107.29 (C₆), 103.47 (C₄), 100.01 (C₂), 61.17 (C₂₀), 52.28 (C₁₄), 50.64 (C₁₈), 45.51 (C₁₅), 29.04 (C₁₆), 23.64 (C₁₇), 19.12 (C₂₁).

- ***N*-(dibenzyl)-(1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthone-4-yl)-sulfonamide (14):**

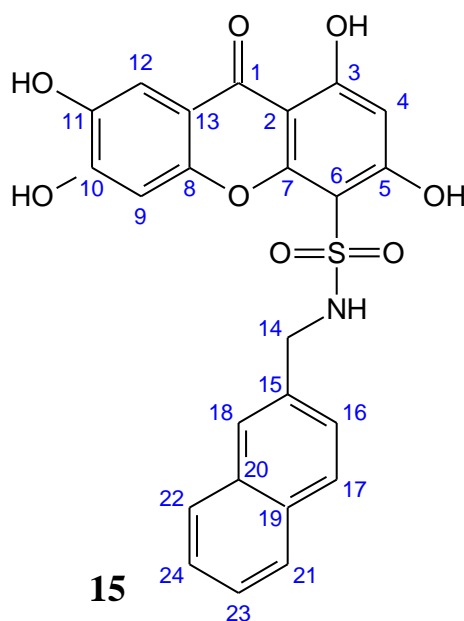


Le composé (14) est obtenu sous forme de poudre jaunâtre (39 mg, 43%).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 13.70 (s, 1H, C_3OH), 11.11 (s, 1H, C_5OH), 10.83 (s, 1H, C_{10}OH), 9.93 (s, 1H, C_{11}OH), 7.48-7.17 (m, 10H, $\text{C}_{16,17,18}$), 7.17 (s, 1H, C_{12}), 6.90 (s, 1H, C_9), 6.23 (s, 1H, C_4), 4.46 (s, 4H, C_{14}).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 177.60 (C_1), 163.43 (C_5), 160.32 (C_3), 158.22 (C_{10}), 153.37 (C_7), 149.69 (C_8), 143.47 (C_{11}), 137.54 (C_{15}), 128.93, 128.81, 128.53, 128.52, 127.56 ($\text{C}_{16,17,18}$), 110.35 (C_{13}), 106.25 (C_{12}), 106.16 (C_6), 102.67 (C_9), 100.60 (C_2), 96.96 (C_4), 51.62 (C_{14}).

- ***N*-(2-naphthyl)-methyl-(1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthone-4-yl)-sulfonamide(15):**



Le composé (15) est obtenu sous forme de poudre jaunâtre (54.6 mg, 51%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 13.76 (s, 1H, C₃OH), 11.06 (s, 1H, C₅OH), 10.87 (s, 1H, C₁₀OH), 10.01 (s, 1H, C₁₁OH), 8.67 (s, 1H, NH), 7.84 (m, 3H, $J = 8.5$ Hz, C₁₇H, C₂₁H, C₂₂H), 7.57 (s, 1H, C₁₂), 7.34 (m, 3H, $J = 8.1$ Hz, C₁₆H, C₂₃H, C₂₄H), 7.04 (m, 2H, C₉H, C₁₈H), 4.64 (s, 2H, C₁₄H)

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 178.73 (C₁), 164.56 (C₅), 161.46 (C₃), 154.50 (C₁₀), 154.31 (C₇), 150.82 (C₈), 144.60 (C₁₁), 133.03 (C₁₅), 132.67 (C₂₀), 131.51 (C₁₉), 128.09 (C₁₇), 127.86 (C₂₂), 127.33 (C₂₁), 125.67 (C₁₈), 125.28 (C₁₆), 124.49 (C₂₄), 123.51 (C₂₃), 111.48 (C₁₃), 107.37 (C₂), 107.30 (C₆), 103.80 (C₁₂), 101.72 (C₉), 98.09 (C₄), 44.39 (C₁₄).

2. Evaluation de l'activité inhibitrice :

2.1. Généralités :

La détermination des valeurs d'absorbance et l'étude cinétique ont été effectuées à $\lambda=405$ nm avec Spectrophotomètre UV-visible à lecteur de microplaque à 96 puits (Kontron type 940). Les courbes d'IC₅₀ et les graphes de type Michaelis menten et Lineweaver-Burke (double inverse) ont été obtenus par avec le logiciel GraphPad Prism 6.

