



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des Sciences Exactes, des Sciences
De La Nature et de La Vie
Département des Sciences de la Matière

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : **Sciences de la Matière**
Filière : **Chimie**
Spécialité : **Chimie pharmaceutique**

Réf. : Entrez la référence du document

Présenté et soutenu par :

ZERGUI ISLAM

BOUGROURA KHADIDJA

Le : 11/07 /2021

Conception des nouveaux agoniste du récepteur FXR par la méthode de modélisation moléculaire

Jury:

Djouama Hanane	Mcb	Universite De Biskra	President
Ouassaf Moubareka	Mca	Universite De Biskra	Rapporteur
Belaidi Houmam	Mcb	Universite De Biskra	Examineur

Année universitaire : 2020/2021



zergui islam

Dédicaces Avec l'expression de ma

reconnaissance, Je dédie ce travail A ma chère maman, pour leur amour, leur soutien et tous leurs sacrifices,

A mes très chères sœurs chaima, Pour leurs encouragements, Je vous adresse mes vœux de bonheur et d'un avenir radieux

A mes amis les plus fidèles abedelhamide, abedelhak, raouf, fatima mouade et asma A toute la famille Et mon binôme de travail : khadidja et à tous mes chers amis.

Je vous remercie tous vos encouragements et votre soutien me donnent la force de continuer





Bougroua Khadidja

Dédicaces Avec l'expression de ma

reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels soient les termes embrassés ; je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

*A L'homme, mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect :
mon cher père Fousef.*

*A la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences et
qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : mon adorable mère Rabia.*

*A mes très chères sœurs : Assma, Hassiba. Aux enfants de mes chères sœurs :
Houdhiafa, Abd elhai , Haroun ,Alli .*

Et à mes très chers frères : Bilal , Saddam ,Ayoub.

A mes chers amis : Romaisa, Nada. Et mon binôme de travail : zergui Islam.

À tous les membres de ma promotion.

À tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

À tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer .



Remerciement

Le travail présenté dans cette thèse a été dirigé par Dr. Mebarka Ouassaf.

Tout d'abord, nous remercions Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il nous a données durant toutes ces années d'études.

Nous tenant à remercier sincèrement l'encadreur, Mme Mebarka Ouassaf pour sa patience, ses encouragements, son orientation, et ses conseils précieux, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Nous souhaitant adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

Nous exprimons nos profonds remerciements aux membres de jury qui vont juger notre recherche.

J'adresse, enfin et surtout, ma plus profonde gratitude et tout mon amour à mon mère , mes sœurs et mes frères, qui ont su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, à mes amis Abdeelhalim , abedelhak, halim, fatima, , raouf, zaki, khalile , asma ; sayfe , amine, Youssef, Nadji et madjide.

Résumé

Le récepteur Farnesoïde X (FXR) est un membre de la famille des récepteurs nucléaires impliqués dans de multiples processus physiologiques par la régulation de gènes cibles spécifiques. Le rôle critique de FXR en tant que régulateur transrationnel en fait une cible prometteuse pour diverses maladies, en particulier celles liées à des troubles métaboliques tels que le diabète et la cholestase.

Dans ce travail, une approche à trois niveaux in silico a été appliquée pour étudier certains aspects structurels et physico-chimiques importants d'une série de dérivés de l'acide Anthranilique (AAD) nouvellement identifiés comme de puissants agonistes partiels du récepteur Farnesoïde X (FXR). L'amarrage protéine-ligand a été réalisé à l'aide du logiciel MOE. L'analyse d'amarrage moléculaire a confirmé une forte énergie de liaison et l'interaction des 18 ligands avec la protéine cible. Ont présentés une affinité supérieure au composé de référence(OMM) dont le score est égal à -8.24 kcal/mol. Des études d'amarrage moléculaire ont indiqué que les nouveaux agonistes FXR ont des modes de liaison similaires aux agonistes FXR connus.

L'application de la règle de 5 de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME de ces molécules qui se présente comme un agonistes potentiellement plus actif que le FXR

Mots clés : Docking, FXR, l'acide anthranilique, Lipinski, ADME.

Abstract

The farnesoid X receptor (FXR) is a member of the nuclear receptor family involved in multiple physiological processes through the regulation of specific target genes. The critical role of FXR as a transcriptional regulator makes it a promising target for various diseases, particularly those related to metabolic disorders such as diabetes and cholestasis.

In this work, a three-level in Silico approach was applied to study some important structural and physicochemical aspects of a series of Anthranilic acid (DAA) derivatives newly identified as potent partial agonists of the Farnesoid X receptor (FXR). Protein-ligand docking was performed using MOE software. Molecular docking analysis confirmed strong binding energy and the interaction of the 18 ligands with the target protein. Showed an affinity greater than the reference compound (OMM) whose score is equal to -8.24 kcal / mol. Molecular docking studies have indicated that the new FXR agonists have similar binding patterns to known FXR agonists.

The application of Lipinski's rule of five gives us positive information on the ADME properties of these molecules, which appear to be potentially more active agonists than FXR.

Keywords: Docking, FXR, anthranilic acid, Lipinski, ADME.

Table des matières

Résumé	V
Abstract.....	VI
Table des matières.....	VII
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XII
Abréviations	XIII
Introduction Générale	1

CHAPITRE I

Les Récepteurs Nucléaires

1. Introduction.....	5
2. Classification Des Récepteurs Nucléaires	5
2.1. Classification De Mangelsdorf	5
2.2. Classification Phylogénétique	6
2.3. Classification Physiologique	7
3. Structure Des Récepteurs Nucléaires.....	8
3.1. La Region A/B	9
3.2. Le Domaine De Liaison A L'adn (DBD) (Région C)	9
3.4. Le Domaine De Liaison Au Ligand (LBD) (Region E)	10
4. Mode D'activation Des Récepteurs Nucléaires	10
5. Le Recepteur Nucleaire Farnesoid X Receptor (Fxr)	11
5.1. Généralités	11
5.2. Découverte Et Expression Tissulaire De FXR	11

5.3. Ligands Et Modulateurs De L'activité De FXR	12_Toc75437818
5.4. Ligands Synthétiques	13
5.5. Mode D'activation De FXR	13
5.6. Régulation Post-Traductionnelle De FXR.....	15
5.6.1. Phosphorylation De Fxr	15
5.6.2. Acétylation De FXR.....	16
5.6.3. Ubiquitinylation De FXR	16
5.6.4. Sumoylation De FXR.....	17
6. Role De Fxr Dans La Regulation Du Metabolisme	17
6.1. Métabolisme Des Acides Biliaires	18
6.2. Role De FXR Dans La Synthèse, Le Transport Et La Detoxification Des Acides Biliaires	19
6.2.1. Régulation Du Transport Des Acides Biliaires	19
6.2.2 Régulation De La Synthèse Des Acides Biliaires	19
6.2.3 Rôle De FXR Dans La Circulation Entérohépatique Des Acides Biliaires.....	20
6.2. 4. Rôle De FXR Dans La Détoxification Des Acides Biliaires.....	21
7. Régulation De L'homéostasie Glucidique.....	22_Toc75437836
8. Autres Rôles De FXR	24
Références Bibliographique	25

CHAPITRE II

LE DOKING Moléculaire

1. Introduction	36
2. Le Docking Moléculaire	37
2.1. Les Outils De Docking	38
2.1.1. Le Récepteur.....	39
2.1.2. Ligand	39
2.1.3. Programme.....	39

2.1.4. Types D'interactions	40
2.2. Le Processus De Scoring	44
2.2.1. Représentation Géométrique	45
2.2.2. Représentation Atomique	46
3. Protocole Général De Docking	47
Références Bibliographique	49

CHAPITRE III

Applications, Résultats Et Discussion

1. Introduction :	50
2. Protocole Générale.....	50
3. Matériel Et Outils Utilisés	51
3.1 Micro-Ordinateur	51
3.2 Banques (Bases) De Données Et Outils Logiciels	51
4 Méthodologie Du Travail	53
4.1 Préparation De L'enzyme	53
4.2 Détection Des Cavités.....	54
4.3 Préparation Des Ligands.....	56
4.4 Simulation Du Docking Moléculaire	63
4.5 Prédiction Des Propriétés Moléculaires Des Ligands.....	63
5- Résultats Et Discussion	63
5-1 Résultats Du Docking Moléculaire.....	63
5.1.1 Étude Des Interactions Enzyme-Ligand De Référence	65
5.1.2 Étude Des Interactions Enzyme- Les Ligands.....	66
6. Résultats Des Propriétés Moléculaires (Drug likeness)	82
6.1. Composés "Drug-Like".....	82
6.2. Application De La Règle De Cinq (Règle De Lipinski).....	83
6.3. Application de la Règle de Veber	85

Références Bibliographique	87
Conclusion Général	89

Liste des figures

CHAPITRE I

Figure I. 1 Structure générale des récepteurs nucléaires	8
Figure I. 2 Mode d'activation de FXR	14
Figure I. 3 Structure de la protéine FXR - Sites de modifications post-traductionnelles). 15	
Figure I. 4 Rôles principaux de FXR	17
Figure I. 5 Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires	21
Figure I. 6 Régulation par FXR de la transition jeûne-réalimentation avec un régime riche en sucres.....	23

CHAPITRE II

Figure II. 1 Représentation schématique du Docking moléculaire	38
Figure II. 2 comparaison des programmes de Docking les plus cités.....	40
Figure II. 3 De haut en bas : distribution des électrons dans des	41
Figure II. 4 les types d'interactions.....	42
Figure II. 5 Protocol general de Docking	47

CHAPITRE III

Figure III. 1 Protocole générale de docking moléculaire.....	51
Figure III. 2 montre l'enzyme utilisé sur le site Web Protein Data Bank	52
Figure III. 3 Structure 3D de l'enzyme 3OMM simplifié	54
Figure III. 4 Structure chimique de OMM.....	54
Figure III. 5 Cavité 1 (Pocket) de l'enzyme 3OMM.....	55
Figure III. 6 Interactions entre le ligand de reference et les résidus de site actif de 3OMM	66
Figure III. 7 Interactions entre le ligand 38 et les résidus de site actif de 3OMM.....	70
Figure III. 8 Interactions entre le ligand 54 et les résidus de site actif de 3OMM.....	72
Figure III. 9 Interactions entre le ligand 51 et les résidus de site actif de 3OMM.....	73
Figure III. 10 Interactions entre le ligand 4 et les résidus de site actif de 3OMM.....	75
Figure III. 11 Interactions entre le ligand 7 et les résidus de site actif de 3OMM.....	76
Figure III. 12 Interactions entre le ligand 50 et les résidus de site actif de 3OMM.....	78
Figure III. 13 les interactions des ligands que forment des complexes moins stables	79

Liste des tableaux

CHPITRE I

Tableau I. 1 Classification phylogénétique des récepteurs nucléaires.....	6
---	---

CHPITRE III

Tableau III. 1 Propriétés de la première cavité (site actif) de l'enzyme 3OMM	55
Tableau III. 2 Structures chimiques des composés	56
Tableau III. 3 Résultats de SCORE de Récepteur 3 OMM avec les ligands étudiés	63
Tableau III. 4 les interactions entre les résidus du site actif et les atomes des ligands pour 3OMM.....	67
Tableau III. 6 Résultats d'application de la Règle de Lipinski	83
Tableau III. 7 Résultats de l'application de la Règle Veber	85

Abréviations

AA	Acide Aminée
ABs	Acides Biliaires
ADN	Acide désoxyribonucléique
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
CARM1	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1
ChREBP	Carbohydrate Response Element Binding Protein
DBD	DNA Binding Domain
FAS	Fatty Acid Synthase
FXR	Farnesoid X Receptor
IC50	Concentration Inhibitrice Médiane
LBD	Ligand Binding Domain
LPK	Liver Pyruvate Kinase
L_{ref}	ligand de référence
Marvin	est un éditeur chimique
Sketch	
MAFG	v-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog G
MIT	mitochondrie
MOE	Molecular Operating Environment
PDB	Banque de Donnée Protéique (Protein Data Bank)
QSAR	Relation Structure- Activité Quantitative
RMN	Résonance Magnétique Nucléair
RNs	Récepteurs Nucléaires
RX	Rayons X
RXR	Récepteur Aux Acides Rétinoïques

SRC Steroid receptor coactivator
VDR vitamin D receptor
UGT2B4 Uridine Glucuronosyl-Transférase 2B4
3D 3-Dimension

Introduction Générale

Le récepteur farnésioïde X (FXR) est un récepteur nucléaire exprimé dans le foie, la vésicule biliaire, l'intestin, les reins et les glandes surrénales. Il régule des rôles physiologiques importants dans diverses voies métaboliques impliquées dans l'homéostasie des acides biliaires, des triglycérides et du glucose. Aujourd'hui, FXR est devenu une cible attrayante pour le traitement d'un large éventail de maladies métaboliques, notamment le diabète, la cholestase, la fibrose hépatique et les maladies inflammatoires de l'intestin. [1-3]

De grands efforts ont été faits pour rechercher des modulateurs FXR pour le développement de médicaments. À ce jour, une variété de composés a été identifiée comme étant capables d'activer puissamment le FXR, notamment le 6ECDCA [4], le MFA-1 [5], le GW4064 [6], la fexaramine [7], le XL335 [8]. Et l'ivermectine, un médicament antiparasitaire. [9]. Cependant, plusieurs agonistes FXR non stéroïdiens, tels que GW4064, ont révélé des effets hors cible et une faible biodisponibilité.

Afin de résoudre ces problèmes, Merck et ses collaborateurs ont développé un ensemble diversifié de dérivés de l'acide anthranilique (AAD) avec une puissante activation de FXR [10].

La modélisation moléculaire est le terme générique regroupant les méthodes qui permettent de simuler le comportement d'un système de particules. La taille du système étudié peut aller d'une simple molécule diatomique jusqu'à des macromolécules biologiques de plusieurs dizaines de milliers d'atomes [11].

Dans la mise au point de nouveaux médicaments, l'amarrage (Docking) sert souvent à déterminer l'orientation des petites molécules liées à leurs protéines ciblées afin de calculer leurs affinité et niveau d'activité. Ainsi, l'amarrage joue un rôle important dans la conception pensée de nouveaux médicaments. En raison de sa valeur biologique et pharmaceutique, on s'est efforcé d'améliorer les méthodes qui calculent l'amarrage moléculaire [12].

Notre objectif de travail est d'étudier les interactions existantes entre une série des molécules avec l'enzyme FXR en combinant entre deux méthodes à savoir ; Docking moléculaire, et propriétés drug likeness

Le travail de ce mémoire est présenté en trois chapitres

- Le Chapitre 1 présente un rappel sur les récepteurs Nucléaire et particulièrement le FXR
- Le Chapitre 2 expose quelques notions fondamentales sur le Docking moléculaire.
- Le Chapitre 3, présente les résultats de notre étude pratique. On montre plus particulièrement les interactions entre les différents inhibiteurs avec l'enzyme (3OMM) par la méthode du Docking moléculaire en utilisant le logiciel MOE.
Après, on montre comment nous avons sélectionné les deux meilleurs activateurs.
- Enfin, nous présentons une conclusion générale dont laquelle nous synthétisons le travail réalisé ainsi que nos perspectives

Références Bibliographique

- [1] Düfer, M.; Hörth, K.; Wagner, R.; Schittenhelm, B.; Prowald, S.; Wagner, T.F.J.; Oberwinkler, J.; Lukowski, R.; Gonzalez, F.J.; Krippeit-Drews, P.; et al. Bile acids acutely stimulate insulin secretion of mouse-cells via farnesoid X receptor activation and KATP channel inhibition. *Diabetes* **2012**, *6*, 1479–1489. [CrossRef] [PubMed]
- [2] Nijmeijer, R.M.; Gadaleta, R.M.; van Mil, S.W.C.; van Bodegraven, A.A.; Crusius, J.B.; Dijkstra, G.; Hommes, D.W.; de Jong, D.J.; Stokkers, P.C.F.; Verspaget, H.W.; et al. Farnesoid X receptor (FXR) activation and FXR genetic variation in inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* **2011**, *8*, e23745. [CrossRef] [PubMed]
- [3] Hollman, D.A.A.; Milona, A.; van Erpecum, K.J.; van Mil, S.W.C. Anti-inflammatory and metabolic actions of FXR: Insights into molecular mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *11*, 1443–1452. [CrossRef] [PubMed]
- [4] Pellicciari R., Fiorucci S., Camaioni E., Clerici C., Costantino G., Maloney P.R. et al. (2002) 6 α -Ethyl-Chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem*; *45*: 3569-3572.
- [5] Soisson S.M., Parthasarathy G., Adams A.D., Sahoo S., Sitlani A., Sparrow C. et al. (2008) Identification of a potent synthetic FXR agonist with an unexpected mode of binding and activation. *P Natl Acad Sci Usa*; *105*: 5337-5342.
- [6] Maloney P.R., Parks D.J., Haffner C.D., Fivush A.M., Chandra G., Plunket K.D. et al. (2000) Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*; *43*: 2971-2974
- [7] Downes M., Verdecia M.A., Roecker A.J., Hughes R., Hogenesch J.B., Kast-woelbern H.R. et al. (2003) This article is protected by copyright. All rights reserved. A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell*; *11*: 1079-1092.
- [8] Flatt B., Martin R., Wang T., Mahaney P., Murphy B., Gu X. et al. (2009) Discovery of XL335 (WAY-362450), a highly potent, selective, and orally active agonist of the Farnesoid X Receptor (FXR). *J Med Chem*; *52*: 904-907.

- [9] Jin L., Feng X., Rong H., Pan Z., Inaba Y., Qiu L. et al. (2013) The antiparasitic drug ivermectin is a novel FXR ligand that regulates metabolism. *Nature communications*; 4: 1937.
- [10] Merk, D.; Lamers, C.; Ahmad, K.; Carrasco Gomez, R.; Schneider, G.; Steinhilber, D.; Schubert-Zsilavecz, M. Extending the Structure-Activity Relationship of Anthranilic Acid Derivatives as Farnesoid X Receptor Modulators: Development of a Highly Potent Partial Farnesoid X Receptor Agonist. *J Med Chem* **2014**, 57 (19), 8035–8055.
- [11] . *Modelling in Molecular Biology*; Ciobanu, G., Rozenberg, G., Eds.; Natural Computing Series; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2004.
- [12] Tovchigrechko, A.; Wells, C. A.; Vakser, I. A. Docking of Protein Models. *Protein Sci* **2002**, 11 (8), 1888–1896. <https://doi.org/10.1110/ps.4730102>

Chapitre I :

LES RECEPTEURS

NUCLEAIRES

1. Introduction

Les RNs (Récepteurs Nucléaires) sont des facteurs de transcription intracellulaires qui entrent en jeu dans la régulation de l'expression génique. Ils se fixent sur des régions au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles, recrutent des co-facteurs et régulent leur expression. Ils sont impliqués dans la régulation de très nombreuses fonctions métaboliques : métabolisme des acides gras, de la reproduction, du glucose, de la détoxification, du processus inflammatoire. Beaucoup de RNs ont une activité liée à la fixation d'un ligand, d'origine endogène ou exogène [1]. La fixation du ligand n'est pas l'unique voie de modulation de leur activité. En effet, des modifications post-traductionnelles vont également modifier leur activité [2]. Il existe néanmoins un grand nombre de RNs pour lesquels aucun ligand n'a été identifié ; ces récepteurs sont appelés les récepteurs orphelins [3]. A l'heure actuelle, la superfamille des RNs compte 49 membres dont encore la moitié n'a pas de ligand clairement identifié. La régulation des RNs par un ligand et la possibilité de cibler un récepteur grâce à un ligand spécifique revêt une importance cruciale dans la modulation de son activité d'un point de vue thérapeutique.

2. Classification Des Récepteurs Nucléaires

2.1. Classification De Mangelsdorf

Une autre classification a permis de classer les récepteurs nucléaires en 4 classes [4]. En plus de l'alignement des séquences du LBD et du DBD, cette classification prend en plus en compte les propriétés de dimérisation des récepteurs nucléaires

La classe I est typiquement la classe des récepteurs aux stéroïdes capables de s'homodimériser et dont le chef de file est le récepteur aux glucocorticoïdes (GR). On y retrouve également les récepteurs au minéralocorticoïde (MR), à la progestérone (PR), aux androgènes (AR) et à l'œstrogène (ER).

La classe II est caractérisée par la capacité des récepteurs nucléaires à se fixer sous forme hétérodimérique avec le récepteur aux acides rétinoïques (RXR). On retrouve entre autres dans cette classe le récepteur aux vitamines D (VDR), aux acides trans-rétinoïques (RARs), aux proliférateurs des peroxyosomes (PPARs) et au farnésoïde (FXR). La troisième classe

Chapitre I : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

se compose des récepteurs nucléaires orphelins (dont les ligands ne sont pas encore connus) s'associant en homodimères (p.e. RXR, COUP, HNF4 et TR2)

2.2. Classification Phylogénétique

Au vu du nombre croissant des études identifiant des nouveaux récepteurs nucléaires et pour faciliter leur identification à un niveau mondial, le Comité de Nomenclature des Récepteurs Nucléaires a proposé en 1999 une nouvelle nomenclature officielle avec 6 classes de récepteurs nucléaires [5]. Ce système de classification est basé sur l'évolution des deux domaines fortement conservés des récepteurs nucléaires, le domaine de fixation à l'ADN et le domaine de liaison au ligand (Tableau I. 1)

Tableau I. 1 Classification phylogénétique des récepteurs nucléaires.

	Nom	Abréviation	Nomenclature
Classe I	Thyroid Hormone Receptor	TR α	NR1A1
		TR β	NR1A2
	Retinoic Acid Receptor	RAR α	NR1B1
		RAR β	NR1B2
		RAR γ	NR1B3
	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor	PPAR α	NR1C1
		PPAR β	NR1C2
		PPAR γ	NR1C3
	Reverse erba	Rev-erb α	NR1D1
		Rev-erb β	NR1D2
	RAR-Related Orphan Receptor	ROR α	NR1F1
		ROR β	NR1F2
		ROR γ	NR1F3
	Liver X Receptor	LXR α	NR1H3
	LXR β	NR1H2	
Farnesoid X Receptor	FXR α	NR1H4	
	FXR β	NR1H5	
Vitamin D Receptor	VDR	NR1I1	
Pregnane X Receptor	PXR	NR1I2	
Constitutive Androstane Receptor	CAR	NR1I3	
Human Nuclear Factor 4	HNF4 α	NR2A1	
	HNF4 γ	NR2A2	
Classe II	Retinoid X Factor	RXR α	NR2B1
		RXR β	NR2B2
		RXR γ	NR2B3
	Testis Receptor	TR2	NR2C1
		TR4	NR2C2
	Talless	TLL	NR2E2
	Photoreceptor-specific Nuclear Receptor	PNR	NR2E3
	Chicken Ovoalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor	COUP-TF1	NR2F1
		COUP-TFII	NR2F2
	ErbA2-Related-Gene-2	EAR2	NR2F6
Classe III	Oestrogen Receptor	ER α	NR3A1
		ER β	NR3A2
	Oestrogen Receptor-Related Receptor	ERR α	NR3B1
		ERR β	NR3B2
		ERR γ	NR3B3
	Glucocorticoid Receptor	GR	NR3C1
Mineralocorticoid Receptor	MR	NR3C2	
Progesteron Receptor	PR	NR3C3	
Androgen Receptor	AR	NR3C4	
Classe IV	NGF-Induced Factor B	NGFIB	NR4A1
	Nur-Related Factor 1	NURR1	NR4A2
Classe V	Neuron-Derived Orphan Receptor 1	NOR1	NR4A3
	Steroidogenic Factor 1	SF1	NR5A1
Classe VI	Liver Receptor Homologous Protein 1	LRH-1	NR5A2
	Germ Cell Nuclear Factor	GCNF	NR6A1
	DSS-AHC critical region on the chromosome, gene 1	DAX1	NR0B1
	Short Heterodimeric Partner	SHP	NR0B2

2.3. Classification Physiologique

Récemment, une autre classification a proposé de classer les récepteurs nucléaires en fonction de leur rôle dans l'organisme [6]. Cette classification relie les expressions tissulaires des récepteurs nucléaires à des fonctions dans l'organisme. Elle a pour avantage, par rapport à la classification phylogénétique, de donner une vision moins artificielle et plus intégrée de la diversité des récepteurs nucléaires. En utilisant des approches de transcriptomique des 49 récepteurs nucléaires dans 39 tissus différents de souris C57BL6, Bookout et al. ont réussi à classer en 2 clusters différents les récepteurs nucléaires selon leur rôle dans l'organisme ; chaque cluster étant constitué de 3 sous-clusters.