2.2. Protocole du test in vitro et évaluation des valeurs IC₅₀:

Avant la mise en œuvre du test in vitro, il est nécessaire de préparer plusieurs solutions :

- ✓ Une solution tampon de phosphate de potassium 0.1M et PH=6.
- ✓ l'enzyme à une concentration de 10U/ml (1mg/6ml)
- ✓ Le substrat à une concentration de 2mM
- ✓ Une solution de carbonate de sodium 0.5M
- ✓ Des solution des composés à tester à différentes concentration dans le DMSO

- **Protocole du test:**

Dans une plaque à 96 puits, on dépose dans chaque puits 5 μ l d'une solution du composé à tester dans le DMSO (à la concentration finale donnée), puis on ajoute 45 μ l de la solution tampon et 20 μ l de substrat à une concentration finale de 125 μ M. Le mélange est ensuite mis à pré-incubation à 37°C pendant 5min. Après cette pré-incubation, la réaction est initialisée en ajoutant 10 μ l la solution enzyme à une concentration finale de 0.078U/ml pour une incubation de 15 min à 37°C. A la fin de cette incubation, la solution 50 μ l de carbonate de

sodium est ajoutée afin d'arrêter la réaction enzymatique et favoriser la formation du p-nitro-phénolate qui sera dosé par le spectrophotomètre en mesurant l'absorbance à 405 nm.

Il est également nécessaire de mesurer l'absorbance des solutions des produits à tester à différentes concentrations (le blanc de chaque produit) pour éviter toute interférence entre l'absorbance du composé et l'absorbance du mélange réactionnel.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon l'équation suivante

$$\% \text{inhibition} = \left(\frac{A_c - A_{\text{test}}}{A_c} \right) \times 100$$

Avec :

- A_c : absorbance mesurée pour la solution contrôle (sans inhibiteur)
- A_{test} : absorbance en présence du composé à tester.

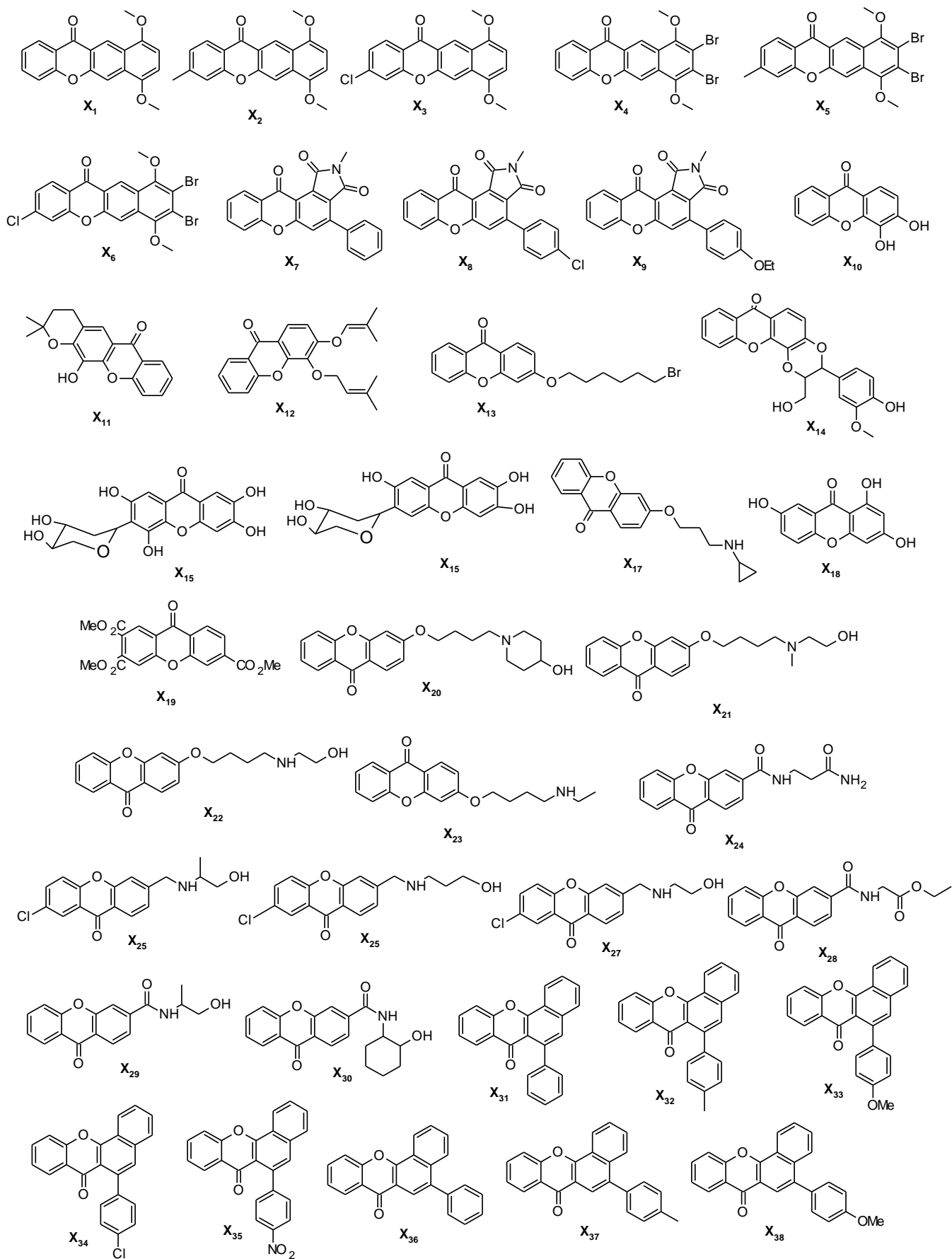
2.3. Etude cinétique:

La détermination du type d'inhibition a été réalisée par une étude cinétique en présence du composé 11 dont deux concentrations de l'inhibiteur autour de la valeur IC_{50} (25 μM et 40 μM) ont été choisies. Pour chaque concentration, l'activité de l' α -glucosidase a été testée en variant les concentrations du substrat [S] pNP-glycoside (0.1, 0.125, 0.2, 0.25, 0.5, 1 M) en conservant les mêmes volumes et concentration utilisées lors du test pour les autres réactifs.

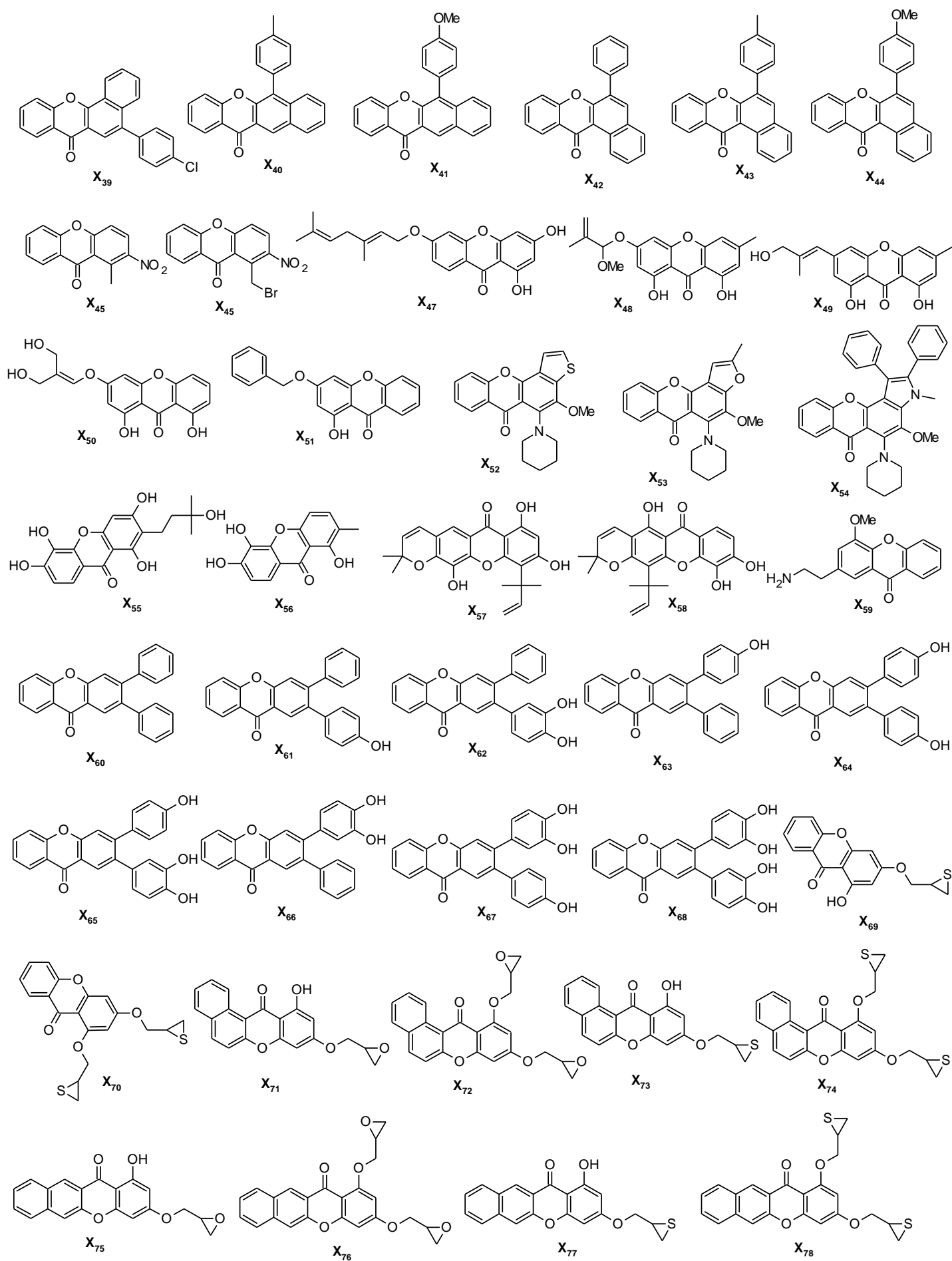
Les vitesses des réactions enzymatiques ont été déterminées sous les mêmes conditions du protocole du test en effectuant une lecture toute les 60s par spectrophotométrie à 405 nm. Ces vitesses ont été utilisées pour tracer les graphes de type Michaelis menten et Lineweaver-Burke (double inverse) et ainsi déterminer les valeurs de K_m , V_{max} et K_i .