Le cluster I correspond aux récepteurs nucléaires impliqués dans les processus de stéroïdogénèse (sous-cluster IA, p.e. DAX-1, SF-1, FXR β), de reproduction et de développement (sous-cluster IB ; p.e. ERs, RARs, COUP-TF β , AR, PR) et les processus liés à la fois au système nerveux central, à l'horloge biologique et aux fonctions métaboliques basales (sous-cluster IC ; p.e. LXR β , NOR-1, NGF1-B, ERR β , REV-ERB α et β , NURR1...). Il correspond surtout aux récepteurs nucléaires exprimés dans les tissus nerveux et reproducteurs.

Contrairement au cluster I, le cluster II est exprimé préférentiellement dans les tissus de l'axe gastroentérohépatique et dans les tissus métaboliques tels que le muscle et le tissu adipeux [7]. Le cluster II regroupe tous les récepteurs nucléaires intervenant dans la régulation des différents métabolismes. Les récepteurs nucléaires du sous-cluster IIA constituent une famille de récepteurs nucléaires clés dans la régulation transcriptionnelle de l'assimilation des nutriments. En effet, dans ce sous-cluster on retrouve les récepteurs nucléaires régulateurs du métabolisme des acides biliaires et des xénobiotiques [8]. Ils interviennent également dans le maintien d'une barrière efficace des organes du tractus entérohépatique exposés aux nutriments [9]. On retrouve dans le sous-cluster IIA des récepteurs nucléaires tels que CAR, PXR, HNF4 α et γ , SHP, ROR γ , LRH-1, VDR et FXR α . Les récepteurs nucléaires du sous cluster IIB fonctionnent comme des régulateurs de l'utilisation de l'énergie apportée par les lipides alimentaires mais aussi comme régulateur de la dépense énergétique. On retrouve entre autres dans cette famille les récepteurs COUP-TF γ , ERR α , RXR α , PPAR α et δ . Enfin le troisième sous-cluster (sous-cluster IIC), constitué de seulement PPAR γ , LXR α et GR, est le sous-cluster des récepteurs nucléaires régulateurs

Chapitre I : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

d'aspects spécifiques de l'utilisation énergétique tels que le stockage lipidique, le métabolisme du cholestérol et le métabolisme du glucose [10].

3. Structure Des Récepteurs Nucléaires

Les membres de la famille des récepteurs nucléaires présentent une structure similaire avec des régions communes (**Figure I. 1**)

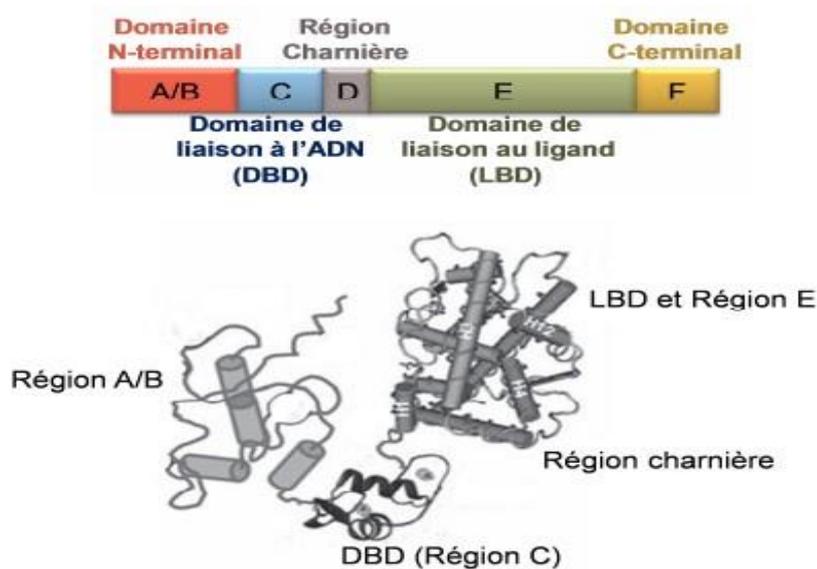


Figure I. 1 Structure générale des récepteurs nucléaires

Au niveau structural, il existe une conservation assez importante entre les différents RNs. Ils sont généralement constitués d'un domaine AF-1 (Activation Function 1), qui est le domaine le moins conservé entre les différents RNs (<15%). Ce domaine peut fixer des co-régulateurs de manière ligand indépendante [11 ; 12]. Le domaine AF-1 est relié au domaine de fixation à l'ADN, le domaine DBD (DNA Binding Domain), qui est très conservé [13]. Il existe ensuite une région charnière, dont les propriétés fonctionnelles sont peu connues. Cette région peut néanmoins être phosphorylée, ce qui induit une augmentation de l'activité transcriptionnelle [14]. Cette région charnière relie le DBD précédemment cité au LBD (Ligand Binding Domain). Le LBD est un domaine relativement conservé entre les RNs. Il est, comme son nom l'indique, le domaine de fixation du ligand. On trouve dans le LBD la

Chapitre I : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

région AF-2 (Activation Function 2) qui permet, suite à la fixation du ligand, le recrutement de différents co-activateurs [13]. La région la moins bien décrite se situe entre le domaine Nterminal et la région AF-1 ; elle pourrait jouer un rôle dans la modulation de l'activité transcriptionnelle [14]. Cette région pourrait également être soumise à des modifications posttraductionnelles et moduler l'activité du RN [15 ,16].

3.1. La Region A/B

Cette région est très peu conservée entre les récepteurs nucléaires. Dans cette région se localise un site responsable de l'activation de la transcription (AF-1) qui contribue à l'activation du récepteur indépendamment de la présence d'un ligand. De plus, ce domaine est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles et est important pour l'interaction avec des coactivateurs [17].

3.2. Le Domaine De Liaison A L'adn (DBD) (Région C)

Cette région est la plus conservée et confère aux récepteurs nucléaires la capacité de reconnaître des séquences cibles spécifiques sur le promoteur de leurs gènes cibles. Les récepteurs nucléaires se fixent sur des séquences spécifiques dans l'ADN appelé éléments de réponse aux hormones (HRE, Hormone Réponse Élément). Ces éléments contiennent des répétitions directes (DR, Direct Repeat) ou inversées (IR, Inverse Repeat) d'un ou deux demi-sites séparés par plusieurs nucléotides (entre 0 et 7) (Glass, 1994 Le DBD consiste en une séquence de 66 acides aminés qui comportent deux motifs « doigts de zinc » riches en cystéine, deux hélices ainsi qu'une extension terminale –COOH. Dans cette extension, se localisent aussi d'autres séquences nécessaires à la fonction de ce domaine telles que la boîte P, localisée à la base du premier « doigt de zinc », qui détermine la spécificité de la séquence reconnue par le récepteur nucléaire, ainsi que la boîte D, localisée au niveau du deuxième « doigt de zinc », impliquée dans la dimérisation et la reconnaissance de l'espacement entre les demi-sites [18].

3.3. La Region Charniere (D)

Cette région est très peu conservée entre les récepteurs nucléaires. Elle sert de connexion entre le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand et permet la rotation du DBD pour permettre au récepteur nucléaire de reconnaître la séquence spécifique où il se

Chapitre I : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

fixe (Glass, 1994). Cette région peut contenir des signaux pour la localisation nucléaire des récepteurs et a été impliquée dans l'interaction avec les co-répresseurs. [19]

3.4. Le Domaine De Liaison Au Ligand (LBD) (Region E)

Le LBD est constituée de 11 à 13 hélices α et d'un feuillet β organisés dans 3 couches antiparallèles et qui abritent la poche de liaison au ligand (Ligand Binding Pocket) des récepteurs nucléaires, la région nécessaire pour l'interaction avec les ligands. Dans ce domaine se trouve aussi l'interface de dimérisation, qui permet l'interaction avec les LBDs d'autres protéines. De plus, les corégulateurs qui modulent l'activité transcriptionnelle se fixent sur une surface présente dans ce domaine. Enfin, cette région contient le deuxième domaine d'activation transcriptionnelle (AF-2). Ce domaine de transactivation est dépendant de la présence du ligand du récepteur [20].

4. Mode D'activation Des Récepteurs Nucléaires

En absence de ligand, le domaine de fixation au ligand de la plupart des récepteurs nucléaires interagit avec des co-répresseurs de la transcription, tels que N-CoR1 (Nuclear Receptor Corepressor 1) et SMRT (Silencing Mediator of Retinoic Acid and Thyroid Hormone Receptor), initialement identifiés dans le complexe réprimant les récepteurs Retinoic Acid Receptor (RAR) et Thyroid Receptor (TR) en absence de leurs ligands [19]. Ces co-répresseurs recrutent des complexes contenant notamment des histones désacétylases (HDAC) qui, en désacétylant les histones, entraînent une condensation de la chromatine du promoteur du gène régulé et ainsi l'inhibition de la transcription de ce dernier [21]. L'interaction du récepteur avec son ligand provoque la dissociation du complexe corépresseur et le recrutement de coactivateurs de la transcription permettant la transcription du gène [22, 23].

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée plus particulièrement au récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor (FXR).

5. Le Recepteur Nucleaire Farnesoid X Receptor (FXR)

5.1. Généralités

Le Farnesoid X Receptor (FXR ; NR1H4) est un membre de la superfamille des RNs, il est également appelé le récepteur des acides biliaires [24] ; [25]. Il a été identifié pour la première fois en 1995 comme un RN orphelin chez la souris [26] et chez le rat [27]. Dans les premiers travaux effectués sur FXR, une molécule a été identifiée comme étant un ligand de FXR chez le rat : le farnesol, ce qui va lui donner son nom : Farnesoid X Récepteur [27]. Plus tard, il a été observé que les acides biliaires sont des ligands de FXR ; il sera alors renommé récepteur aux acides biliaires (BAR) [28, 29]. Depuis, plus de 80 composés ont été identifiés comme ligands (naturels ou synthétiques) potentiels de FXR avec des affinités plus ou moins importantes.

5.2. Découverte Et Expression Tissulaire De FXR

Le récepteur nucléaire Farnesoid X Receptor (FXR) a été identifié chez la souris comme une protéine interagissant avec le récepteur nucléaire RXR et de ce fait a été nommé RIP14 (RXR Interacting Protein 14) [30]. Par la suite, [27] ont identifié l'homologue de cette protéine chez le rat. Dans cette espèce, FXR interagit également avec RXR pour former un hétéro dimère qui peut se fixer sur l'ADN au niveau de l'élément de réponse à l'ecdysone, une hormone stéroïde présente notamment chez les arthropodes, qui comprend deux sites répétés inversés séparés par un nucléotide (IR-1). De plus, les auteurs ont montré que FXR était activé par un métabolite intermédiaire de la voie du mévalonate appelé Farnesol, d'où son nom, Farnesoid X Receptor.

Chez l'Homme et chez la souris, il existe 2 gènes qui codent pour FXR : FXR α (NR1H4) et FXR β (NR1H5) [31]. FXR α code pour 4 isoformes différentes : $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 4$ qui résultent de 2 promoteurs différents, ainsi que d'un épissage alternatif au niveau de l'exon 5. Les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont caractérisées par l'insertion de 4 résidus MYTG dans la région charnière [32]. Ces 4 isoformes sont exprimées différemment en fonction des tissus. FXR β est un pseudo-gène chez les primates et chez l'homme, mais il est un senseur des lanostérols chez les rongeurs [33]. Le récepteur FXR est exprimé dans plusieurs tissus chez l'homme et la souris, notamment dans le foie, l'intestin, les reins, les glandes surrénales [31], le tissu adipeux [34] et le pancréas [35, 36].

5.3. Ligands Et Modulateurs De L'activité De FXR

- **Les Ligands Naturels De FXR**

A- Les Acides Biliaires Agonistes De FXR

L'affinité des différents acides biliaires pour FXR (CDCA>DCA>T-LCA>CA) diffère de celle de TGR5 (LCA>DCA>>CDCA=CA) (pour revue : [37]). De plus, des études de transfection de plasmides contenant des séquences codantes de FXRE ont permis de montrer que CDCA est le meilleur agoniste de FXR (FXRE murin : EC50 = 50 µM, FXRE humain: EC50 = 10 µM) et que les DCA et LCA sont aussi à un niveau moindre des agonistes de FXR [38]. De plus, une étude montre que le LCA peut aussi avoir des activités antagonistes de FXR in vitro [39].

B. Les Acides Biliaires Antagonistes De FXR

Pendant longtemps les acides biliaires furent considérés uniquement comme des agonistes de FXR. Toutefois, de plus en plus d'études montrent que certaines espèces d'acides biliaires sont des antagonistes de FXR. Hormis le LCA, d'autres acides biliaires récemment identifiés comme des acides biliaires primaires chez la souris, les acides tauro- α muricholiques (T- α MCA), tauro- β muricholiques (T- β MCA) et l'acide ursodéoxycholique, diminuent l'expression de gènes cibles de FXR tels que IBABP, FGF15, SHP et Ost β [40] ; [41, 42]. Toutefois seul l'UDCA est retrouvé chez l'Homme où le CA est rapidement métabolisé en CDCA au lieu de MCA. L'UDCA, récemment identifié comme antagonistes de FXR [43], est chez l'Homme utilisé pour soigner les maladies du foie gras non alcooliques (NAFLD).

C. Les Substances Naturelles Antagonistes De FXR

La guggulstérone est un extrait naturel de la résine de l'arbre guggul initialement identifié comme un antagoniste de FXR [44]. Toutefois, des études ultérieures ont montré que le guggulstérone était plutôt un agoniste partiel de FXR [45]. Il est aussi connu pour activer les récepteurs nucléaires PXR, PR et SR dans les cellules HepG2 [46]. C'est également un antagoniste des récepteurs à l'androgène, aux glucocorticoïdes et au minéralocorticoïdes [47].

5.4. Ligands Synthétiques

Etant donné la faible spécificité des ligands naturels de FXR, il était nécessaire de développer des molécules synthétiques avec une sélectivité et une affinité plus importante pour FXR. Ainsi, plusieurs études ont permis le développement de ligands synthétiques de FXR. Le plus utilisée d'entre eux est le GW4064 [3-(2,6-dichlorophenyl)-4-(3'-carboxy-2-chloro-stilben-4-yl)-oxymethyl-8-isopropyl-isoxazole] qui a un EC₅₀ de 90nM [48]. Ce ligand a été longtemps utilisé pour son efficacité et sa spécificité pour FXR, cependant une étude récente montre que le GW4064 pourrait également activer le récepteur ERR α (Estrogène receptor-related réceptora) [49]. D'autres ligands ont été également synthétisés, tels que l'AGN31 et l'AGN29 [49]. Ces ligands sont très efficaces avec un EC₅₀ d'environ 1 μ M et ont la particularité d'activer les deux unités de l'hétérodimère FXR-RXR. En 2002, un dérivé des acides biliaires, le 6 α -ethylchenodeoxycholic acid (6E-CDCA), a été également développé [50]. Ce composé, connu également sous le nom de INT-747, semble être un ligand très efficace de FXR avec un EC₅₀ de 99 nM. D'autres études ont mené à l'identification des dérivés des biaryl-cinnamates tels que la féraxamine et la féxarine, comme des composés hautement sélectifs et efficaces de FXR avec des EC₅₀ de 38 et 36 nM respectivement [51]. Une étude plus récente a permis le développement d'un nouveau ligand pour FXR, le WAY-362450 [52]. Ce ligand semble être très efficace (EC₅₀=4nM) et spécifique de FXR.

5.5. Mode D'activation De FXR

FXR se fixe sur le promoteur de ses gènes cibles via un élément de réponse (FXRE) en tant que hétérodimère avec RXR ou sous forme de simple monomère (Figure I. 2). Le complexe hétérodimérique est souvent associé avec l'activation des gènes, tandis que la forme monomérique provoquerait plutôt la répression des gènes. Le FXRE est composé de deux répétitions inversées de la séquence consensus AGGTCA séparés d'un nucléotide (IR-1). De plus, FXR peut se fixer *in vitro* à des IR-0 (pas de nucléotide séparant les deux séquences consensus), mais aussi à des DR (des séquences répétées directes) [53] et à des séquences simples comme le site C du promoteur du gène de l'ApoAI [54].

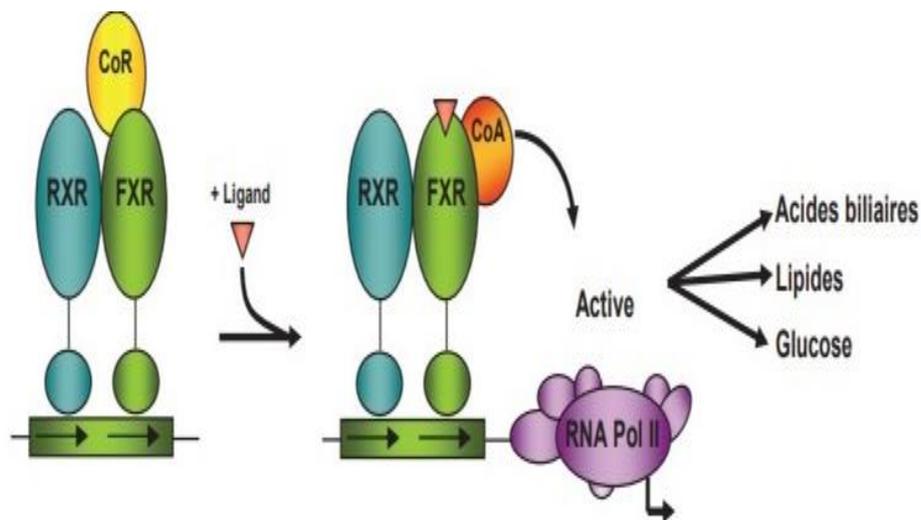


Figure I. 2 Mode d'activation de FXR

Le récepteur nucléaire FXR est activé par des ligands naturels ou synthétiques. Lorsqu'il est activé, il peut se fixer sous forme d'hétérodimère avec RXR sur un élément de réponse (FXRE, FXR response élément) présent sur le promoteur de ses gènes cibles composé de deux séquences inversées ou sous forme de monomère sur des FXRE atypiques.

Comme pour les autres récepteurs nucléaires, l'activation des récepteurs nucléaires par les ligands entraîne la dissociation des co-répresseurs et permet ainsi aux coactivateurs d'interagir avec les récepteurs nucléaires pour induire la transcription des gènes. Au cours des dernières années, plusieurs coactivateurs qui interagissent avec FXR ont été identifiés. Il a été montré que l'activation de FXR par le CDCA permet l'interaction entre FXR et SRC-1 (Steroid receptor coactivator), un coactivateur de la transcription de la famille des protéines p160 [55-57]. FXR interagit aussi avec le coactivateur PRMT1 (Protein arginine methyltransferase) après son activation par le 6E-CDCA [58] et avec le coactivateur CARM1 (Coactivator-associated arginine methyltransferase 1)

[59] dans la lignée hépatocytaire humaine HepG2. Ces coactivateurs possèdent une activité arginine-méthyl transférase. Ainsi, lorsqu'ils interagissent avec FXR, une augmentation de la méthylation des arginines de l'histone H4 est observée au niveau du promoteur de leurs gènes cibles. Cette méthylation serait nécessaire pour augmenter l'activation de la transcription des gènes. PGC-1 α est un autre coactivateur qui interagit avec FXR, de façon ligand dépendante, pour induire son activité transcriptionnelle [60]. Cette interaction pourrait avoir lieu au niveau du DBD de FXR [61] ou du LBD [62-64] de FXR. En outre,

Chapitre I : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

PGC-1 α induit l'expression de FXR en tant que coactivateur de PPAR γ et de HNF4 α [65]. Le coactivateur GPS2 (G protein Pathway Suppressor) interagit aussi avec FXR et cette interaction est augmentée lorsque FXR est activé par son ligand, le GW4064. Dans cette étude, il a été montré que l'inhibition de GPS2 diminue fortement l'induction du gène CYP8B1 par FXR [63]. DRIP205 (vitamin D receptor (VDR) interacting protein) [66] et TRRAP (Thyroid Hormone Receptor Associated Protein) [67] sont aussi des coactivateurs de FXR qui interagissent avec FXR de façon dépendante du ligand et ont été identifiés grâce à des études d'interaction in vitro et des transfections transitoires dans les cellules HepG2. Des études récentes ont permis de montrer que Brg-1, une ATPase dans les complexes Swi/Snf, était un nouveau coactivateur de FXR in vivo et dans les cellules HepG2. Brg-1 est recruté sur le promoteur de SHP suite à l'activation de FXR par son ligand et provoque l'ouverture de la chromatine permettant ainsi une meilleure transcription du gène [68].

5.6. Régulation Post-Traductionnelle De FXR

Plusieurs études ont montré que FXR pouvait subir des modifications post traductionnelles tels que la phosphorylation, l'acétylation, la sumoylation et l'ubiquitinylation. L'activité transcriptionnelle de FXR est régulée à travers ces modifications (Figure I. 3).

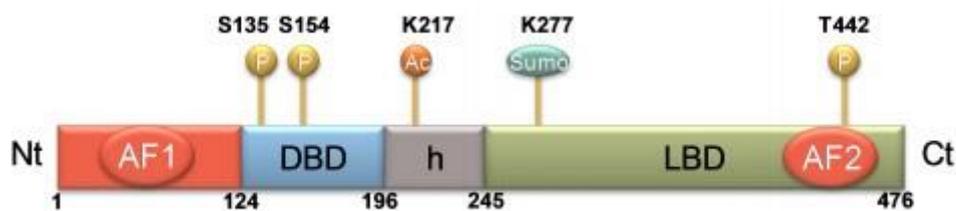


Figure I. 3 Structure de la protéine FXR - Sites de modifications post-traductionnelles)

5.6.1. Phosphorylation De FXR

Deux équipes ont mis en évidence la phosphorylation de FXR. Ainsi, Gineste et al. [69] ont montré que l'activité transcriptionnelle de FXR nécessitait l'activation de la protéine kinase C (PKC) dépendante du calcium. Cette kinase phosphoryle FXR in vitro au niveau

de son domaine de fixation à l'ADN (sérines 135 et 154). De plus, une deuxième étude montre que FXR est aussi phosphorylé, dans un modèle cellulaire, par la PKC zêta (PKC ζ) en réponse à surexpression de FIC1 (familial intrahepatic cholestasis 1), protéine dont la mutation est impliquée dans le développement de la cholestase intrahépatique [70]. Cette phosphorylation a lieu sur la Thr422 et augmente l'activité transcriptionnelle de FXR, ainsi que sa localisation nucléaire.