ANNEXE

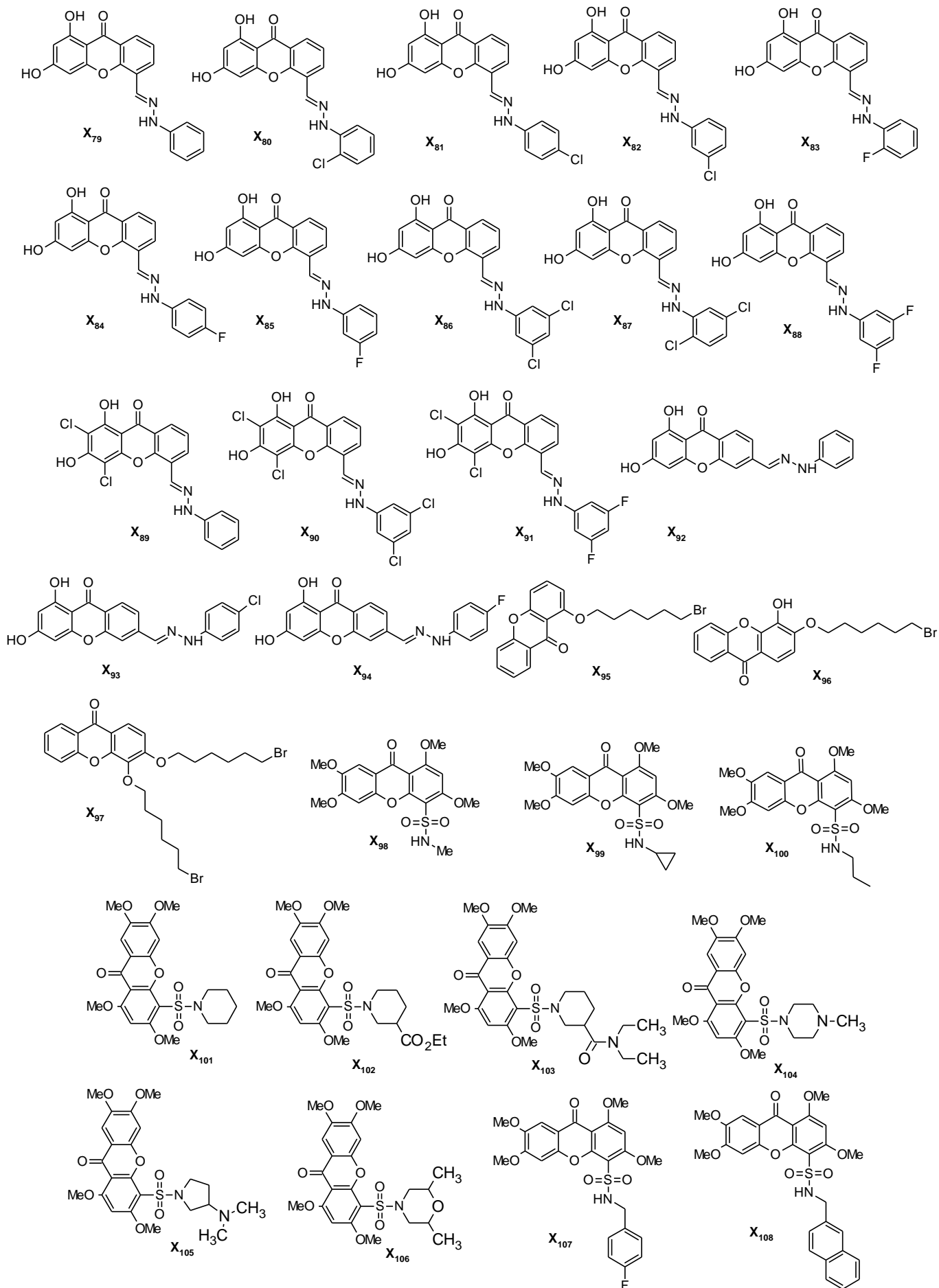
Chimiothèque de dérivés de xanthone étudiée



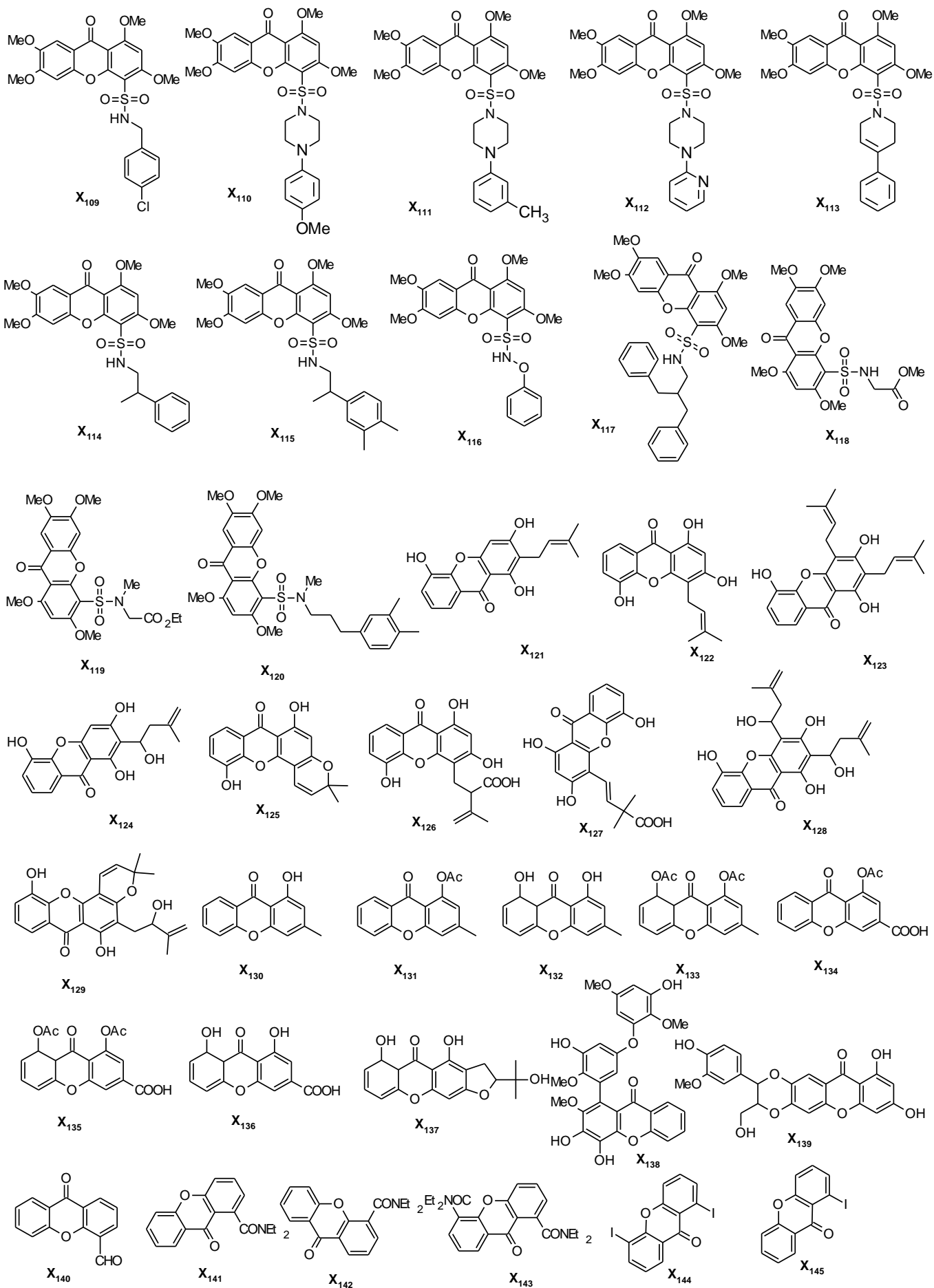
Chimiothèque de dérivés de xanthone étudiée