5.6.2. Acétylation De FXR

L'acétylation de FXR a été mise en évidence *in vitro* et dans la lignée HepG2 par Fang et al. [71]. Les auteurs montrent que l'acétylase p300 interagit avec FXR, l'acétyle et permet ainsi l'activation de la transcription de son gène cible, SHP. En revanche, dans une deuxième étude, il a été montré que l'activité transcriptionnelle de FXR est dépendante d'une régulation dynamique de l'acétylation par l'acétylase p300 et la désacétylase SIRT1. Ainsi, en présence des ligands de FXR, p300 interagit avec FXR et l'acétyle sur la Lys217 inhibant ainsi son hétérodimérisation avec RXR. Cependant, p300 active l'acétylation des histones ce qui permet la transcription du gène cible de FXR, SHP [72]. En absence de ligands de FXR, SIRT1 désacétyle FXR ce qui provoque son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome ou sa fixation sur le promoteur de SHP. En outre, SIRT1 désacétyle les histones inhibant ainsi la transcription de SHP. Les auteurs suggèrent que ce mécanisme, qui semble contradictoire, régule l'activation des gènes par FXR en réponse à ses ligands de façon dynamique en fonctions du flux des acides biliaires lors du jeûne ou d'un état postprandial.

5.6.3. Ubiquitinylation De FXR

L'ubiquitinylation est une modification post-traductionnelle permettant à des protéines ubiquitine se fixer sur les lysines des protéines cibles. Ces modifications permettent aux protéines cibles d'être reconnues par le protéasome qui se charge de les dégrader (Pour revue, [73]). Un inhibiteur spécifique du protéasome, le MG132, augmente la quantité de FXR dans la cellule suggérant que FXR pourrait être ubiquitinylé pour être dégradé par le protéasome. Il a été montré que FXR est ubiquitinylé *in vitro* et dans la lignée HepG2. Cependant les sites ubiquitinylés n'ont pas été identifiés dans la protéine FXR [72]. Cette modification serait régulée par l'acétylation de FXR puisque lorsque la désacétylase SIRT1

Chapitre I : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

est surexprimée, une désacétylation de FXR est observée, ce qui entraîne l'ubiquitinylation de la protéine et donc sa dégradation.

5.6.4. Sumoylation De FXR

La sumoylation est une modification post-traductionnelle dont le mécanisme est proche de l'ubiquitinylation et par laquelle les protéines SUMO se fixent sur les lysines acceptrices des protéines cibles [74]. Cette modification entraîne une activation ou une répression de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription sumoylé. FXR peut être sumoylé au niveau de la Lys277. Cette sumoylation est nécessaire pour permettre à FXR de stabiliser le complexe répresseur sur le promoteur des gènes des cytokines inactivant ainsi leur transcription [75]. Cependant, l'effet de la sumoylation de FXR sur l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles classiques n'a pas été étudié.

6. Rôle De FXR Dans La Régulation Du Métabolisme

Initialement impliqué dans la régulation du métabolisme des acides biliaires, FXR a également été impliqué dans le contrôle du métabolisme lipidique et glucidique dans différents tissus (Figure I. 4) Pour revue [76].

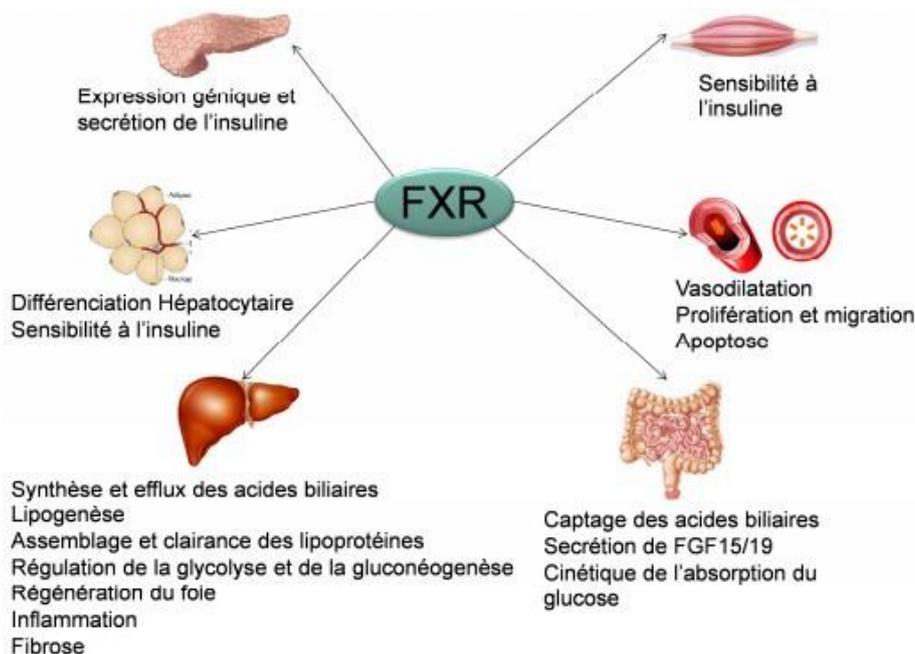


Figure I. 4 Rôles principaux de FXR

FXR régule de nombreuses voies impliquées dans la régulation du métabolisme lipidique et glucidique et de l'inflammation dans de nombreux organes.

6.1. Métabolisme Des Acides Biliaires

▪ Synthèse Et Transport Des Acides Biliaires

Les acides biliaires sont des molécules amphipatiques avec des propriétés détergentes nécessaires à leurs fonctions physiologiques. Ils sont synthétisés dans le foie à partir du cholestérol [77]. Ce processus implique 17 étapes enzymatiques dont les produits immédiats sont appelés acides biliaires primaires.

Parmi ceux-ci, on retrouve l'acide cholique (CA) et l'acide chéno désoxy cholique (CDCA) chez l'humain. L'étape d'initiation de la synthèse des acides biliaires comprend la 7 α -hydroxylation des stérols qui sont suivie par la modification des structures cycliques et l'oxydation et le raccourcissement de la chaîne latérale [77]. Les acides biliaires sont alors conjugués avec la taurine ou la glycine pour améliorer leur solubilité et sont ensuite sécrétés dans la bile grâce au transporteur BSEP (Bile salt export pump). Les acides biliaires sont stockés dans la vésicule biliaire et expulsés dans la lumière de l'intestin grêle après ingestion d'un repas gras grâce au transporteur des acides biliaires ASBT (Apical sodium-dependent bile acid transporter). Dans l'intestin, ils émulsifient et facilitent l'absorption des nutriments gras et hydrophobes. Au niveau de l'iléum, la protéine IBABP (Ileal Bile Acid Binding Protein) se charge de transporter les acides biliaires de la membrane apicale vers la membrane basolatérale des cellules épithéliales intestinales où ils sont réabsorbés dans la veine porte par le transporteur OST α/β (organic solute transporter α and β heterodimer). 5% des acides biliaires transitent dans le colon où ils sont convertis de façon passive en acides biliaires secondaires, qui peuvent encore être réabsorbés ou perdus via les fèces. Le mélange des acides biliaires primaires et secondaires absorbés retourne dans le foie via le système portal et grâce aux transporteurs NTCP (Na⁺-taurocholic acid cotransporting polypeptide) et OATP1 (organic anion transporting polypeptides) pour être sécrétés à nouveau dans la bile via le transporteur BSEP. Ce processus est appelé circulation entérohépatique des acides biliaires. La fraction des acides biliaires perdue dans les fèces est compensée par la synthèse de novo à partir du cholestérol dans le foie [78].

6.2. Rôle De FXR Dans La Synthèse, Le Transport Et La Détoxification Des Acides Biliaires

6.2.1. Régulation Du Transport Des Acides Biliaires

A partir d'une concentration de 100 μM , les acides biliaires sont toxiques pour l'organisme [79], [80]. Pour prévenir cela, l'organisme régule en permanence les flux d'acides biliaires dans des organes tels que l'intestin et le foie, organes exposés à de hautes concentrations de sels biliaires. Après un repas, l'afflux massif d'acides biliaires au niveau intestinal va activer FXR dans l'entérocyte. Cette activation diminue l'expression du transporteur apical d'acides biliaires ASBT, augmente l'expression d'IBABP et celle de l'hétérodimère $\text{Ost}\alpha/\text{Ost}\beta$ favorisant ainsi l'efflux basolatéral des acides biliaires des entérocytes tout en empêchant leur absorption luminale [81]. Au niveau hépatique, l'activation de FXR par les acides biliaires augmente l'expression de BSEP (Bile Salt Export pump, ABCB11) [82], transporteur permettant l'efflux des acides biliaires des hépatocytes vers les canalicules biliaires, et augmente l'expression des transporteurs hépatobiliaires d'anions divalents, MDR3 (ABCB4) et MRP2 (ABCC2). De plus, FXR inhibe l'expression de NTCP.

(sodium/taurocholate cotransporting polypeptide, SLC10A1) et d'OATP (Organic Anion Transporter Polypeptide-Related Protein), transporteurs majoritaires dans la recapture des acides biliaires arrivant de la veine porte. Ces différents phénomènes permettent au foie de vidanger son contenu en acides biliaires dans la période critique qu'est la prise d'un repas.

6.2.2 Régulation De La Synthèse Des Acides Biliaires

En parallèle de la régulation des transports entérohépatobiliaires, l'activation de FXR joue aussi un grand rôle dans la régulation de la synthèse des acides biliaires (Figure I. 5). Les souris déficientes en FXR ont un pool d'acides biliaires augmenté [83]. Le rétrocontrôle négatif de FXR sur la production des acides biliaires dans le foie est réalisé via un mécanisme hépatique et un mécanisme intestinal.

Au niveau du foie, l'activation de FXR diminue l'expression de la *Cyp7a1* selon un mécanisme faisant intervenir SHP et un autre faisant intervenir le facteur de transcription MAFG (*v-Maf Avian Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog G*) [84] (Figure I. 5). SHP déstabilise la fixation du facteur de transcription LRH-1 du promoteur de la *CYP7A1*. Le relargage de LRH-1, facteur de transcription essentiel à la synthèse des

acides biliaries, diminue alors la production de novo des acides biliaries. L'autre mécanisme impliquant la protéine MAFG fut mis en évidence très récemment [84]. MAFG est un facteur de transcription récemment identifié comme gène cible de FXR. MAFG, en se fixant à ses éléments de réponse MARE (Maf Recognition Element) sur le promoteur de la Cyp7a1, diminue le pool d'acides biliaries [84] (Figure I. 5). Un autre mécanisme de régulation, intestinal cette fois, fait intervenir un gène cible direct de FXR dans l'entérocyte, FGF15/19 (Fibroblast Growth Factor 15 et son orthologue humain FGF19).

En effet, FXR promeut la production de FGF15/19, qui, une fois sécrété dans la circulation portale, se fixe aux récepteurs FGFR4 à la surface des hépatocytes. Différents mécanismes interviennent alors : l'activation de FGFR4 va activer la protéine cytosolique β Klotho qui à son tour active la voie de signalisation intracellulaire Jnk kinase. Le déclenchement de cette voie a pour effet d'inhiber l'expression de Cyp7a1 [85]. Un autre mécanisme, identifié récemment, fait intervenir la phosphatase cytoplasmique SHP2 qui une fois activée va déphosphoryler et activer la PKC et la kinase Erk. Ces 2 kinases vont activer FXR qui en retour va diminuer l'expression de la Cyp7a1 et le pool des acides biliaries [86] (Figure I.5). Ainsi, via FXR, les acides biliaries régulent à la fois leur transport mais aussi leur production.

6.2.3 Rôle De FXR Dans La Circulation Entérohépatique Des Acides Biliaries

Concernant la circulation entérohépatique des acides biliaries, FXR induit l'expression génique de BSEP, qui permet la sécrétion des acides biliaries dans les canalicules biliaries [82]. En revanche, l'expression de NTCP, chargé de l'entrée dans l'hépatocyte des acides biliaries provenant de l'intestin, est inhibée par FXR. Comme pour CYP7A1, cette inhibition est dépendante de SHP qui inhibe la transactivation de NTCP par l'hétérodimère de récepteurs nucléaires RXR/RAR [87]. Ainsi, FXR diminue l'absorption des acides biliaries par le foie en inhibant NTCP et augmente l'excrétion en induisant BSEP, ce qui protège les hépatocytes d'une surcharge toxique en acides biliaries. En outre, l'expression du transporteur ASBT, nécessaire à l'entrée des acides biliaries dans les cellules intestinales, est inhibée par l'activation de SHP par FXR dans une lignée des cellules intestinales (Caco-2) [88]. De plus, dans ces cellules, l'expression génique de la protéine IBABP, qui transporte les acides biliaries dans l'entérocyte, est induite par FXR. Enfin, la sécrétion des acides biliaries de l'intestin vers la veine porte est activée par FXR via l'induction de l'expression des transporteurs OST α/β (Organic Solute Transporter) [89].

6.2. 4. Rôle De FXR Dans La Détoxification Des Acides Biliaires

La SULT2A1 (Dehydroepiandrostrone-Sulfotransferase) est une enzyme cytosolique qui catalyse la sulfatation des acides biliaires [90]. FXR induit l'expression de SULT2A1 par l'intermédiaire d'une FXRE non classique de type IR-0. Par ailleurs, l'UGT2B4 (Uridine Glucuronosyl-Transférase 2B4) est une enzyme humaine qui permet la formation de dérivés glucuronyl hydrophiles des ABs [91]. L'expression de cette enzyme est positivement régulée par FXR via un site de fixation monomérique [92]. Tenant compte que les composés sulfatés et glucuronés sont usuellement mieux solubles en milieu aqueux, l'activation de FXR pourrait ainsi réduire la toxicité des ABs en améliorant leur élimination dans la bile et/ou l'urine. En résumé, les données présentées ici suggèrent que le rôle physiologique de FXR, dans le contexte du métabolisme des acides biliaires, est de protéger la cellule de foie des effets nocifs de la surcharge des acides biliaires en diminuant la production endogène des ABs et en augmentant leur biotransformation et leur élimination.

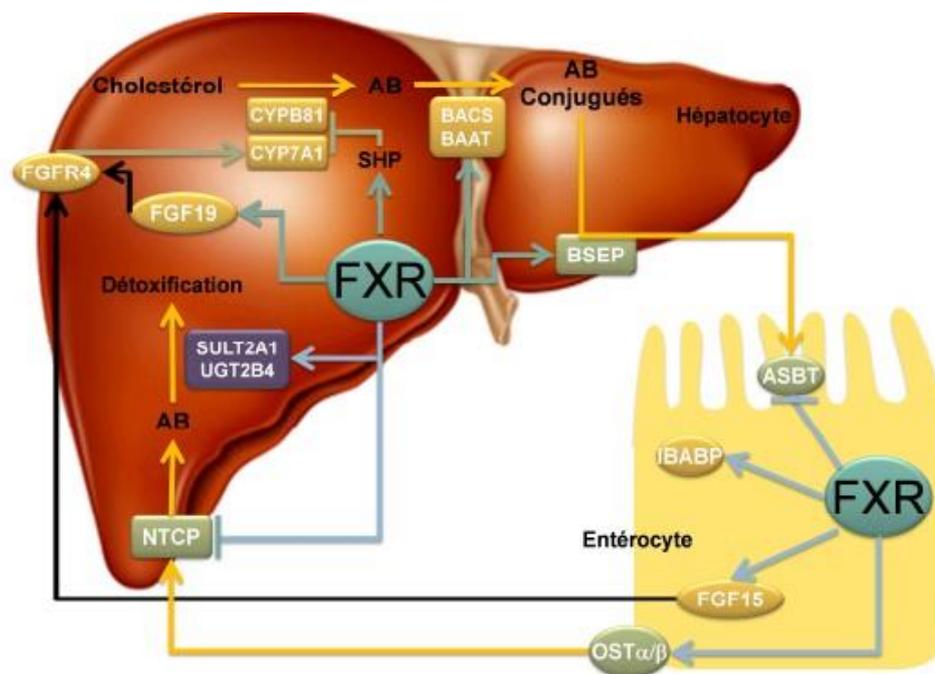


Figure 1. 5 Rôle de FXR dans le métabolisme des acides biliaires

FXR régule la synthèse et le transport des acides biliaires et de ce fait, la circulation entérohépatique des acides biliaires. Cette régulation est possible grâce à l'activation ou à l'inhibition de la transcription des gènes impliqués dans ces deux processus. AB ; Acides Biliaires ; polypeptide ; ASBT, Apical sodium-dependent bile acid transporter BACS, Bile Acid-CoA Synthase ; BAT, Bile Acid n-Acetyltransferase, BSEP ; Bile Salt Export Pump; CYP7A1, Cholestérol-7- α -Hydrolase ; CYP8B1, Cytochrome P450, Family 8, Subfamily B, Polypeptide 1; FGF19, Fibroblast Growth Factor 19 ; FGFR4, Fibroblast Growth Factor Receptor 4 ; FXR, Farnesoid X Receptor ; IBABP, Ileal Bile Acid Binding Protein ; NTCP, Na⁺-taurocholic acid cotransporting ; SHP, Small

Heterodimer Partner; SULT2A1, Hydroxysteroid Sulfotransferase, UGT2B4 ; UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4.

7. Régulation De L'homéostasie Glucidique

Le récepteur FXR intervient dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et énergétique. Son rôle dans ce contexte a été mis en évidence au niveau du foie, mais aussi dans d'autres organes comme le pancréas, le tissu adipeux et l'intestin.

L'expression génique de FXR est diminuée au niveau du foie dans des modèles murins de diabète de type I et de type II [94] et est régulée in vitro de façon positive par le glucose et négative par l'insuline. Par ailleurs, des études in vivo montrent que l'activation de FXR diminue la glycémie chez des souris diabétiques (db/db) [94]. D'ailleurs, le profil des acides biliaires est perturbé chez des patients diabétiques [95], ainsi que dans des modèles animaux de diabète comme les rats Wistar [96]. Ces études montrent qu'il existe un lien entre le métabolisme glucidique et le récepteur nucléaire FXR.

▪ Rôle De FXR Dans L'adaptation Du Foie Aux Changements Nutritionnels

Les voies d'utilisation et de production du glucose dans le foie sont régulées en réponse aux changements nutritionnels. Deux études ont montré que FXR régule la réponse de cet organe à ces changements nutritionnels. En effet, l'adaptation métabolique du foie dans un état de jeûne [97] ou, au contraire, en réponse à un régime riche en sucre [98] a été étudiée chez des souris déficientes pour FXR. Ainsi, il a été montré que la déficience en FXR chez la souris, provoque une altération dans la cinétique des changements métaboliques lors du jeûne. Ainsi, la diminution de la glycémie suite à un jeûne de 6h est accélérée chez les souris déficientes pour FXR [97]. Ce phénomène serait dû d'une part à l'inhibition de la néoglucogénèse, notamment de l'expression de l'enzyme limitante de cette voie, la PEPCK, et d'autre part, à une inhibition de la glycogénolyse, comme le montre la diminution plus importante du taux de glycogène hépatique chez les souris déficientes pour FXR. Ces résultats sont observés de façon transitoire puisque lors d'un jeûne prolongé (24h), aucune différence n'est observée dans ces paramètres entre les souris déficientes pour FXR et les souris témoins.

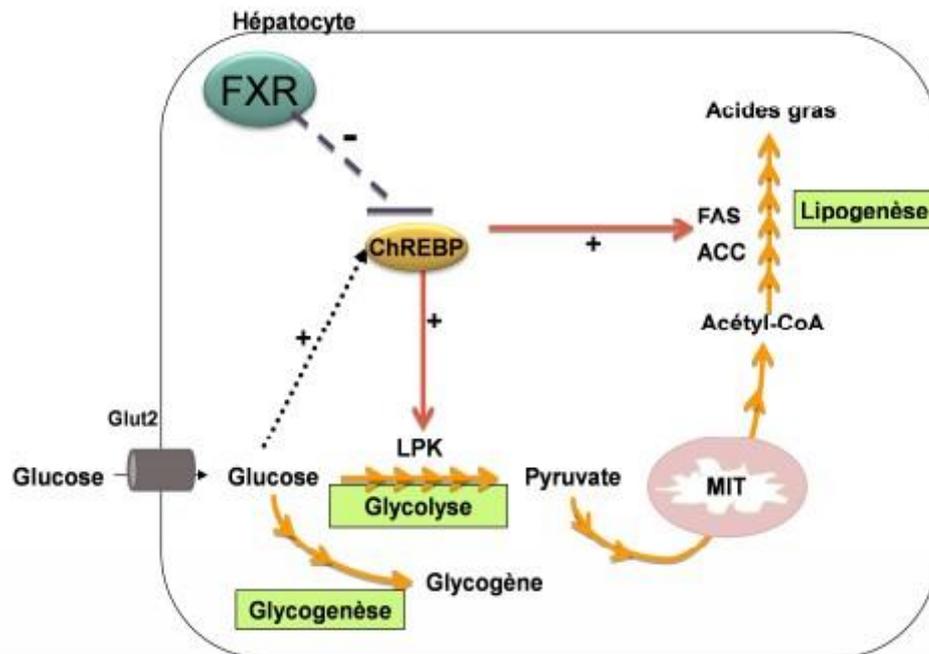


Figure I. 6 Régulation par FXR de la transition jeûne-réalimentation avec un régime riche en sucres

FXR régule l'expression des gènes impliqués dans la transition jeûne-réalimentation, comme le gène de la LPK et les gènes de la lipogenèse (FAS et ACC1). Il a été suggéré que la régulation de ses gènes serait due à une interférence avec l'activité transcriptionnelle de ChREBP [98]. ACC1, Acétyl-CoA carboxylase ; ChREBP, Carbohydrate Response Element Binding Protein ; FAS, Fatty Acid Synthase ; FXR, Farnesoid X Receptor ; LPK, Liver Pyruvate Kinase ; MIT, mitochondrie.

En outre, la cinétique de réponse à un régime riche en sucre par les cellules du foie est également accélérée chez les souris déficientes pour FXR. Ainsi, Duran Sandoval et al. [98] montre que l'induction de l'expression des gènes de la glycolyse (LPK) et de la lipogenèse (FAS, ACC1, et Spot14), ainsi que l'inhibition de l'expression des gènes de la néoglucogénèse, sont accélérées chez des souris déficientes pour FXR après un régime riche en sucre par comparaison avec des souris sauvages. En revanche, l'activation de FXR dans des hépatocytes murins primaires provoque l'effet inverse en inhibant l'expression des gènes glycolytiques et lipogéniques et en induisant celles des gènes néoglucogéniques. Comme nous l'avons détaillé auparavant, ces gènes sont régulés par le glucose via l'activation du facteur de transcription ChREBP qui se fixe sur le ChoRE présent dans la région L4, L3 du promoteur de ces gènes [99]. Des expériences de transfection transitoire de cette région ont

Chapitre I : LE RECEPTEUR NUCLEAIRE FXR

permis de montrer que cette région est suffisante pour permettre une inhibition par FXR de l'induction de la transcription des gènes en réponse au glucose [98]. Ces résultats ont permis de suggérer que FXR inhibe l'activité transcriptionnelle de ChREBP (Figure I. 6). En effet, cette hypothèse a été confirmée lorsque les auteurs ont montré que FXR interférait avec l'activation des gènes en se fixant sur un FXRE présent sur la région L3 de la LPK et de ce fait en inhibant la fixation de ChREBP sur le ChoRE [98].

8. Autres Rôles De FXR

- FXR dans la maladie du foie gras non alcoolique (nafld, non alcoholic fatty liver disease).
- FXR et cancers hépatiques
- Role de fxr dans la regulation de la sensibilite à l'insuline et de l'homeostasie energetique
- FXR et cancers hépatiques

Références Bibliographique

- [1] Sladek FM. What are nuclear receptor ligands? *Mol Cell Endocrinol* (2011) 334: pp. 3-13
- [2] Anbalagan M, Huderson B, Murphy L & Rowan BG. Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl Recept Signal* (2012) 10: p. e001.
- [3] Mullican SE, Dispirito JR & Lazar MA. The orphan nuclear receptors at their 25-year Reunion. *J Mol Endocrinol* (2013)
- [4] Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835–839.
- [5] Nuclear Receptor Nomenclature Committee (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*, 97, 161-163
- [6] Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2006 a). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789–799.
- [7] Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2006 b). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789–799
- [8] McKenna, N.J., Cooney, A.J., DeMayo, F.J., Downes, M., Glass, C.K., Lanz, R.B., Lazar, M.A., Mangelsdorf, D.J., Moore, D.D., Qin, J., et al. (2009). Minireview: Evolution of NURSA, the Nuclear Receptor Signaling Atlas. *Mol. Endocrinol.* 23, 740–746.
- [9] Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789–799.
- [10] Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2006). Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789–799.

- [11] Bugge A, Grøntved L, Aagaard MM, Borup R & Mandrup S. The PPAR γ 2 A/Bdomain plays a gene-specific role in transactivation and cofactor recruitment. *Mol Endocrinol* (2009) **23**: pp. 794-808.
- [12] Yang Z & Privalsky ML. Isoform-specific transcriptional regulation by thyroid hormone receptors: hormone-independent activation operates through a steroid receptor mode of co-activator interaction. *Mol Endocrinol* (2001) **15**: pp. 1170-1185.
- [13] Aranda A & Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* (2001) **81**: pp. 1269-1304.
- [14] Pawlak M, Lefebvre P & Staels B. General molecular biology and architecture of nuclear receptors. *Curr Top Med Chem* (2012) **12**: pp. 486-504.
- [15] Tung L, Abdel-Hafiz H, Shen T, Harvell DME, Nitao LK, Richer JK, Sartorius CA, Takimoto GS & Horwitz KB. Progesterone receptors (PR)-B and -A regulate transcription by different mechanisms: AF-3 exerts regulatory control over coactivator binding to PR-B. *Mol Endocrinol* (2006) **20**: pp. 2656-2670.
- [16] Van Beekum O, Fleskens V & Kalkhoven E. Posttranslational modifications of PPAR γ : fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* (2009) **17**: pp. 213-219.
- [17] Hittelman, A.B., Burakov, D., Iñiguez-Lluhí, J.A., Freedman, L.P. & Garabedian, M.J. (1999). Differential regulation of glucocorticoid receptor transcriptional activation via AF-1-associated proteins. *EMBO J*, 18, 5380-5388.
- [18] Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M. & Sigler, P.B. (1995). Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, 375, 203-211.
- [19] Chen, J.D. & Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377, 454-457
- [20] Moras, D. & Gronemeyer, H. (1998). The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 10, 384-391.
- [21] Hayakawa, T. & Nakayama, J. (2011). Physiological roles of class I HDAC complex and histone demethylase. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 129383.
- [22] Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14, 121-141

- [23] Manteuffel-Cymborowska, M. (1999). Nuclear receptors, their coactivators and modulation of transcription. *Acta Biochim Pol*, 46, 77
- [24] Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC & Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* (1999) **3**: pp. 543-553.
- [25] Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ & Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* (1999) **284**: pp. 1362-1365.
- [26] Seol W, Choi HS & Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* (1995) **9**: pp. 72-85.
- [27] Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM & Weinberger C. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* (1995) **81**: pp. 687-693.
- [28] Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A & Jameson JL. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1989) **86**: pp. 9114-9118
- [29] Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD & Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* (1999) **284**: pp. 1365-1368.
- [30] Seol, W., Choi, H.S. & Moore, D.D. (1995). Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol*, 9, 72-85
- [31] Zhang, Y., Kast-Woelbern, H.R. & Edwards, P.A. (2003). Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem*, 278, 104-110.
- [32] Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupar, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., Hollis, G.F., Young, P.R., Mukherjee, R. & Burn, T.C. (2002). Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms with alternative promoters. *Gene*, 290, 35-43.

- [33] Otte, K., Kranz, H., Kober, I., Thompson, P., Hofer, M., Haubold, B., Rimmel, B., Voss, H., Kaiser, C., Albers, M., Cheruvallath, Z., Jackson, D., Casari, G., Koegl, M., Pääbo, S., Mous, J., Kremoser, C. & Deuschle, U. (2003). Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol. *Mol Cell Biol*, 23, 864-872.
- [34] Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., Torpier, G., Fruchart, J., Gonzalez, F.J., Kuipers, F. & Staels, B. (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, 281, 11039-11049.
- [35] Popescu, I.R., Helleboid-Chapman, A., Lucas, A., Vandewalle, B., Dumont, J., Bouchaert, E., Derudas, B., Kerr-Conte, J., Caron, S., Pattou, F. & Staels, B. (2010). The nuclear receptor FXR is expressed in pancreatic beta cells and protects human islets from lipotoxicity. *FEBS Lett*, 584, 2845-2851.
- [36] Renga, B., Mencarelli, A., Vavassori, P., Brancaleone, V. & Fiorucci, S. (2010). The bile acid sensor FXR regulates insulin transcription and secretion. *Biochim Biophys Acta*, 1802, 363-372
- [37] Prawitt, J., Abdelkarim, M., Stroeve, J.H.M., Popescu, I., Duez, H., Velagapudi, V.R., Dumont, J., Bouchaert, E., van Dijk, T.H., Lucas, A., et al. (2011). Farnesoid X receptor deficiency improves glucose homeostasis in mouse models of obesity. *Diabetes* 60, 1861–1871.
- [38] Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365
- [39] Yu, J., Lo, J.-L., Huang, L., Zhao, A., Metzger, E., Adams, A., Meinke, P.T., Wright, S.D., and Cui, J. (2002). Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 277, 31441–31447.
- [40] Hu, X., Bonde, Y., Eggertsen, G., and Rudling, M. (2014). Muricholic bile acids are potent regulators of bile acid synthesis via a positive feedback mechanism. *J. Intern. Med.* 275, 27–38
- [41] Campana, G., Pasini, P., Roda, A., and Spampinato, S. (2005). Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: role of the farnesoid X receptor. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1755–1763.

- [42] Sayin, S.I., Wahlström, A., Felin, J., Jäntti, S., Marschall, H.-U., Bamberg, K., Angelin, B., Hyötyläinen, T., Orešič, M., and Bäckhed, F. (2013). Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell Metab.* 17, 225–23
- [43] Mueller, M., Thorell, A., Claudel, T., Jha, P., Koefeler, H., Lackner, C., Hoesel, B., Fauler, G., Stojakovic, T., Einarsson, C., et al. (2015). Ursodeoxycholic Acid Exerts Farnesoid X Receptor-antagonistic Effects on Bile Acid and Lipid Metabolism in Morbid Obesity. *J. Hepatol.*
- [44] Urizar, N.L., Liverman, A.B., Dodds, D.T., Silva, F.V., Ordentlich, P., Yan, Y., Gonzalez, F.J., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., and Moore, D.D. (2002). A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for 144 FXR. *Science* 296, 1703–1706.
- [45] Cui, J., Huang, L., Zhao, A., Lew, J.-L., Yu, J., Sahoo, S., Meinke, P.T., Royo, I., Pelaez, F., and Wright, S.D. (2003). Guggulsterone is a farnesoid X receptor antagonist in coactivator association assays but acts to enhance transcription of bile salt export pump. *J. Biol. Chem.* 278, 10214–10220.
- [46] Owsley, E., and Chiang, J.Y.L. (2003). Guggulsterone antagonizes farnesoid X receptor induction of bile salt export pump but activates pregnane X receptor to inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 191–195.
- [47] Burris, T.P., Montrose, C., Houck, K.A., Osborne, H.E., Bocchinfuso, W.P., Yaden, B.C., Cheng, C.C., Zink, R.W., Barr, R.J., Hepler, C.D., et al. (2005). The hypolipidemic natural product guggulsterone is a promiscuous steroid receptor ligand. *Mol. Pharmacol.* 67, 948–954.
- [48] Maloney, P.R., Parks, D.J., Haffner, C.D., Fivush, A.M., Chandra, G., Plunket, K.D., Creech, K.L., Moore, L.B., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Jones, S.A. & Willson, T.M. (2000). Identification of a chemical tool for the orphan nuclear receptor FXR. *J Med Chem*, 43, 2971-2974.
- [49] Dussault, I., Beard, R., Lin, M., Hollister, K., Chen, J., Xiao, J., Chandraratna, R. & Forman, B.M. (2003). Identification of gene-selective modulators of the bile acid receptor FXR. *J Biol Chem*, 278, 7027-7033
- [50] Pellicciari, R., Fiorucci, S., Camaioni, E., Clerici, C., Costantino, G., Maloney, P.R., Morelli, A., Parks, D.J. & Willson, T.M. (2002). 6 α -ethyl-chenodeoxycholic

- acid (6- ECDCA), a potent and selective FXR agonist endowed with anticholestatic activity. *J Med Chem*, 45, 3569-3572.
- [51] Downes, M., Verdecia, M.A., Roecker, A.J., Hughes, R., Hogenesch, J.B., Kast-Woelbern, H.R., Bowman, M.E., Ferrer, J., Anisfeld, A.M., Edwards, P.A., Rosenfeld, J.M., Alvarez, J.G.A., Noel, J.P., Nicolaou, K.C. & Evans, R.M. (2003). A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell*, 11, 1079-1092.
- [52] Flatt, B., Martin, R., Wang, T., Mahaney, P., Murphy, B., Gu, X., Foster, P., Li, J., Pircher, P., Petrowski, M., Schulman, I., Westin, S., Wrobel, J., Yan, G., Bischoff, E., Daige, C. & Mohan, R. (2009). Discovery of XL335 (WAY-362450), a highly potent, selective, and orally active agonist of the farnesoid X receptor (FXR). *J Med Chem*, 52, 904-907
- [53] Laffitte, B.A., Kast, H.R., Nguyen, C.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D. & Edwards, P.A. (2000). Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem*, 275, 10638-10647
- [54] Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I.P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J., Dallongeville, J., Hum, D.W., Kuipers, F. & Staels, B. (2002). Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest*, 109, 961-971.
- [55] Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J. & Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 284, 1362-1365
- [56] Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., Stimmel, J.B., Willson, T.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D. & Lehmann, J.M. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, 284, 1365-1368.
- [57] Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C. & Forman, B.M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*, 3, 543-553.
- [58] Rizzo, G., Renga, B., Antonelli, E., Passeri, D., Pellicciari, R. & Fiorucci, S. (2005). The methyl transferase PRMT1 functions as co-activator of farnesoid X receptor (FXR)/9-cis retinoid X receptor and regulates transcription of FXR responsive genes. *Mol Pharmacol*, 68, 551-558.

- [59] Ananthanarayanan, M., Li, S., Balasubramaniyan, N., Suchy, F.J. & Walsh, M.J. (2004). Ligand-dependent activation of the farnesoid X-receptor directs arginine methylation of histone H3 by CARM1. *J Biol Chem*, 279, 54348-54357
- [60] Savkur, R.S., Thomas, J.S., Bramlett, K.S., Gao, Y., Michael, L.F. & Burris, T.P. (2005). Ligand-dependent coactivation of the human bile acid receptor FXR by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 170-178.
- [61] Zhang, Y., Castellani, L.W., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J. & Edwards, P.A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev*, 18, 157-169.
- [62] Kanaya, E. & Jingami, H. (2006). The region of CQQQKPQRRP of PGC-1alpha interacts with the DNA-binding complex of FXR/RXRalpha. *Biochem Biophys Res Commun*, 342, 734-743
- [63] Kanaya, E., Shiraki, T. & Jingami, H. (2004). The nuclear bile acid receptor FXR is activated by PGC-1alpha in a ligand-dependent manner. *Biochem J*, 382, 913-921
- [64] Savkur, R.S., Thomas, J.S., Bramlett, K.S., Gao, Y., Michael, L.F. & Burris, T.P. (2005). Ligand-dependent coactivation of the human bile acid receptor FXR by the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 170-178.
- [65] Sanyal, S., Båvner, A., Haroniti, A., Nilsson, L., Lundåsen, T., Rehnmark, S., Witt, M.R., Einarsson, C., Talianidis, I., Gustafsson, J. & Treuter, E. (2007). Involvement of corepressor complex subunit GPS2 in transcriptional pathways governing human bile acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15665-15670.
- [66] Pineda Torra, I., Freedman, L.P. & Garabedian, M.J. (2004). Identification of DRIP205 as a coactivator for the Farnesoid X receptor. *J Biol Chem*, 279, 36184-36191.
- [67] Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J. & Kato, S. (2005). TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem Biophys Res Commun*, 327, 933-938.
- [68] Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupar, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., Hollis, G.F., Young, P.R.,

- Mukherjee, R. & Burn, T.C. (2002). Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms with alternative promoters. *Gene*, 290, 35-43.
- [69] Gineste, R., Sirvent, A., Paumelle, R., Helleboid, S., Aquilina, A., Darteil, R., Hum, D.W., Fruchart, J. & Staels, B. (2008). Phosphorylation of farnesoid X receptor by protein kinase C promotes its transcriptional activity. *Mol Endocrinol*, 22, 2433-2447.
- [70] Frankenberg, T., Miloh, T., Chen, F.Y., Ananthanarayanan, M., Sun, A., Balasubramanian, N., Arias, I., Setchell, K.D.R., Suchy, F.J. & Shneider, B.L. (2008). The membrane protein ATPase class I type 8B member 1 signals through protein kinase C zeta to activate the farnesoid X receptor. *Hepatology*, 48, 1896-1905.
- [71] Fang, S., Tsang, S., Jones, R., Ponugoti, B., Yoon, H., Wu, S., Chiang, C., Willson, T.M. & Kemper, J.K. (2008). The p300 acetylase is critical for ligand-activated farnesoid X receptor (FXR) induction of SHP. *J Biol Chem*, 283, 35086-35095.
- [72] Kemper, J.K., Xiao, Z., Ponugoti, B., Miao, J., Fang, S., Kanamaluru, D., Tsang, S., Wu, S., Chiang, C. & Veenstra, T.D. (2009). FXR acetylation is normally dynamically regulated by p300 and SIRT1 but constitutively elevated in metabolic disease states. *Cell Metab*, 10, 392-404.
- [73] Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 70, 503-533.176 | Page
Pilkis, S.J., el-Maghrabi, M.R. & Claus, T.H. (1988). Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Biochem*, 57, 755-783.
- [74] Gareau, J.R. & Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 861-871.
- [75] Vavassori, P., Mencarelli, A., Renga, B., Distrutti, E. & Fiorucci, S. (2009). The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity. *J Immunol*, 183, 6251- 6261.
- [76] Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F. & Staels, B. (2009). Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*, 89, 147-191
- [77] Russell, D.W. (2003). The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*, 72, 137-174.
- [78] Chiang, J.Y.L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*, 50, 1955-1966.
Cipriani, S., Mencarelli, A., Palladino, G. & Fiorucci, S. (2010). FXR

- activation reverses insulin resistance and lipid abnormalities and protects against liver steatosis in Zucker (fa/fa) obese rats. *J Lipid Res*, 51, 771-784.
- [79] Rolo, A.P., Palmeira, C.M., Holy, J.M., and Wallace, K.B. (2004). Role of mitochondrial dysfunction in combined bile acid-induced cytotoxicity: the switch between apoptosis and necrosis. *Toxicol. Sci.* 79, 196–204
- [80] Morgan, W.A., Nk, T., and Ding, Y. (2008). The use of High Performance Thin-Layer Chromatography to determine the role of membrane lipid composition in bile salt-induced kidney cell damage. *J Pharmacol Toxicol Methods* 57, 70–73.
- [81] Kim, I., Ahn, S.-H., Inagaki, T., Choi, M., Ito, S., Guo, G.L., Kliewer, S.A., and Gonzalez, F.J. (2007). Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J. Lipid Res.* 48, 2664–2672
- [82] Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Suchy, F.J. (2001). Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 28857–28865.
- [83] Sinal, C.J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J.M., Lambert, G., and Gonzalez, F.J. (2000). Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102, 731–744.
- [84] De Aguiar Vallim, T.Q., Tarling, E.J., Ahn, H., Hagey, L.R., Romanoski, C.E., Lee, R.G., Graham, M.J., Motohashi, H., Yamamoto, M., and Edwards, P.A. (2015). MAFG Is a Transcriptional Repressor of Bile Acid Synthesis and Metabolism. *Cell Metab.* 21, 298–310.
- [85] Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang, D.Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., et al. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 17, 1581–1591.
- [86] Li, S.; Ni, A.; Feng, G. Bridging Cell Surface Receptor with Nuclear Receptors in Control of Bile Acid Homeostasis. *Acta Pharmacol Sin* **2015**, 36 (1), 113–118. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.118>.
- [87] Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J. & Karpen, S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology*, 121, 140-147.

- [88] Neimark, E., Chen, F., Li, X. & Shneider, B.L. (2004). Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology*, 40, 149-156
- [89] Landrier, J., Eloranta, J.J., Vavricka, S.R. & Kullak-Ublick, G.A. (2006). The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G476-85.
- [90] Migita H, Morser J & Kawai K. Rev-erbalpha upregulates NF-kappaB-responsive genes in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* (2004) **561**: pp. 69-74.
- [91] Burris TP. Nuclear hormone receptors for heme: REV-ERBalpha and REV-ERBbeta are ligand-regulated components of the mammalian clock. *Mol Endocrinol* (2008) **22**: pp. 1509-1520.
- [92] Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O & Guo GL. Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* (2009) **328**: pp. 116-122.
- [93] Duran-Sandoval, D., Mautino, G., Martin, G., Percevault, F., Barbier, O., Fruchart, J., Kuipers, F. & Staels, B. (2004). Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*, 53, 890-898.
- [94] Zhang, Y., Lee, F.Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F.J., Willson, T.M. & Edwards, P.A. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 1006-1011.
- [95] Staels, B. & Kuipers, F. (2007). Bile acid sequestrants and the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Drugs*, 67, 1383-1392.
- [96] Hassan, A.S., Subbiah, M.T. & Thiebert, P. (1980). Specific changes of bile acid metabolism in spontaneously diabetic Wistar rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 164, 449-452.
- [97] Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., Torpier, G., Fruchart, J., Gonzalez, F.J., Kuipers, F. & Staels, B. (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*, 281, 11039-11049.

- [98] Duran-Sandoval, D., Cariou, B., Percevault, F., Hennuyer, N., Grefhorst, A., van Dijk, T.H., Gonzalez, F.J., Fruchart, J., Kuipers, F. & Staels, B. (2005). The farnesoid X receptor modulates hepatic carbohydrate metabolism during the fasting-refeeding transition. *J Biol Chem*, 280, 29971-29979.
- [99] Poupeau, A. & Postic, C. (2011). Cross-regulation of hepatic glucose metabolism via ChREBP and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1812, 995-1006.

Chapitre II :

Le docking moléculaire

1. Introduction

L'interaction entre une protéine et son substrat est la première étape dans la plupart des cas Réponse biologique. La connaissance de la structure du complexe permet aux chercheurs Mieux comprendre les modes de fonctionnement des interactions participantes les ligands protéiques sont donc essentiels pour pouvoir expliquer le mécanisme d'influence L'affinité entre deux molécules.

De même, découvrir de nouveaux ligands qui activent ou inhibent l'activité biologique Une protéine ne peut se faire qu'en prédisant leurs affinités respectives.

Avancées de la cristallographie et introduction de structures obtenues par résonance magnétique nucléaire Conduire à la création de ressources basées sur la technologie moderne, ce qui favorisera Utilisation et analyse des données structurales. En biologie, « les données protéiques "Bank" (PDB) est une excellente base de données [1].

Cependant, des outils informatiques ont vu le jour pour traiter le flux de données résultant Et optimiser sa progression. L'amarrage moléculaire (souvent appelé "amarrage") est l'une des dernières méthodes informatiques. Le problème" Le "Docking" consiste à prédire etrépliquer des complexes protéine-ligand en étudiant l'ensemble Le mécanisme et l'interaction de la formation de complexes moléculaires [2, 3].

2. Le Docking Moléculaire

Le docking ou l'amarrage moléculaire décrit un processus dans lequel une molécule (ligand) est placée dans le site actif d'une protéine cible dans un espace tridimensionnel (3D). Deux aspects sont importants : la prédiction de l'affinité du complexe [ligand-protéine], et la prédiction de la position correcte du ligand dans le site actif de la protéine. La prédiction d'affinité est liée à différents ligands de la collection, certains conviennent mieux que d'autres. La prédiction de position est liée à la même molécule de ligand mais dans des orientations différentes [4].

Le but principal de l'amarrage moléculaire est de simuler par ordinateur le processus d'identification moléculaire et d'obtenir une conformation optimisée de manière à minimiser l'énergie libre du système global.

Une simulation de docking comprend essentiellement deux étapes complémentaires : le docking et le scoring.

- **Le Docking** : est l'étape de sélection, consistant à placer le ligand dans le site actif de la protéine et à échantillonner les conformations, positions et orientations (poses) possibles, en ne retenant que celles qui représentent les modes d'interactions les plus favorables.
- **Le Scoring** : est l'étape de classement, qui consiste à évaluer l'affinité entre le ligand et la protéine, et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de Docking. Ce score permettra de retenir la meilleure pose parmi toutes celles proposées.

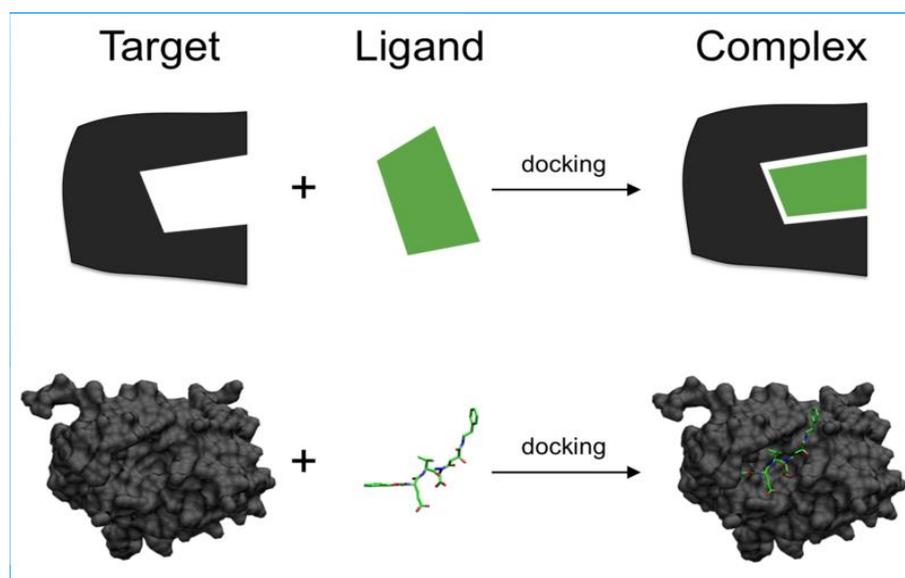


Figure II. 1 Représentation schématique du Docking moléculaire [6].

La plupart des programmes existants, essayent de déterminer la géométrie du complexe macromolécule-ligand. L'algorithme de base tient essentiellement en trois points :

- Définir une géométrie du complexe.
- Evaluer la qualité de cette géométrie.
- Recommencer en classant les géométries

2.1. Les Outils De Docking

Le Docking peut être défini comme étant l'ensemble des mécanismes et interactions intervenant lors de la formation de complexes moléculaires. Il a des applications pratiques dans l'ingénierie des protéines et la conception de nouveaux médicaments. Il y a différents types de Docking dont ligand-protéine, protéine-protéine, glucide-protéine et ADN-protéine. Le «Docking» moléculaire consiste à prédire la ou les structures des complexes formés entre une molécule active et une protéine.