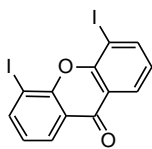
Chimiothèque de dérivés de xanthone étudiée



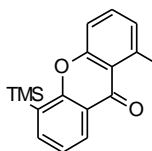
Chimiothèque de dérivés de xanthone étudiée



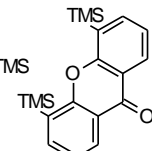
Chimiothèque de dérivés de xanthone étudiée



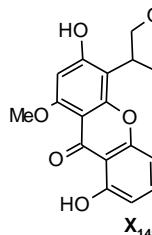
X₁₄₆



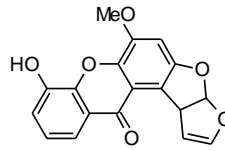
X₁₄₇



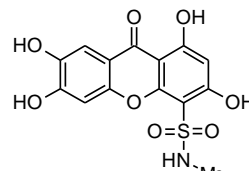
X₁₄₈



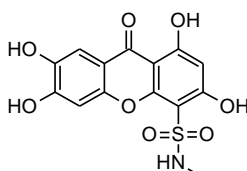
X₁₄₉



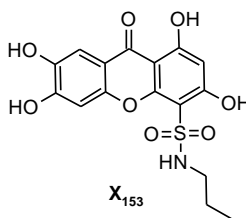
X₁₅₀



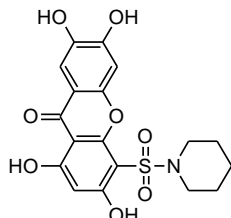
X₁₅₁



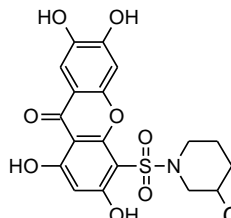
X₁₅₂



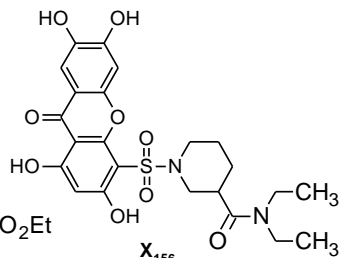
X₁₅₃



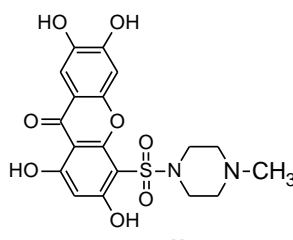
X₁₅₄



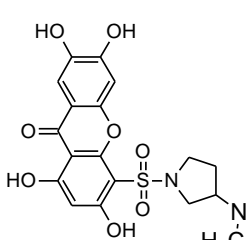
X₁₅₅



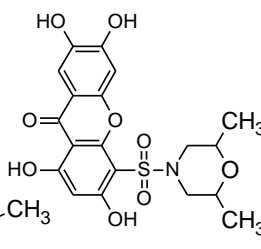
X₁₅₆



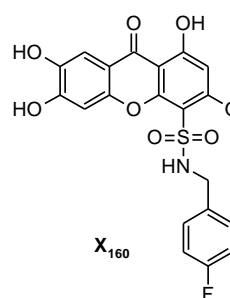
X₁₅₇



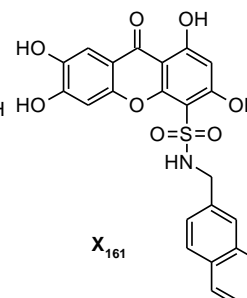