- Les algorithmes de calcul génèrent aléatoirement un grand nombre d'orientations possibles pour trouver « la meilleure façon d'insérer » la molécule dans une protéine (au niveau du récepteur ou du site actif).
- Le programme prend en compte tous les degrés de liberté de la molécule (translation et rotation).

Chapitre II : le docking moléculaire

- Pour chaque possibilité l'énergie est calculée en Mécanique Moléculaire, prenant ainsi en compte toutes les interactions ligand-récepteur (liaisons de Van der Waals, liaisons H, hydrophobie...).
- On obtient ainsi un « score » pour estimer la meilleure interaction ligand/ récepteur
- Le score est l'enthalpie libre de liaison (il doit être minimisé).

2.1.1. Le Récepteur

Les récepteurs sont des macromolécules impliquées dans la signalisation chimique des signaux inter- et intracellulaires ; ils peuvent être situés sur la membrane de surface cellulaire ou dans le cytoplasme, Les récepteurs activés agissent en régulant de façon directe ou indirecte des processus biochimiques cellulaires (p. ex., conductance ionique, phosphorylation des protéines, transcription de l'ADN, activité enzymatique) [7].

2.1.2. Ligand

Les molécules (p. ex., médicaments, hormones, neurotransmetteurs) qui se lient à un récepteur sont appelées ligands. La liaison peut être spécifique et réversible. Un ligand peut activer ou inactiver un récepteur ; l'activation peut augmenter ou diminuer une fonction cellulaire particulière. Chaque ligand peut interagir avec plusieurs sous-types de récepteurs. Très peu de médicaments, voire aucun, sont d'une spécificité absolue pour un récepteur ou un sous-type de récepteur, mais la plupart agissent de manière relativement sélective. La sélectivité correspond au degré d'interaction d'un médicament sur un site donné par rapport à d'autres sites ; la sélectivité est une notion très dépendante de la liaison physicochimique du médicament aux récepteurs cellulaires [8,9].

2.1.3. Programme

Plus de 30 programmes de Docking moléculaire (commerciaux ou non) sont disponibles [10] Les plus fréquemment cités sont respectivement : AutoDock [11], GOLD [12], FlexX [13], DOCK [14] et ICM [15].

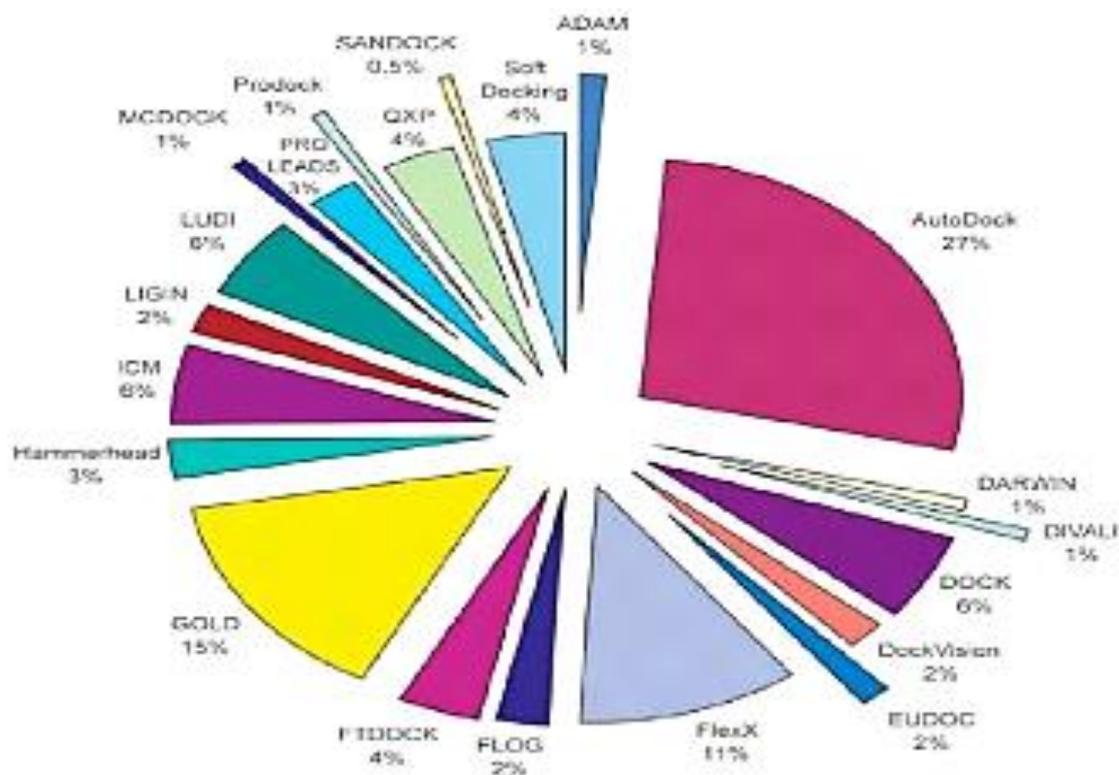


Figure II. 2 comparaison des programmes de Docking les plus cités

2.1.4. Types D'interactions

Mises à part quelques exceptions, les atomes ne sont pas isolés dans les conditions habituelles. Ils établissent entre eux des liaisons chimiques, ou liaisons fortes, afin de former des molécules. Une particularité des molécules biologiques qui rend leur étude d'autant plus complexe est l'importance, aussi bien dans leur structure que lors d'interactions, de la formation de liaisons non chimiques, ou liaisons faibles. Dans cette partie nous allons développer les liaisons chimiques faibles et fortes d'importance biologique. [16]

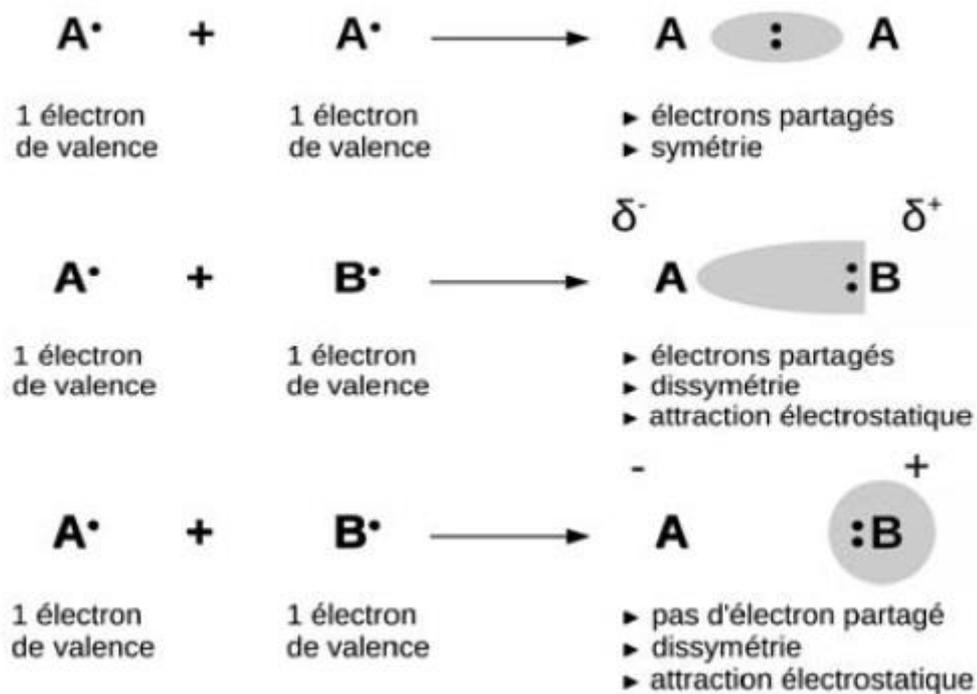


Figure II. 3 De haut en bas : distribution des électrons dans des Liaisons covalentes, covalentes

A- Les Liaisons Chimiques Fortes

Les liaisons chimiques se forment spontanément entre des atomes pour former une molécule dont l'énergie sera inférieure à celle des atomes pris séparément. Ce sont des interactions à courte portée (typiquement entre 0.7 et 2 Å). Dans les molécules biologiques, on peut définir trois types de liaisons fortes : covalente, covalente polarisée et ionique.

Ces liaisons sont essentielles pour expliquer les propriétés des molécules biologiques. Dû à leur faible énergie (généralement comprise entre 4 et 30 kJ/mol), elles sont en compétition avec les forces de dissociation liées à l'agitation thermique (2.5 kJ/mol à 25°C) et peuvent se rompre et se rétablir très facilement à la température physiologique, permettant ainsi des interactions temporaires entre molécules.

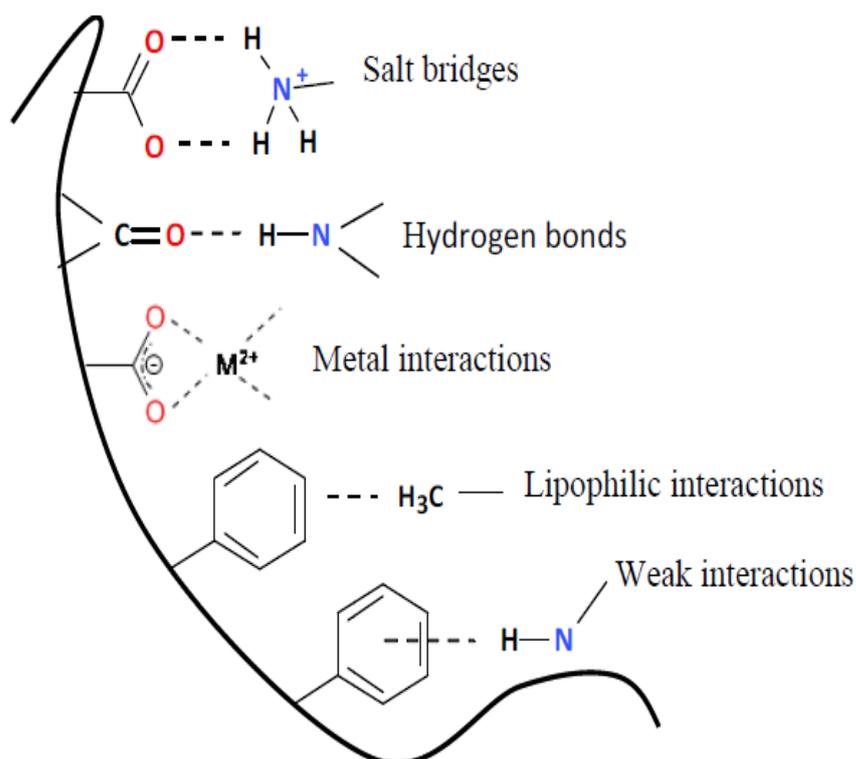


Figure II. 4 les types d'interactions

B- Les Liaisons Chimiques Faibles

Les liaisons faibles sont des interactions électrostatiques (attraction de charges opposées) entre les molécules voisines (et non plus entre les atomes). Elles agissent donc à des distances plus longues et sont de ce fait plus faibles que les liaisons covalentes. On décrit ici les liaisons hydrogène et les interactions de Van der Waals. [17]

▪ -Les Forces De Van Der Waals

Une liaison de van der Waals est une interaction électrique de faible intensité entre atomes, molécules, ou entre une molécule et un cristal. Il est possible de décrire sommairement cette interaction en considérant les forces électriques qui sont présentes entre tous les couples de charges électriques qui forment ces atomes et ces molécules.

Les forces de van der Waals ont plusieurs origines. Ces forces peuvent s'exprimer de manière différente, lorsque les distances entre les molécules mises en jeu deviennent plus grandes que quelques nanomètres.

L'énergie potentielle typique de ce type d'interactions est d'environ 15 kJ/mol. Cette attraction devient nulle à grande distance (entre le dipôle et l'ion). Cette interaction est responsable de l'hydratation des cations en solution.

Chapitre II : le docking moléculaire

▪ La Liaison Hydrogène

Cette liaison, également appelée pont hydrogène, intervient lorsqu'un atome d'hydrogène lié par covalence à un atome électronégatif (le donneur D) est attiré par un autre atome électronégatif (l'accepteur A, généralement un atome d'azote ou d'oxygène).

C'est donc une interaction de type dipôle-dipôle, cas particulier des forces de van der Waals, induite par l'apparition d'une charge partielle positive sur l'hydrogène, son nuage électronique étant attiré par l'atome donneur. Cette charge positive est alors attirée par la charge partielle négative portée par l'accepteur : $\delta^- - D - H \delta^+ \cdots \cdots A \delta^-$. [18]

Ce type de liaison, pouvant être intra ou intermoléculaire, explique en grande partie l'arrangement spatial des macromolécules mais aussi l'importance de l'effet structurant de l'eau. Sa force est de l'ordre de 12 à 30 kJ/mol, soit davantage que celle d'une interaction de van der Waals, et de l'ordre des énergies mises en jeu dans les fluctuations thermiques à la température physiologique. Elle est assez élevée pour avoir des conséquences importantes et assez faible pour être réversible.

La liaison hydrogène est très importante dans les molécules biologiques. Les molécules d'eau sont maintenues ensemble par une liaison hydrogène.

La structure secondaire des protéines, c'est-à-dire l'hélice alpha et les feuillets bêta, est maintenue via une liaison hydrogène entre les composants de la liaison peptidique. La liaison hydrogène maintient également la structure tertiaire des protéines.

La double hélice d'ADN est maintenue ensemble via une liaison hydrogène entre les bases de ses nucléotides.

L'enroulement de la chaîne d'ARN sur elle-même se fait par liaison hydrogène.

L'enroulement de la chaîne d'ARN sur elle-même se fait par liaison hydrogène. [19]

▪ L'effet Hydrophobe

Les molécules dépourvues de groupes chargés ou d'atomes capables de former des liaisons hydrogène sont dénommées substances hydrophobes.

D'un point de vue physique, les molécules hydrophobes agissent de la manière suivante :

Chapitre II : le docking moléculaire

malgré la non polarité des molécules hydrophobes, les nuages d'électrons de 2 molécules voisines interagissent de telle sorte qu'il apparaît des charges partielles de signe contraire les interactions d'attraction entre ces dipôles transitoires (constitués par les électrons d'un atome et le noyau d'un autre atome) sont appelées forces de dispersion de London et elles constituent l'essence de l'effet hydrophobe d'un point de vue thermodynamique, la diminution du nombre de molécules d'eau enrobant les groupes non polaires et l'agrégation de ces derniers s'accompagne d'un gain net d'entropie de l'ensemble du solvant et du soluté non polaire.

Les interactions hydrophobes sont des forces de faible énergie : 20 à 30 kJ.mol⁻¹. [20]

▪ Importance biologique des liaisons de faible énergie

Les liaisons de faible énergie sont d'une importance capitale pour les processus biologiques :

en premier lieu, bien qu'énergétiquement plus faibles que les liaisons covalentes, leur effet cumulatif renforce la forme tridimensionnelle des macromolécules et maintient leur structure inversement, ces liaisons confèrent toute la souplesse et la dynamique conformationnelle qui sont nécessaires à leurs fonctions biologiques cette flexibilité des biomolécules leur confère leur capacité de reconnaissance des ligands et autres molécules avec lesquelles elles interagissent, donc leur très haute spécificité.

La facilité qu'ont ces forces à se rompre est compatible avec la chimie de la cellule où les propriétés de la vie découlent des interactions moléculaires.

Les liaisons faibles permettent de brefs contacts : les biomolécules s'assemblent, réagissent l'une avec l'autre puis se dissocient. Par exemple, la réponse des organes à des stimuli hormonaux ou à des influx nerveux est un exemple de contacts brefs mais suffisants pour déclencher des réactions secondaires [21].

2.2. Le Processus De Scoring

Le score est une donnée numérique utile pour quantifier le degré avec lequel un ligand se complexe à un récepteur. C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant

Chapitre II : le docking moléculaire

du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe.

Le principe thermodynamique est le suivant. [22]

$$\Delta G = \Delta G_{\text{complexe}} - \Delta G_{\text{ligand}} - \Delta G_{\text{protéine}}$$

Le score est une estimation de l'affinité entre la macromolécule et la petite molécule organique.

Un score ne prédit donc en rien une activité mais bien une affinité. Un grand nombre de programmes (commerciaux ou non) de Docking moléculaire sont d'ores et déjà disponibles. Parmi ceux-ci, nous citerons par exemple AUTODOCK [11], FLEXX [12], GOLD [13], et DOCK [14] etc.

Ils diffèrent les uns des autres sur la manière de représenter le système moléculaire et la manière de déterminer le score de Docking (fonction de score). Deux approches sont principalement employées pour la modélisation du système protéine-ligand.

2.2.1. Représentation Géométrique

Cette première approche a conduit au développement de méthodes géométriques dites de complémentarité de forme (shape complementarity) où la protéine et le ligand sont décrits par des surfaces de descripteurs qu'il suffit d'apparier (matching).

La construction de la surface de descripteurs de chacune des deux entités prend en compte différentes caractéristiques telles que la surface moléculaire, la surface accessible au solvant, les propriétés hydrophobes, la formation éventuelle de liaisons hydrogène, etc.

Dans cette approche, la fonction de score mesure un taux d'appariement correct des descripteurs entre la protéine et le ligand pour chaque conformation à évaluer. Plus ce taux est grand, plus le score de docking est élevé et plus la conformation du système protéine-ligand est optimale.

Ces méthodes sont typiquement rapides et robustes. Elles sont choisies préférentiellement, par exemple, dans le cas d'un scan de plusieurs milliers de ligands pharmacophores. [23]

Chapitre II : le docking moléculaire

2.2.2. Représentation Atomique

Énergies intramoléculaires des deux entités sont parfois incluses dans le score final.

- Empirique : Ces méthodes se basent sur un décompte du nombre d'interactions dans le système protéine-ligand comme par exemple le nombre de liaisons hydrogène, les contacts hydrophobes, les contacts hydrophiles, les contraintes de torsion dues à la formation du complexe protéine-ligand, etc.

Le score est finalement obtenu, en général, en utilisant des méthodes de régression linéaire multiple.

- Connaissance : Ces méthodes sont fondées sur des observations statistiques de contacts intermoléculaires proches dans des bases de données 3D (Cambridge Structural Database ou Protein Data Bank).

Il est supposé que les contacts intermoléculaires proches entre certains types d'atome (ou entre certains groupes fonctionnels) plus fréquents qu'une distribution aléatoire conduisent à des interactions énergétiquement favorables, permettant alors d'estimer une affinité de liaison reliée à un potentiel de force moyenne.

Cette valeur estimée de l'affinité de liaison est le score de docking. En plus de la conformation optimale, l'objectif d'un programme de docking moléculaire est idéalement de déterminer l'enthalpie libre (ΔG) de formation en solution du complexe [P : L] entre la protéine P et le ligand L, selon :



Quelle que soit l'approche utilisée, les fonctions précédentes nous donnent le score de Docking sous la forme d'une valeur, souvent abstraite, représentative de la conformation obtenue du système protéine-ligand. Cette valeur n'est pas reliée directement à une grandeur énergétique du système, sauf dans le cas de l'utilisation d'un champ de forces où le score est donné par les énergies d'interaction intermoléculaire. Des calculs supplémentaires sont donc nécessaires, à partir des conformations optimales, pour déterminer la valeur de l'enthalpie libre de formation [23].

3. Protocole Général De Docking

Les approches utilisées actuellement sont exclusivement calculatoires et évaluées par des outils de visualisation. Ces approches peuvent être décomposées en quatre à cinq phases successives (Figure II. 5) :

— Choix du mode de représentation des protéines (tout atome, pseudo-atome, grille, etc.).

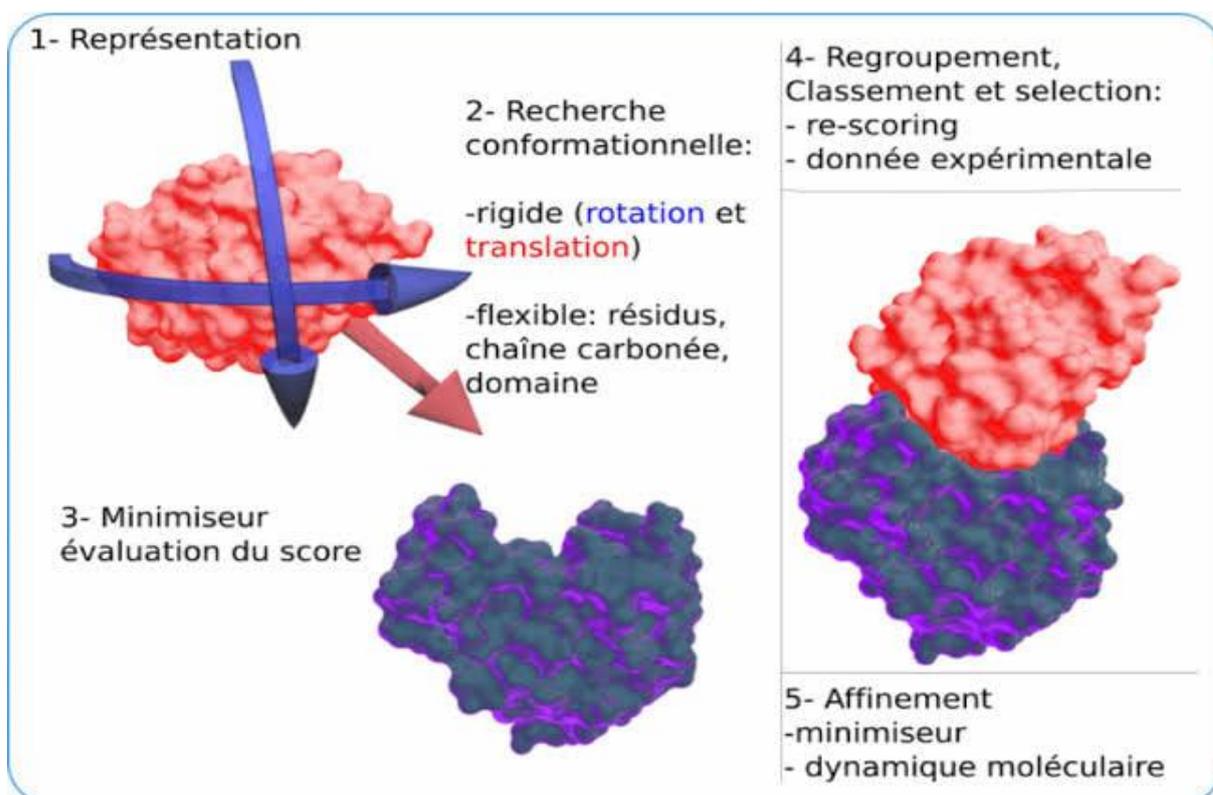


Figure II. 5 Protocol général de Docking .

- Exploration conformation elle (corps-rigide position/orientation du ligand et/ou flexible position/orientation/forme du ligand).
- Minimisation de la fonction d'évaluation de l'énergie d'interaction (ou fonction de score) des conformations issues de l'exploration.
- Regroupement par ressemblances et classification par évaluation plus fine du score, accompagnée d'une étape non automatique d'évaluation visuelle des résultats lorsque le score ne permet pas de discriminer la conformation native des différentes conformations générées.
- Une étape optionnelle d'affinement des complexes sélectionnés par minimisation ou dynamique moléculaire. Un algorithme de recherche pour explorer les possibilités de

Chapitre II : le docking moléculaire

modèles de liaison, un mécanisme pour placer le ligand dans le site de liaison et une fonction de score pour classer les différents modes de liaison. [24]

Références Bibliographique

- [1] Stahl M., Rarey M. 'Detailed analysis of scoring functions for virtual screening'. *J. Med. Chem.* (2001), 44.p 1035.
- [2] - Chang M.W., Ayeni C., Breuer S., Torbett B.E. 'Virtual screening for HIV protease Inhibitors: a comparison of AutoDock 4 and Vina'. *PLoS ONE*, (2010),5. p11955.
- [3] Nocedal J., Wright S.J., Quasi-Newton Methods. 'In Numerical Optimization. T. V. Mikosch, S. I. Resnick, S. M. Robinson (Ed.) '. (2006)
- [4] Alexandre Beautrait. Development and validation of the VSM-G virtual platform. Use for the study of the FAT domain of the KAK kinase. Theses, Université Henri Poincaré - Nancy I, January 2008
- [5] Eddy Thiriot. Modeling of enzymatic recognition and catalysis: methodological developments and determination of class A Methionine Sulfoxide Reductases mechanism. Theses, Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009
- [6] Sousa S. F., Fernandes P. A., Ramos M. J. Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *Proteins*. 2006 ; 65 :15-26
- [7] Martin L. Développement d'une plateforme bioinformatique d'outils pour la modélisation des structures et pour le criblage virtuel comparatif : une application sur la protéine kinase FAK. Thèse de doctorat d'université : Bioinformatique. Montpellier : Université Montpellier 2. France. (2006). 149p
- [8] Shibata, D., Slusarenko, A., Casey, R., Hildebrand, D., Bell, E. Lipoxygenases. *Plant Molecular Biology Reporter*. (1994) ; 12 .41p
- [9] Monge A. Création et utilisation de chimiothèques optimisées pour la recherche « in silico » de nouveaux composés bioactifs. Thèse de doctorat d'université : Chimie Informatique et Théorique. Orléans : Université d'Orléans. France. (2006). 154p
- [10] Grosdidier A. Conception d'un logiciel de docking et applications dans la recherche de nouvelles molécules actives. Thèse de doctorat en pharmacie. Grenoble : Université Joseph Fourier. France. (2007). 90p
- [11] Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Lindstrom W., Hart W. E., et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* (1998); 19 .1639p.

Chapitre II : le docking moléculaire

- [12] Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J.Mol. Biol.* (1997); 267 .727p
- [13] Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm ., *J.Mol. Biol.* (1996); 261 .470p.
- [14] Ewing T. J., Makino S., Skillman A. G., and Kuntz I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* (2001); 15 .411p
- [15] Abagyan R., Totrov M. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *J.Mol. Biol.* (1994); 235. 983p
- [16] Watson J, Hopkins N, Roberts J, Agatsinger Steitz J, Weiner A (1987) [1965]. *Molecular Biology of the Gene* (hardcover) (Fourth ed.). Menlo Park, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. p. 168. ISBN 978-0805396140.
- [17] G. R. Desiraju and T. Steiner, *The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology*, Oxford University Press, Oxford, (1999).
- [18] G.A. Jeffrey, W. Saenger. *Hydrogen bonding in biological structures*. Berlin: Springer-Verlag, (1991). DOI: 10.1007/978-3-642-85135-3
- [19] Calhorda, M. J. Weak Hydrogen Bonds: Theoretical Studies. *Chem. Commun.* 2000, No. 10, 801–809. <https://doi.org/10.1039/A900221I>
- [20] Miller BR, Gulick AM (2016). “*Structural Biology of Nonribosomal Peptide Synthetases*”. *Methods in Molecular Biology*. 1401: 3–29. Doi: 10.1007/978-1-4939-3375-4_1. ISBN 978-1-4939-3373-0. PMC 4760355. PMID 26831698
- [21] Aldred, E. M.; Buck, C.; Vall, K. Chapter 3 - Bonds Found in Biological Chemistry. In *Pharmacology*; Churchill Livingstone: Edinburgh, 2009; pp 11–19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06898-0.00003-7>
- [22] Alban Arrault. Docking-scoring strategies assisted by data analysis. Application to virtual screening of COX-2 and PPAR gamma therapeutical targets. Theses, Université d'Orléans, November 2007
- [23] Mitsuhiro Yamada and Hajime Yasuhara. Clinical pharmacology of Mao inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology*, 25(1-2) :215–221, 2004
- [24] Mitsuhiro Yamada and Hajime Yasuhara. Clinical pharmacology of mao inhibitors: safety and future. *Neurotoxicology*, 25(1-2) :215–221, 2004

Chapitre III :

Applications, Résultats et Discussion

1. Introduction :

Le docking moléculaire, est un sujet d'étude fondamentale et appliquées, notamment dans le milieu de la recherche pharmaceutique. Pour cela différentes méthodes et algorithmes ont été mise au point pour l'élaboration de cette technique Le rôle principal de cette technique est étudié puis prédire les interactions probables entre des ligands (substrat, activateur ou inhibiteur) et les acides aminés composant la structure de récepteur (protéine). Le docking moléculaire se déroule plusieurs étapes :

- Préparation des ligands
- Préparation de l'enzyme
- Positionner le ligand dans le site actif choisi de la protéine.
- Évaluation des interactions énergétiques potentielles entre le ligand et la protéine.

Ce chapitre présente les résultats de notre étude pratique des interactions entre les différents ligands avec L'enzyme (3OMM) par la méthode du Docking moléculaire en utilisant le logiciel MOE. Cette étude est basée sur les principaux paramètres suivants : le score et les distances entre certains groupements de la chaîne latérale de l'enzyme et ceux ligands et aussi les différents types d'interactions présentes entre certains acides aminés de la protéine étudiée et celle de ligands. Nous allons étudier et présenté également dans ce chapitre quelques propriétés des ligands à savoir, propriétés moléculaires des ligands.

2. Protocole Générale

Notre étude portera sur l'interaction entre le site actif de l'enzyme (3OMM) et les LIGANDE pour former un complexe stable est réalisée à l'aide du logiciel "MOE Molecular Operating Environment (MOE)"[1]. Alors nous avons, schématisé un protocole général de docking moléculaire voir la (Figure III. 1)

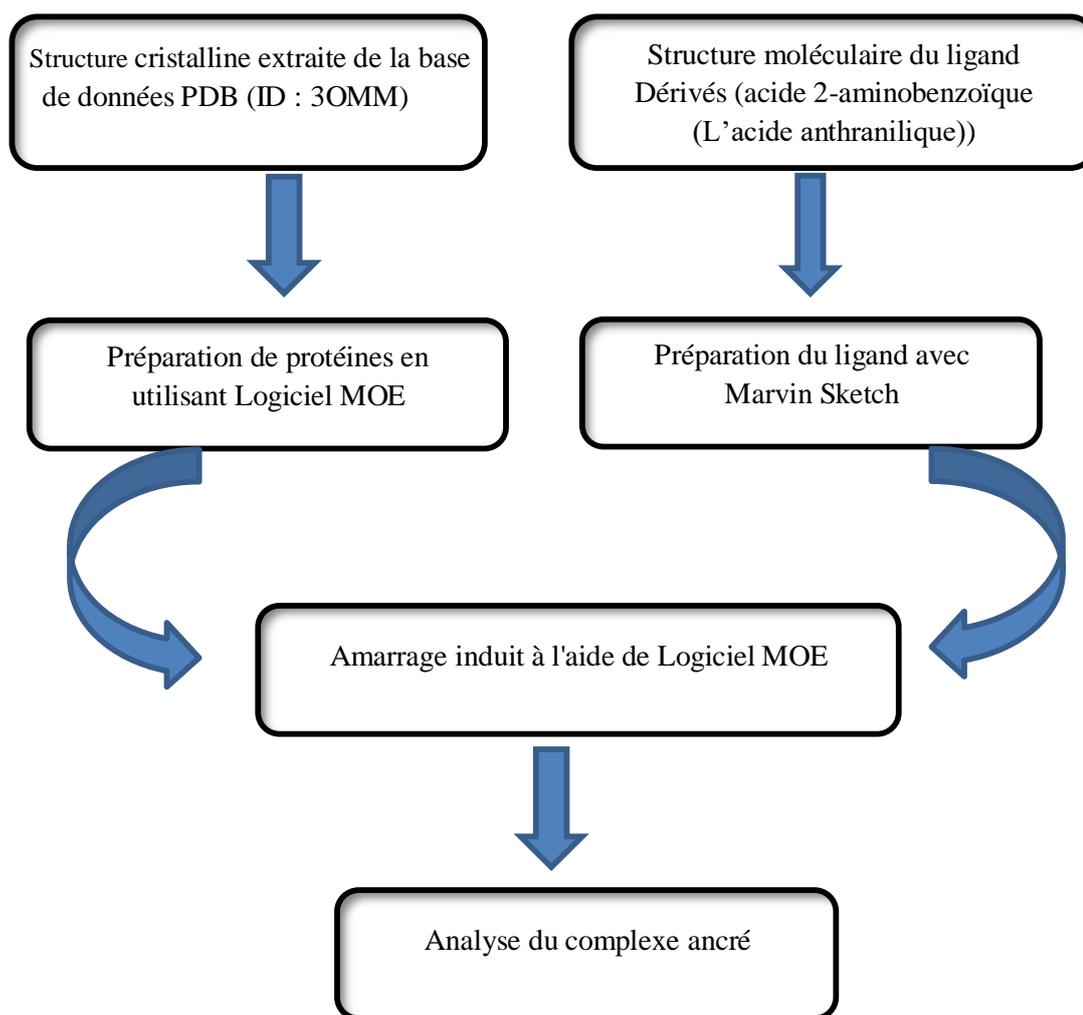


Figure III. 1 Protocole générale de docking moléculaire

3. Matériel Et Outils Utilisés

3.1 Micro-Ordinateur

Dans cette étude, nous avons utilisé un micro-ordinateur ayant un Processeur Intel® Core™ i3 et une mémoire vive de 4 Go, sous le système d'exploitation Windows 10. 64 bits version 2013.

3.2 Banques (Bases) De Données Et Outils Logiciels

Protein Data Bank (Pdb) :

Est la seule archive mondiale de données structurales sur les macromolécules biologiques. Il comprend des données obtenues par cristallographie aux rayons X et résonance

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

magnétique nucléaire (RMN) spectrométrie soumise par des biologistes et biochimistes du monde entier. [2]

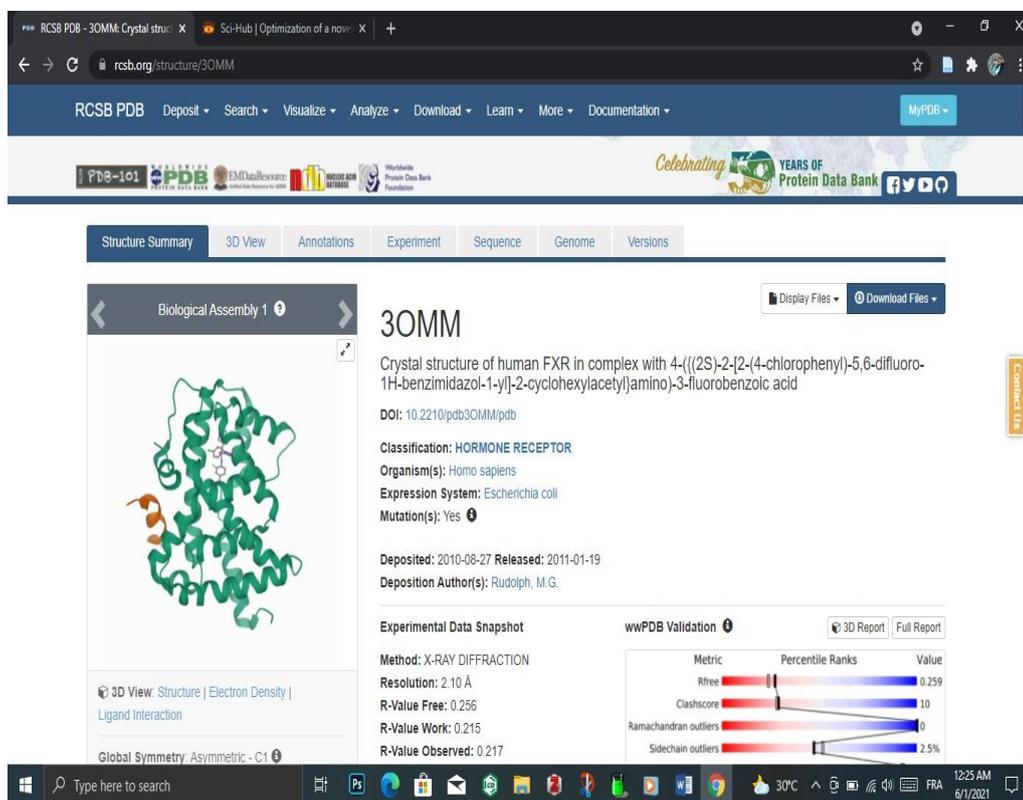


Figure III. 2 montre l'enzyme utilisé sur le site Web Protéine Data Bank

Molinspiration :

Ce logiciel permet de calculer les propriétés physicochimiques des molécules pour la conception des médicaments et de connaître la relation quantitative structure à activité -- (QSAR), y compris le $\log P$, la superficie topologique de la surface polaire (TPSA), et la règle des 5 descripteurs [3].

Moe (Molecular Operating Environment) :

MOE est un package, c'est-à-dire un ensemble de plusieurs logiciels destinés à la découverte et à la conception assistée par ordinateur de molécules biologiquement actives. Celui-ci permet d'effectuer plusieurs tâches pendant un temps très réduit. Il permet de

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

dessiner les molécules, de les minimiser pour avoir les meilleures conformations de ces molécules. Il permet également de docker plusieurs ligands rassemblés dans une base de données dans le site actif d'une protéine de manière successive. MOE présente une forme de docking flexible dans lequel le récepteur et le ligand change de conformation et s'adaptent à l'environnement. [1]

Marvin Sketch :

MarvinSketch est un éditeur chimique avancé pour dessiner des structures chimiques, des requêtes et des réactions. Il possède une liste riche (et croissante) de fonctionnalités d'édition, est sensible aux produits chimiques et est capable d'appeler les plugins de calcul basés sur la structure de ChemAxon pour les structures sur le canevas. [4].

Discovery Studio :

Le visualiseur Discovery Studio est un visualiseur gratuit qui peut être utilisé pour ouvrir des données générées par d'autres logiciels de la gamme de produits Discovery Studio. Il est conçu pour offrir un environnement interactif permettant de visualiser et d'éditer des structures moléculaires, des séquences, des données de réflexion des rayons X, des scripts et d'autres données.

4 Méthodologie Du Travail

4.1 Préparation De L'enzyme

Le téléchargement de l'enzyme FXR a été fait à partir de la base de données Protéine Data Bank (www.rcsb.org/pdb) avec le code d'accès (3OMM) sous format PDB. La structure tridimensionnelle (structure 3D) de 3OMM est correctement définie par diffraction en rayon X avec une résolution égale à 2.10 Å. en complexe avec 4-((2S)-2-[2-(4-chlorophenyl)-5,6-difluoro-1H-benzimidazol-1-yl]-2-cyclohexylacetyl}amino)-3-fluorobenzoicacC28 H23 Cl F3 N3 O3.

Lors de la préparation de l'enzyme simplifier, on a éliminé les deux chaînes C et D ainsi que les molécules d'eau et les cofacteurs (L'enzyme simplifié étant formée par deux chaîne A et B).

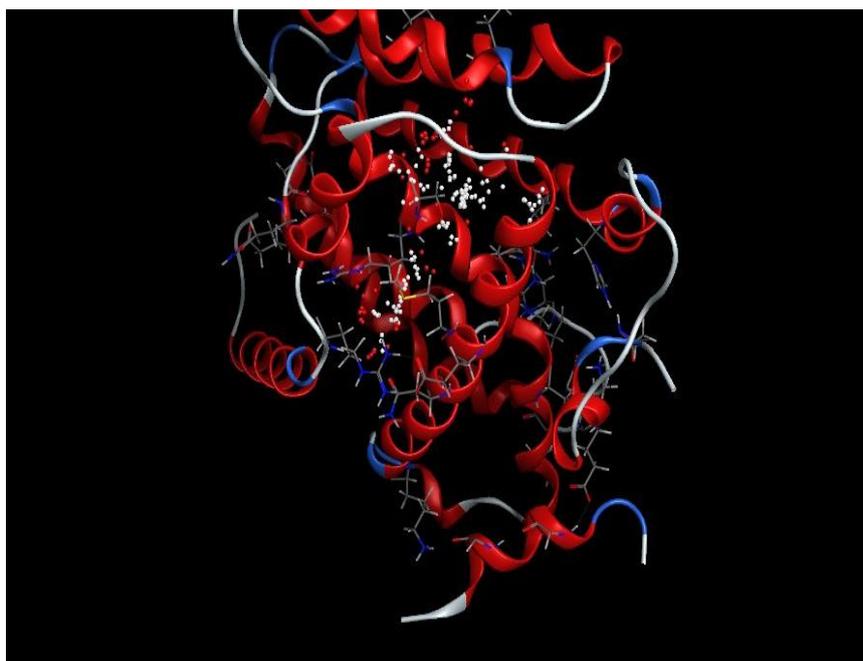


Figure III. 3 Structure 3D de l'enzyme 3OMM simplifié

Laminimisation de l'enzyme (3OMM) a été effectués à l'aide du logiciel MOE, par la méthode de la mécanique moléculaire en utilisant le champ de force (Amber 10 : EHT). La valeur de l'énergie d'optimisation est : **EOpt**= -58.05 Kcal/mol. La structure de Ligand co-cristallisé (OMM) avec l'enzyme (3OMM) est donnée dans la (figure III.3).

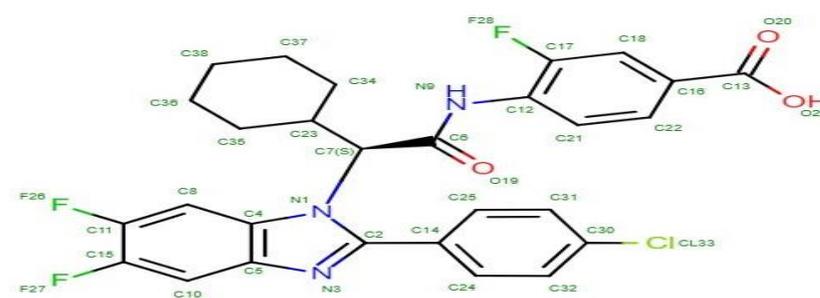


Figure III. 4 Structure chimique d'OMM

4.2 Détection Des Cavités

La fonction des enzymes est liée à la présence dans leur structure d'un site particulier appelé le site actif qui a la forme d'une cavité. Les molécules sur lesquelles agit une enzyme

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

sont définies comme les substrats de la réaction enzymatique. Chaque enzyme reconnaît spécifiquement une ou plusieurs molécules de substrat selon un principe de complémentarité, grâce à des sites de reconnaissance et de fixation situés à sa surface. Le site actif est constitué de deux parties [5]

- **Site De Reconnaissance** (ou site de liaison au substrat), permettant de fixer le substrat grâce à certains acides aminés.
- **Site Catalytique** (ou a lieu la transformation du substrat), permettant de transformer le substrat grâce à des acides aminés qui interagissent avec le substrat.

Dans notre étude 17 cavités ont été détectées dans l'enzyme 3OMM par le logiciel MOE. Nous avons choisi la cavité 1 (Figure III. 5), pour faire notre étude, car elle possède le ligand qui est Co-cristallisé et contient le volume le plus important.

Le tableau 1 présente les différentes caractéristiques de la cavité 1 qui ont été découvertes à l'aide de la fonction "site finder"» fournie par MOE.

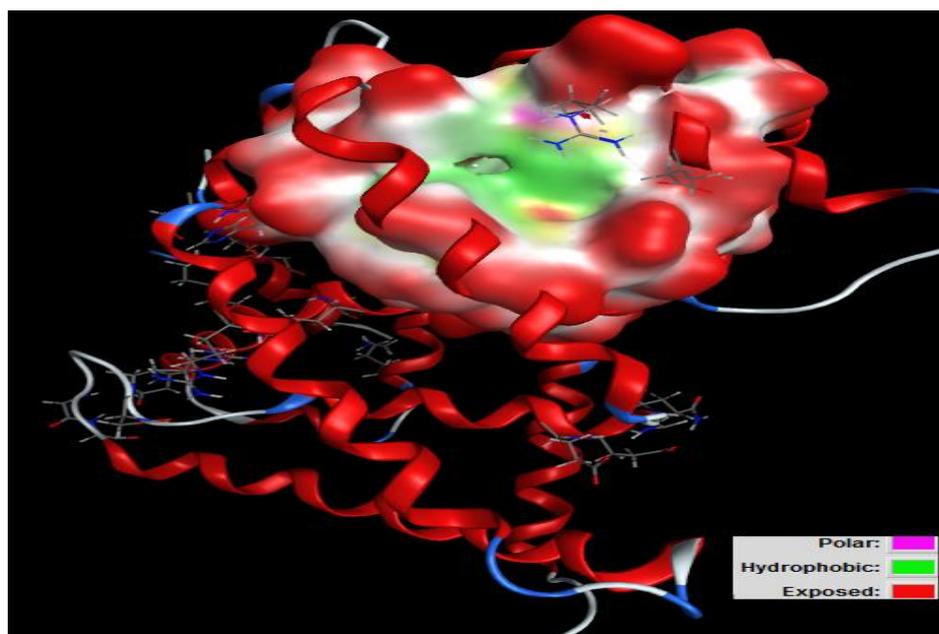
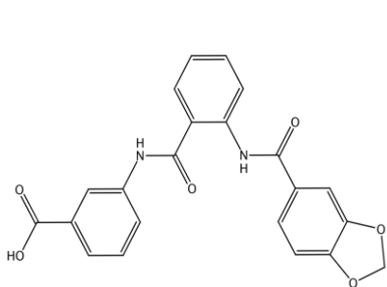
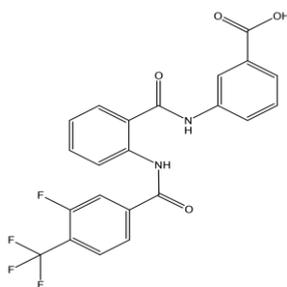


Figure III. 5 Cavité 1 (Pocket) de l'enzyme 3OMM

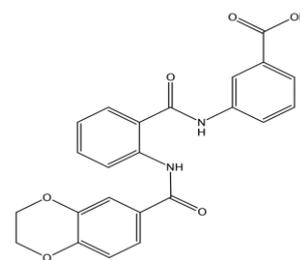
Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions



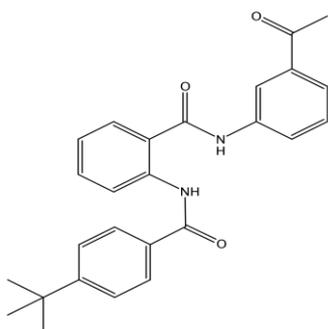
4



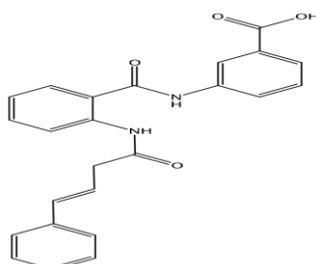
5



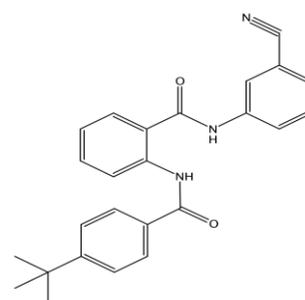
6



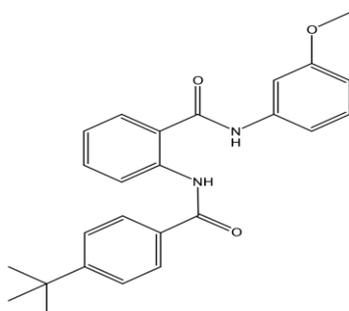
7



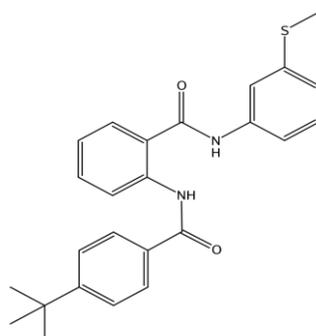
8



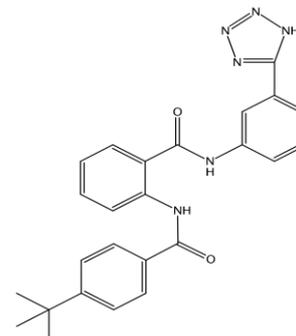
9



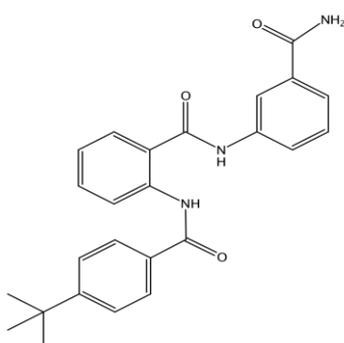
10



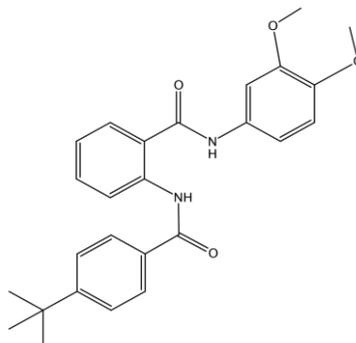
11



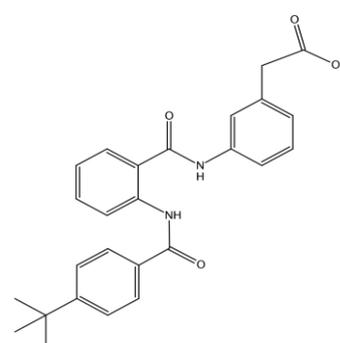
12



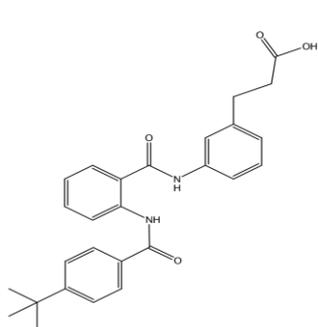
13



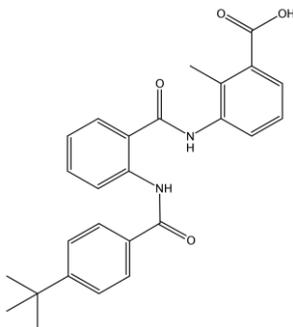
14



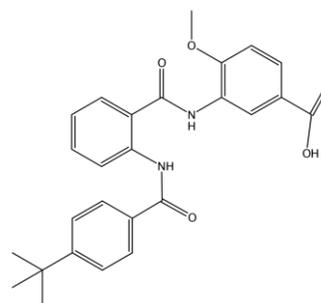
15



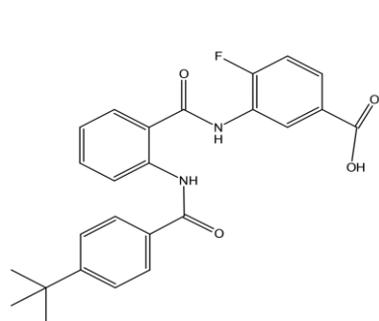
16



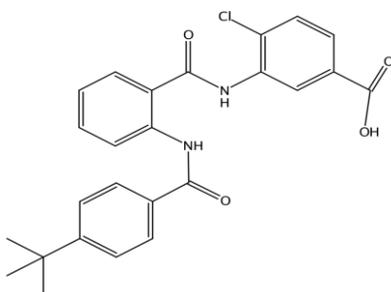
17



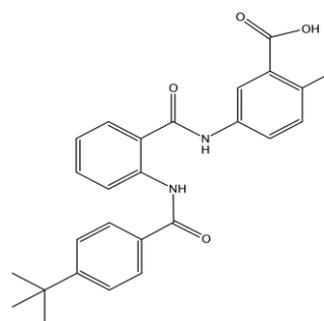
18



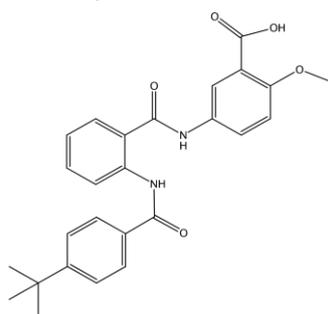
19



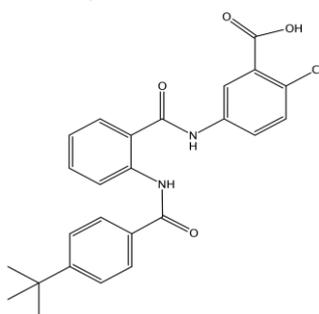
20



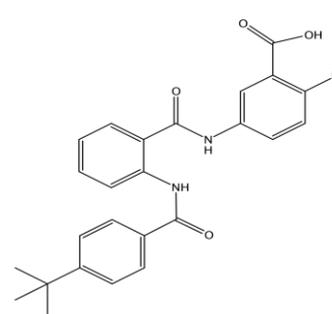
21



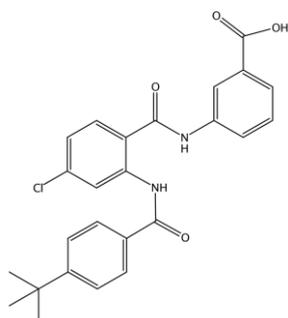
22



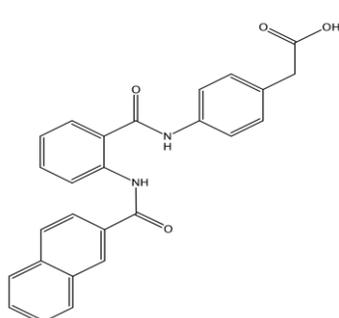
23



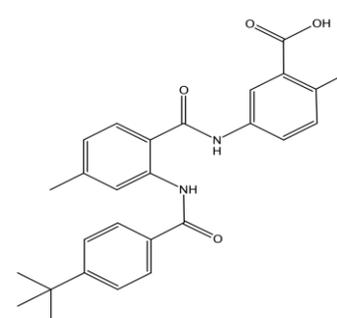
24



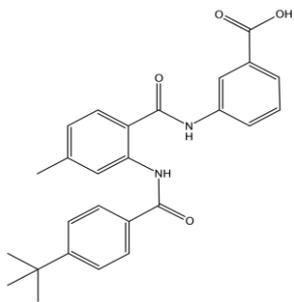
25



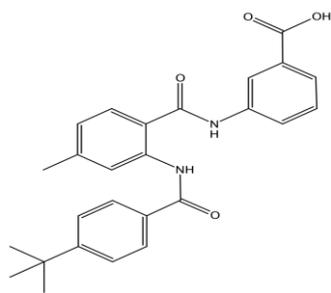
26



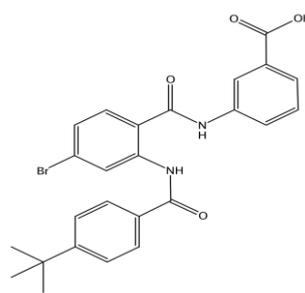
27



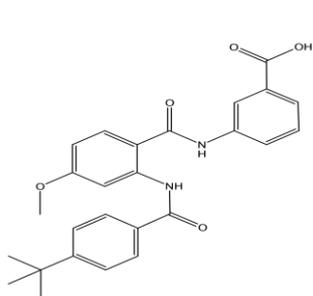
28



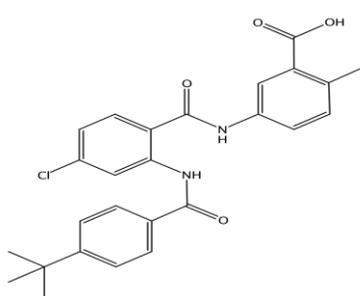
29



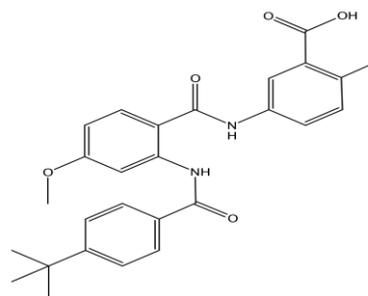
30



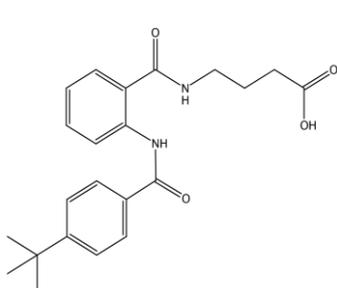
31



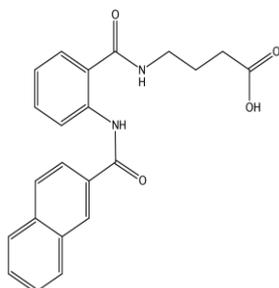
32



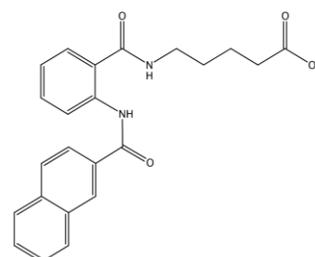
33



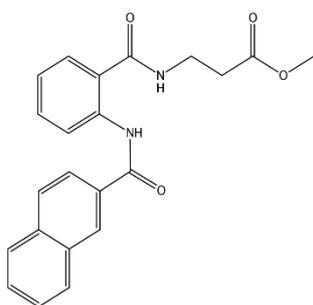
34



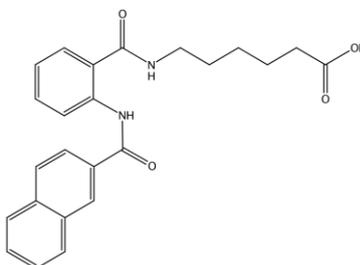
35



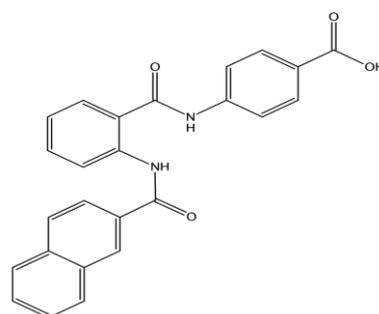
36



37

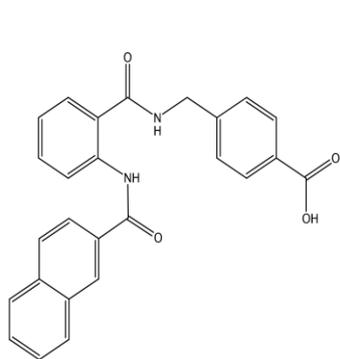


38

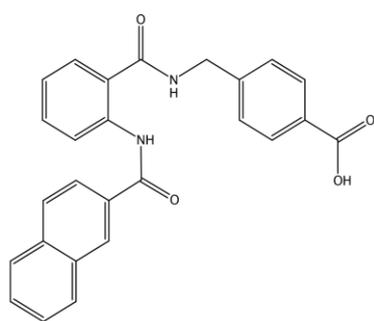


39

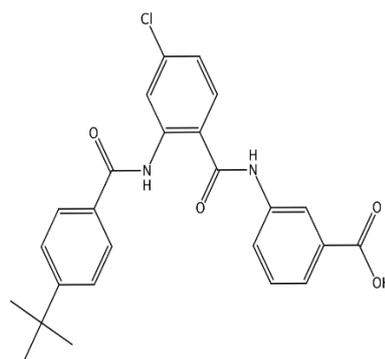
Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions



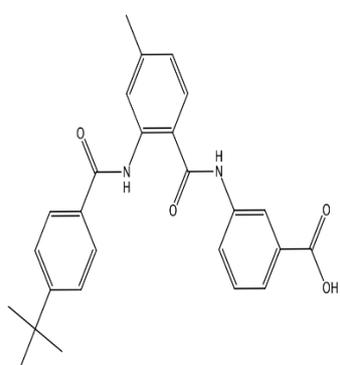
40



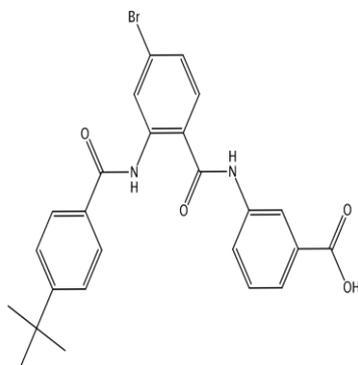
41



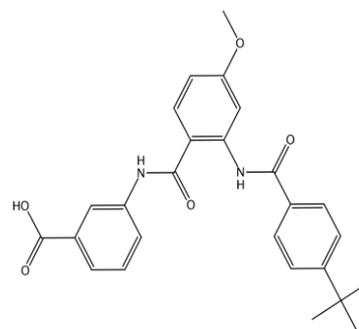
42



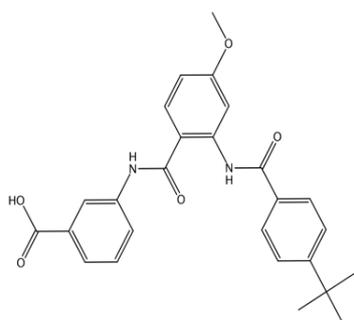
43



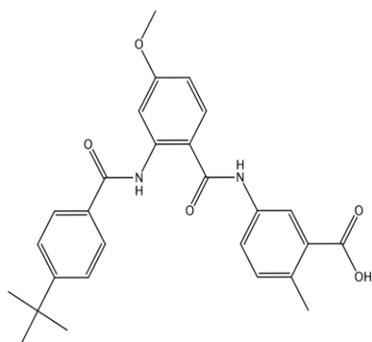
44



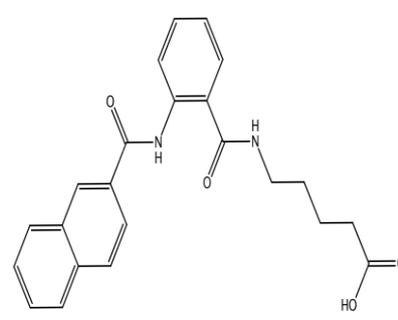
45



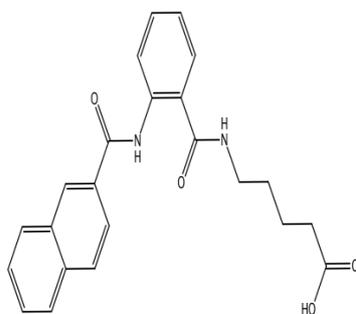
46



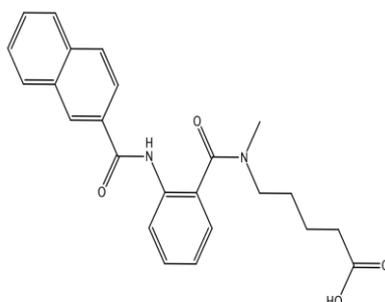
47



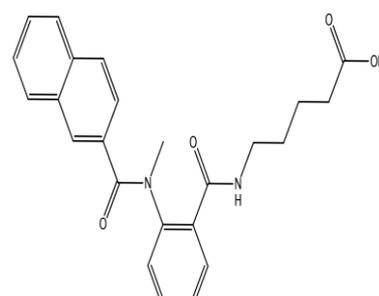
48



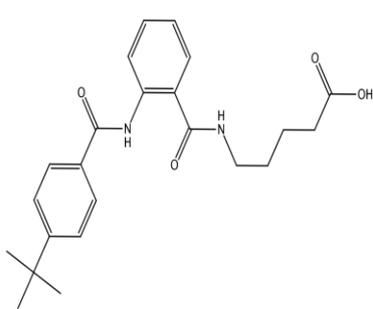
49



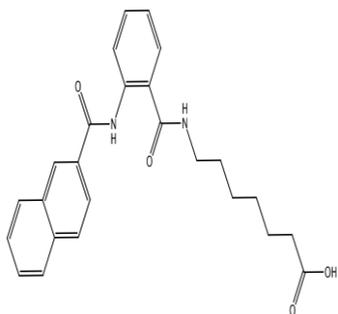
50



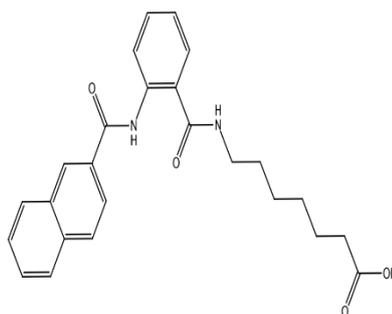
51



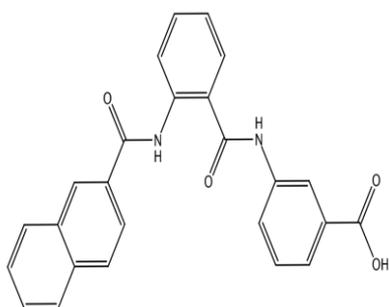
52



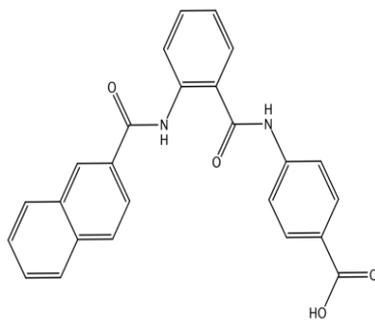
53



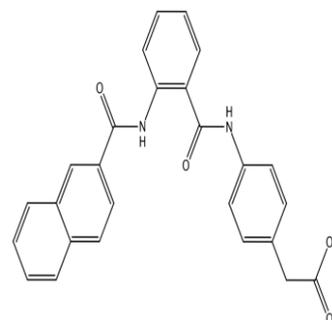
54



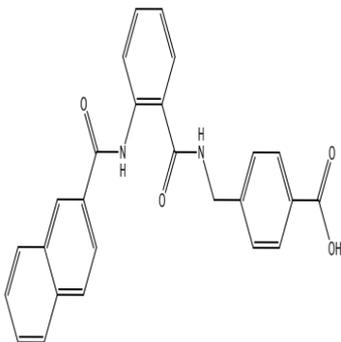
55



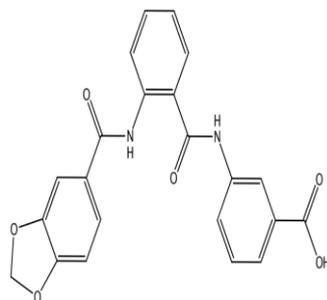
56



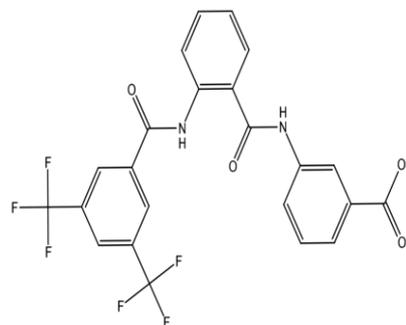
57



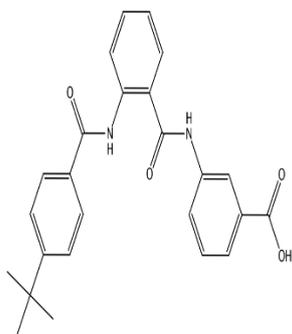
58



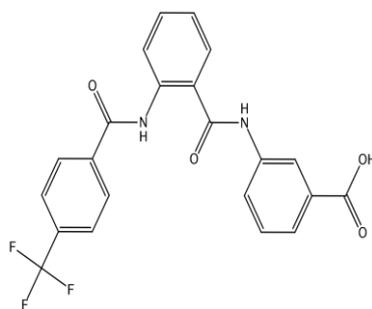
59



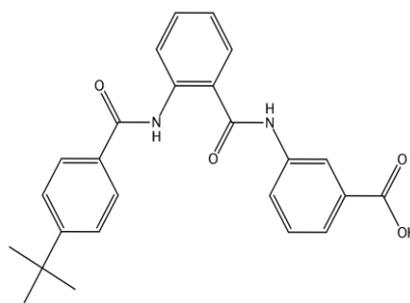
60



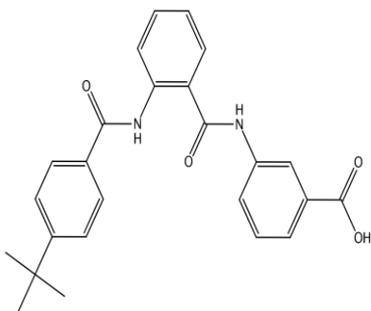
61



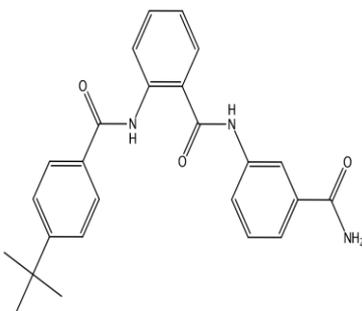
62



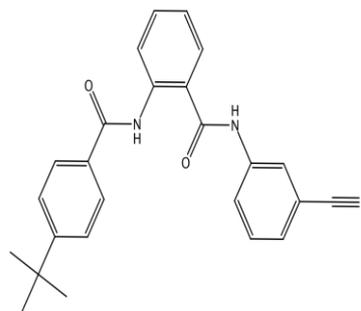
63



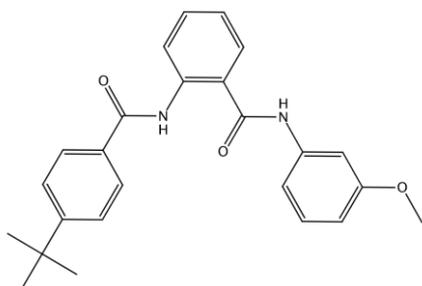
64



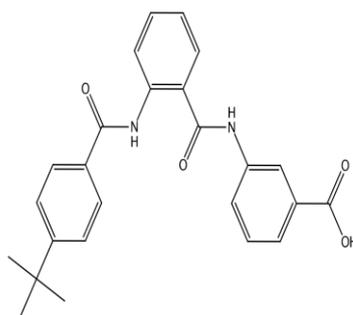
65



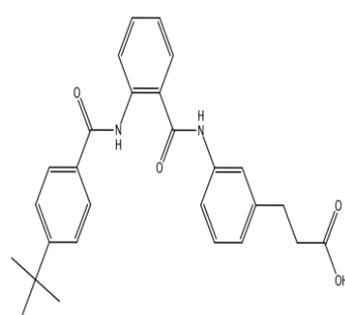
66



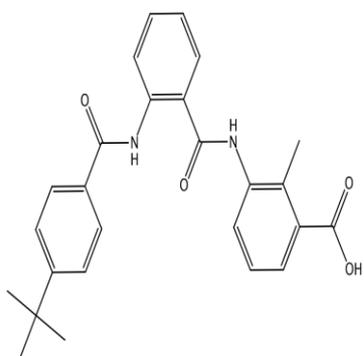
67



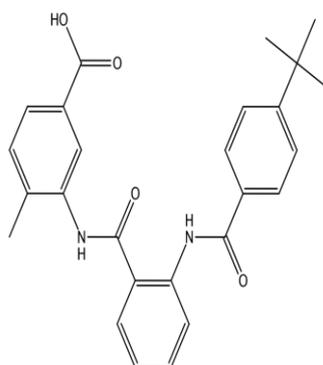
68



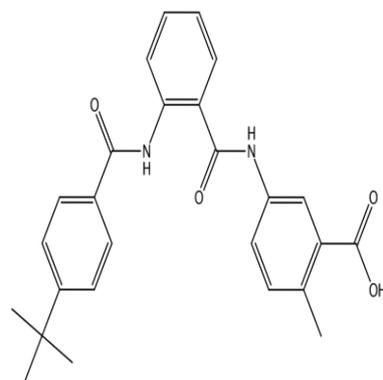
69



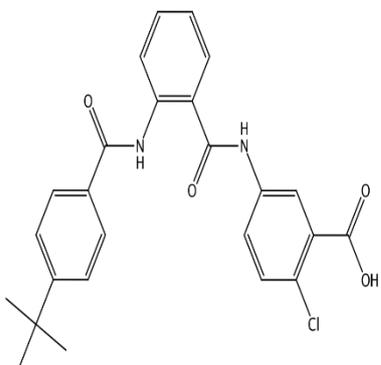
70



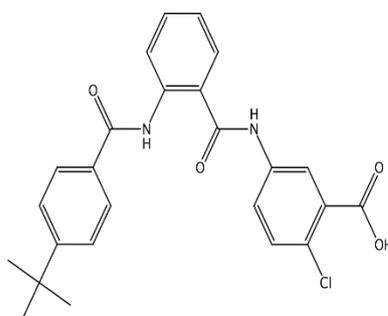
71



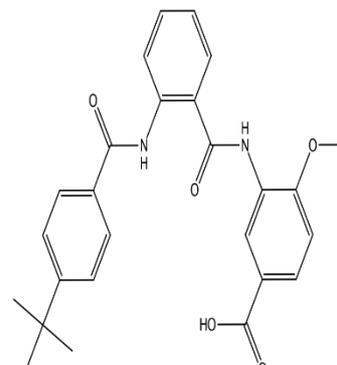
72



73



74



75

4.4 Simulation Du Docking Moléculaire

L'étude de l'interaction entre le site actif de la protéine 3OMM et les dérivés de L'acide anthranilique pour former des complexes stables est réalisée à l'aide du logiciel MOE, une fois que le complexe ligand-récepteur est formé, celui-ci va adapter la conformation la plus stable, c'est à dire le niveau énergétique le plus faible. Le processus de Docking comprend deux étapes fondamentales : la prévision de la conformation du ligand ainsi que sa position et son orientation au sein de ces sites (généralement appelés pose) et l'évaluation de l'affinité de liaison [6].