X₁₅₈



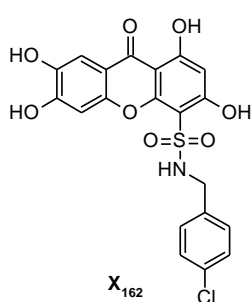
X₁₅₉



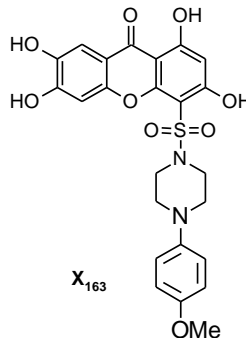
X₁₆₀



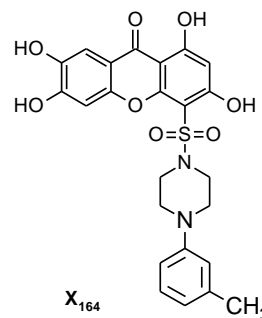
X₁₆₁



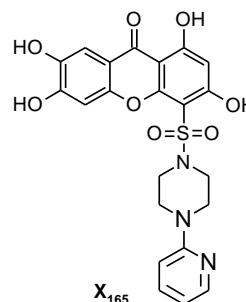
X₁₆₂



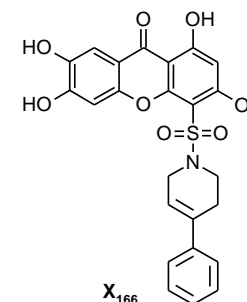
X₁₆₃



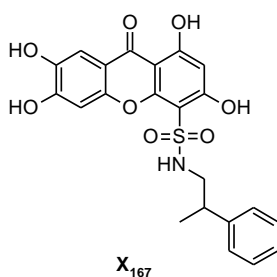
X₁₆₄



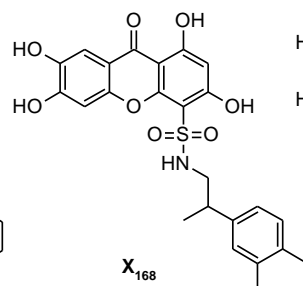
X₁₆₅



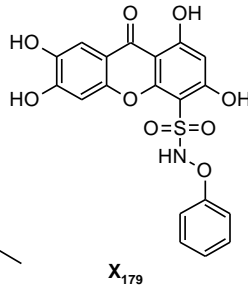
X₁₆₆



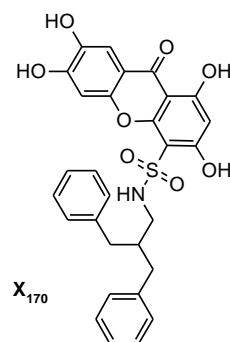
X₁₆₇



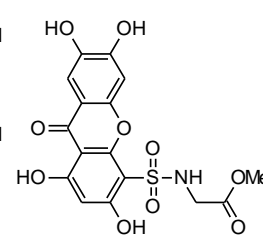
X₁₆₈



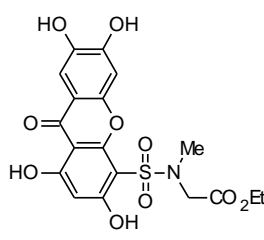
X₁₇₉



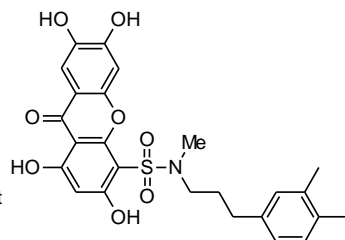
X₁₇₀



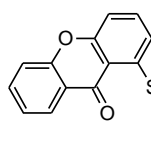
X₁₇₁



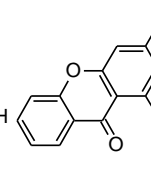
X₁₇₂



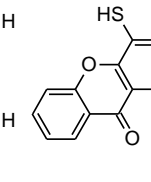
X₁₇₃



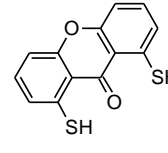
X₁₇₄



X₁₇₅



X₁₇₆



X₁₇₇

Chimiothèque de dérivés de xanthone étudiée