4.5 Prédiction Des Propriétés Moléculaires Des Ligands

Des descripteurs moléculaires et des propriétés Drug likeness basé sur la règle de lipinski (Règles de cinq), sont analysés, en utilisant l'outil serveur Molinspiration (<http://www.molinspiration.com>).

5- Résultats Et Discussion

5-1 Résultats Du Docking Moléculaire

Avant de détailler les résultats de l'étude des interactions enzyme-ligand, nous allons tout d'abord présenter les résultats de scores (Kcal/mol) pour chaque ligand (Tableau III. 3). Sachant que :

Le scores : représente les interactions liées à l'électrostatique (comme les liaisons hydrogène et les interactions de VdW), les effets de solvation et de désolvation et l'énergie nécessaire pour déformer le ligand [7]. Le score devrait correspondre directement à l'affinité de liaison en du ligand pour la protéine, de sorte que les ligands présentant le meilleur score soient les meilleurs liants [8]. En général, une pose de ligand est finalement sélectionnée en fonction d'un score d'amarrage [9]. C'est-à-dire, le choix de la pose est correspondu à la structure qui a l'énergie la plus basse.

Résultats du Docking moléculaire sont reportés dans le **Tableau III. 3** qui présentent l'énergie d'interaction entre le ligand et la protéine (Tableau III. 3)

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

Tableau III. 3 Résultats de SCORE de Récepteur 3 OMM avec les ligands étudiés

Composé N°	S-score (kcal mol)	Composé N°	S-score (kcal mol)
01	-8.36	39	-8.17
02	-8.29	40	-6.95
03	-8.32	41	-8.21
04	-8.69	42	-7.75
06	-8.04	43	-7.28
07	-8.30	44	-7.09
08	-8.67	45	-7.76
09	-8.25	46	-6.88
10	-6.70	47	-6.72
11	-8.10	48	-6.31
13	-7.14	49	-7.86
14	-7.13	50	-8.55
15	-8.01	51	-8.80
16	-8.06	52	-8.07
17	-7.31	53	-8.45
18	-7.71	54	-8.84
19	-7.79	55	-8.04
20	-8.22	56	-7.69
21	-7.17	57	-8.07
22	-7.26	58	-8.61
23	-8.13	59	-8.21
24	-8.04	60	-7.34
25	-7.66	61	-8.04
26	-8.44	62	-8.28
27	-6.85	63	-8.29
28	-7.57	64	-6.59
29	-6.62	65	-7.882
30	-7.73	66	-7.94
31	-8.05	67	-8.09
32	-7.38	68	-8.26

33	-8.34	69	-7.63
34	-7.77	70	-7.31
35	-7.19	71	-7.57
36	-7.79	72	-7.13
37	-7.91	73	-8.48
38	-8.86	74	-7.58
L ref	-8.24	75	-8.22

Les composés sélectionnés en gras représentent les meilleurs ligands, qu'on va étudier leurs interactions.

5.1.1 Étude Des Interactions Enzyme-Ligand De Référence

Dans l'objectif de conception des nouveaux agonistes de la 3OMM, il nous a semblé judicieux d'étudier, en premier lieu, le mécanisme d'activation mis en place par le meilleur composé réellement actif sorti du criblage total. Il s'agit du ligand de référence OMM issue de la chimiothèque d'évaluation utilisée dont le score s'évalue à "-8.24 kcal/mol". La visualisation des interactions de ce composé au sein du site actif de la 3OMM a été réalisée à l'aide du logiciel studio Discovery.

On observe que : le ligand OMM a établi 14 liaisons avec le récepteur 3OMM : dont 3 de type liaison hydrogène qui se forment respectivement entre l'atome d'oxygène, l'atome H14, l'atome F28 et les résidus ARG335, SER 336 du enzyme ils sont séparés à la distance de 2,44 Å, 2,27 Å, 1,84 Å.

D'autres liaisons de type hydrophobe interviennent également pour stabiliser le complexe : deux liaisons se forment successivement entre le cyclohexane et les résidus ILE339, ILE 356 de l'enzyme séparés par une distance de 5,15 Å, 4,90 Å. D'autres liaisons se forment respectivement entre le cyclo benzène, un atome de chlore et les résidus ILE356, ILE277. de l'enzyme sont séparés par une distance de 5,15 Å, 4,90 Å.

Il y a aussi des liaisons qui se forment respectivement entre le cyclo benzène, le 2 H -imidazole et le résidu LEU291 elles sont séparées avec des distances de 4,66 Å, 4,62 Å, et trois interactions avec les résidus du site actif : deux de type H-donneur fort (entre le cyclo

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

benzène et le résidu MET294, ILE273) avec des distances de 4,71 Å, 4,90 Å, La dernière liaison de type halogène entre l'atome F et le résidu MET332 de l'enzyme (2,9 6 Å).

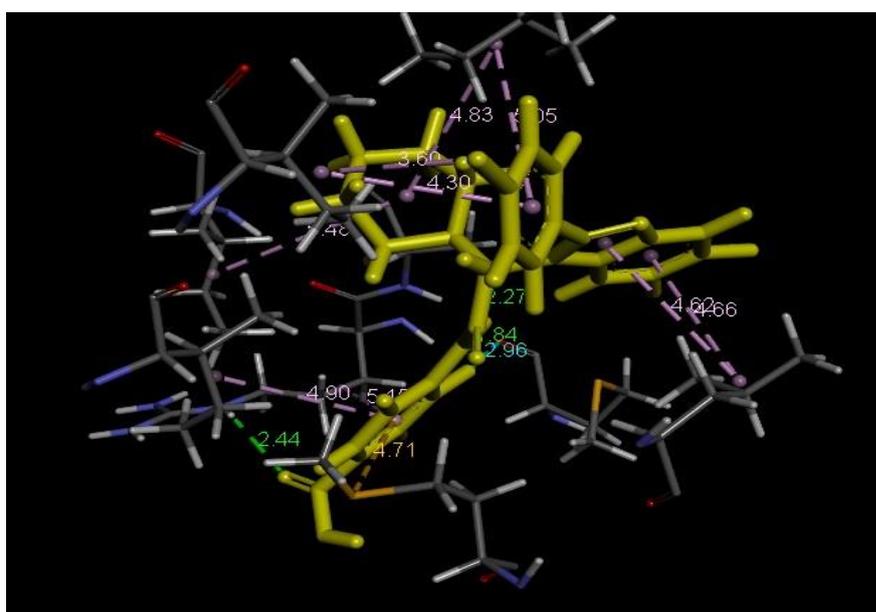
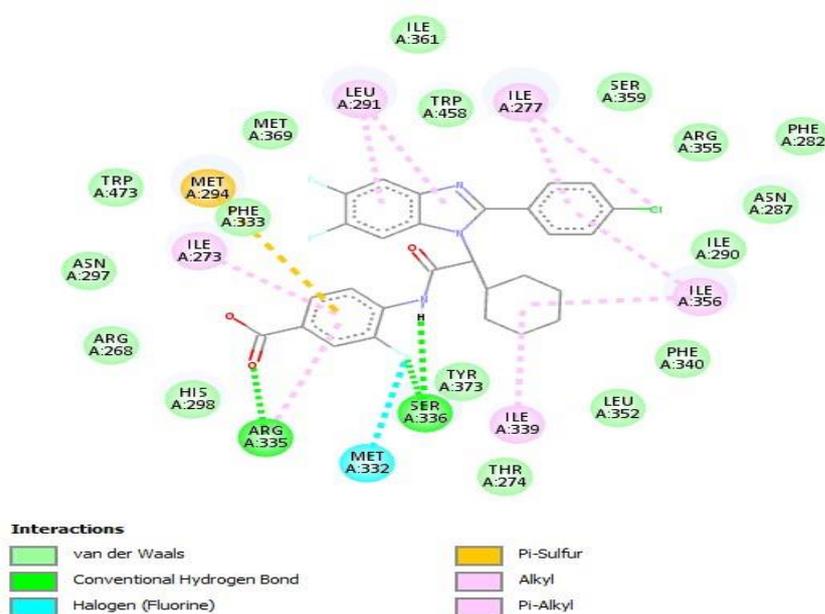


Figure III. 6 Interactions entre le ligand de référence et les résidus de site actif de 3OMM

5.1.2 Étude Des Interactions Enzyme- Les Ligands

Les résultats obtenus montrent que 18 ligands formant un complexe stable avec l'enzyme 3OMM. Cette étude est effectuée sur les cinq meilleurs ligands (L38, L54, L51,

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

L4, L7), Les résultats des interactions entre ces ligands et l'enzyme 3OMM sont présentés dans le (Tableau III.4).

Tableau III.4 les interactions entre les résidus du site actif et les atomes des ligands pour 3OMM

Compound s	Hydroge n bonds	Hydrophobic interaction	Other bonds	E Kcal/mol
1	//	ILE356,ILE277,MET294,ARC335, HIS298 ,MET332,ILE273,LEU298.	//	-8.36
2	ARG335	MET454,TRP473,LEU455,LEU298 ,PHE333,MET369,ILE365,ILE339, MET294,ILE273.	MET333	-8.29
3	ARG335	MET454,LEU454,TRP473,PHE333 MET336,LEU291,ILE356,ILE339, MET294,ILE273,ARG335.	MET332	-8.32
4	SER336 MET332	ILE339,ILE356,PHE333,MET369, LEU291,MET332,ILE277.	MET332	-8.69
7	SER359 ILE356 SER336	ARG335,HIS298,ILE290,ILE277, ILE356.	ARG268	-8.67
8	//	ILE273,MET294,ILE277,ILE356, LEU291.	//	-8.25
26	ARG335 SER336	ILE356,ILE339,ILE273,LEU291 MET454.	MET332 MET294	-8.44
33	SER336	LEU291,MET369, ILE356, ILE339, PHE333, MET454.	MET332	-8.34
38	HIS298 SER336	MET294, ILE 273, LEU291, ILE356	MET332	
50	ARG335	MET332,LEU291,MET294,ILE273 ILE356,ILE339,MET369	MET332	-8.55
51	TYR373 ARG335 HIS298 SER336	ILE277,LEU291,MET294,ILE273, ILE339, MET356.	MET332	-8.80

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

	ARG335			
53	ARG268 ASN297 SER336	ILE339, ILE356, MET234, ILE273, LEU291, MET454	MET332	-8.45
62	ARG335	TRP473, MET454, LEU455, LEU291 PHE333, MET339, ILE356, ILE339, MET294, ILE273.	//	-8.28
63	//	ARG335, HIS298, ILE273, MET294, LEU291, ILE356, ILE277.	//	-8.29
68	//	ILE277, 356, ILE273, MET294, ARG 335, HIS298.	//	-8.26
73	SER336	PHE333, LEU298, MET399, ILE356, MET294, ILE273.	//	-8.48
L_{ref}	ARG335, SER336	ILE 339, ILE356, ILE356, ILE277 LEU291, MET294, ILE273	MET 332	-8.24

D'après les résultats obtenus, On remarque que les complexes formés par les ligands L38, L54, L4, L7. Possèdent une énergie (Score) le plus faible possible par rapport aux autres ligands même par rapport au complexe qui est formé par le ligand de référence avec 3OMM.

D'après les rapports de docking précédents On peut classer ces ligands selon l'ordre suivant : $L_{38} < L_{54} < L_{51} < L_4 < L_7 < L_{Réf}$ On peut remarquer aussi les valeurs de Score sont très proche à la valeur du Score du ligand de référence.

Les résultats ont également révélé les acides aminés suivants, ARG335, SER336, MET294, MET333, ILE339, LEU291, ILE273, MET454, ILE277, MET369, ILE356, Met294, Phe333, se sont avérés jouer un rôle important dans les conformations les plus favorables, ils se sont également avérés être les résidus clés interagissant dans le site actif de la cible. De plus, ARG335, SER336 (interactions de liaison H), MET294 et ILE339 (interactions hydrophobes) étaient les plus dominants, ils ont donc été impliqués dans de nombreux cas possibles pour former les complexes amarrés.

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

D'après Anne Imbert et al [10], les interactions ayant des distances comprises entre 2.5 Å et 3.1 Å sont considérées comme fortes et celles comprises entre 3.1 Å et 3.55 Å sont supposées moyennes et quand leurs distances sont supérieures à 3.55 Å elles sont considérées faibles

Les structures des molécules qui ont la meilleure affinité dans le site actif de la FXR montrent que la présence de deux fonctions azotées des amides dans la structure pourrait contribuer à la liaison au récepteur nucléaire via des ponts hydrogène et la présence de groupe naphthalène dans la structure augmente la capacité de formation de type d'interaction hydrophobique.

L'affinité de liaison plus élevée peut être attribuée au plus grand nombre de liaisons hydrogène dans le complexe, entre le ligand et la protéine.

Nos résultats sont complétés par une analyse visuelle des interactions de chaque molécule avec Structure cristalline du FXR humain.

1) Interactions 3OMM – L38 (Figure III. 7)

Avec le score le plus petit qui s'évalue à -8.86 kcal/mol. L'analyse visuelle montre que le ligand 38 en formant 9 liaisons avec le récepteur 3OMM : Dont les deux premières liaisons de type hydrogéné bond et qui sont formées respectivement entre l'atome O 4, l'atome H 5, et les résidus HIS298, SER336 de l'enzyme ils sont séparés avec les distances de 2.66Å, 2.27Å. Les 5 autres liaisons sont hydrophobes et interviennent également pour stabiliser le complexe : les deux premières liaisons se forment respectivement entre l'atome C16 et les résidus MET 294, ILE 273 de l'enzyme elles sont séparées à une distance de 4,27 Å, 5,02 Å. la troisième et la quatrième liaison (entre le naphthalène et le résidu LEU291). De l'enzyme, ils sont séparés avec des distances de 4,72 Å, 4,74 Å. La sixième liaison se forme entre le cyclo benzène et le résidu ILE 356 de l'enzyme à une distance de 4,95 Å. Les deux dernières liaisons Pi-soufre se forment respectivement entre le naphthalène et le résidu MET 332 de l'enzyme, elles sont séparées par des distances de 5,54 Å, 5,17 Å.

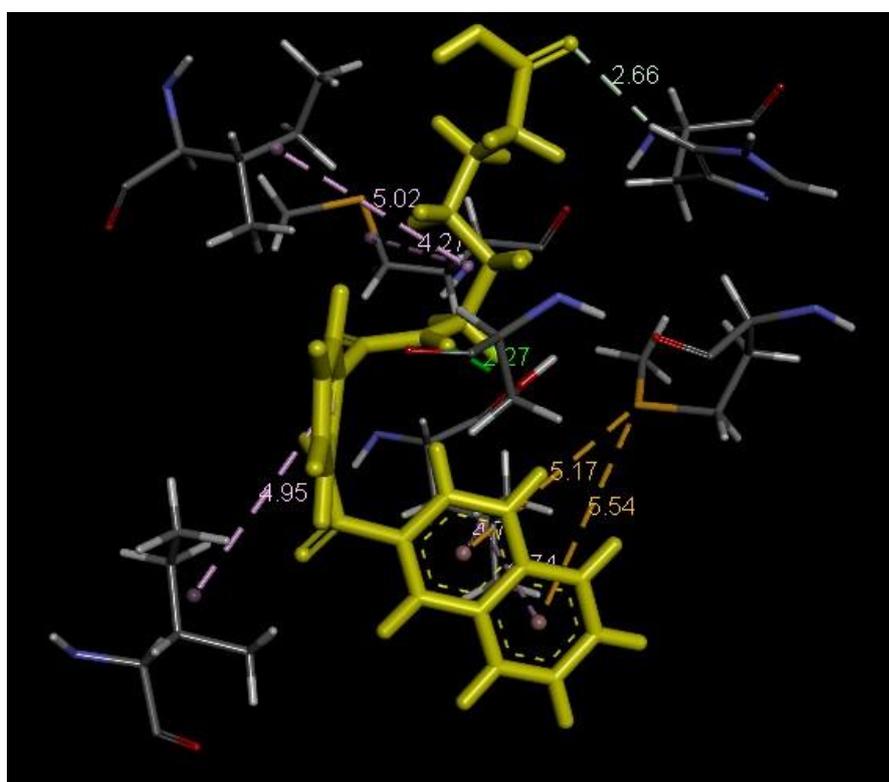
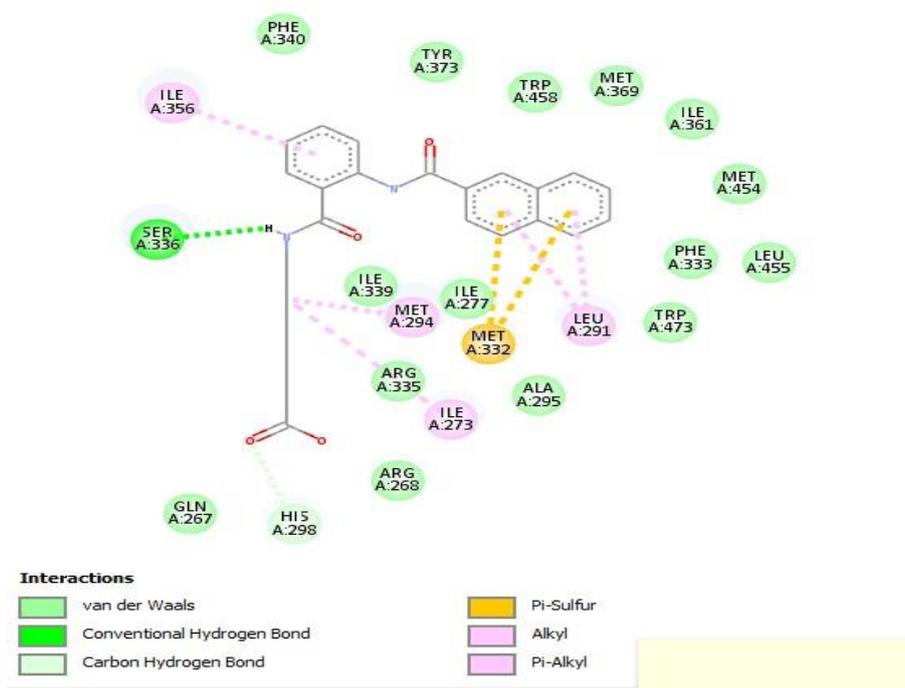


Figure III. 7 Interactions entre le ligand 38 et les résidus de site actif de 30MM

2) Interactions 3OMM – L54 (Figure III. 8)

Les résultats montrent que le ligand 54 est caractérisé par un score de $-8,84\text{kcal/mol}$. L'analyse visuelle montre que le ligand 54 se forme 13 liaisons avec le récepteur 3OMM :

Y compris une liaison de type liaison hydrogène formée entre l'atome O4 et le résidu ARG335 de l'enzyme à une distance de $2,30\text{Å}$.

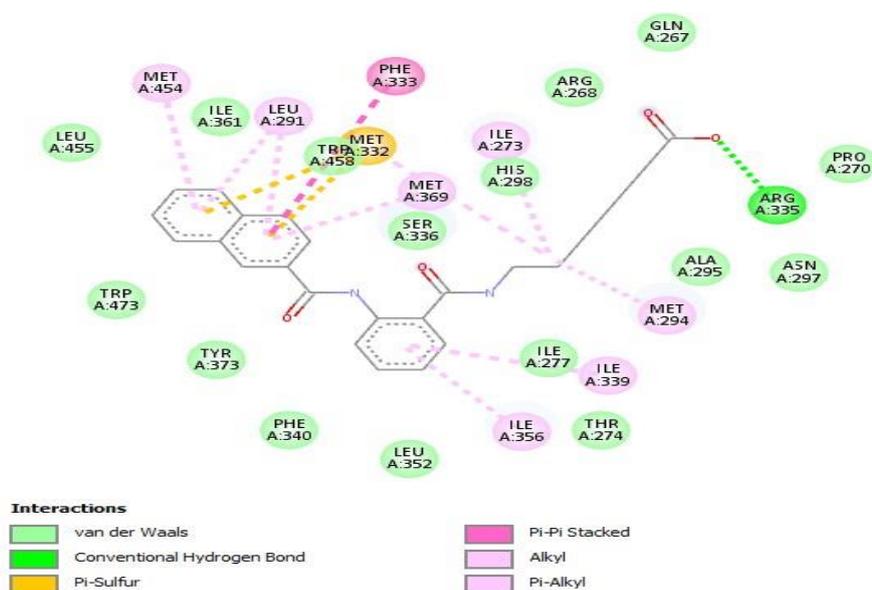
Les 10 autres liaisons sont de type hydrophobe interviennent également pour stabiliser le complexe :

Deux liaisons se forment entre le cycle benzénique et les résidus ILE 356, ILE 396 de l'enzyme elles sont séparées avec des distances de $4,75\text{Å}$, $5,35\text{Å}$ respectivement.

Les 3 liaisons entre l'atome C14 et les résidus MET294, ILE273, MET369 De l'enzyme ils sont séparés avec des distances de $4,64\text{Å}$, $5,35\text{Å}$, $5,20\text{Å}$.

Les 4 autres liaisons entre le naphtalène et les résidus MET369, PHE333, LEU291, MET454 de l'enzyme à une distance de $4,99\text{Å}$, $5,82\text{Å}$, $5,16\text{Å}$, $4,49\text{Å}$.

Les deux dernières liaisons Pi-soufre se forment entre le naphtalène et le résidu MET 332 de l'enzyme elles sont séparées à des distances de $5,25\text{Å}$, $5,91\text{Å}$.



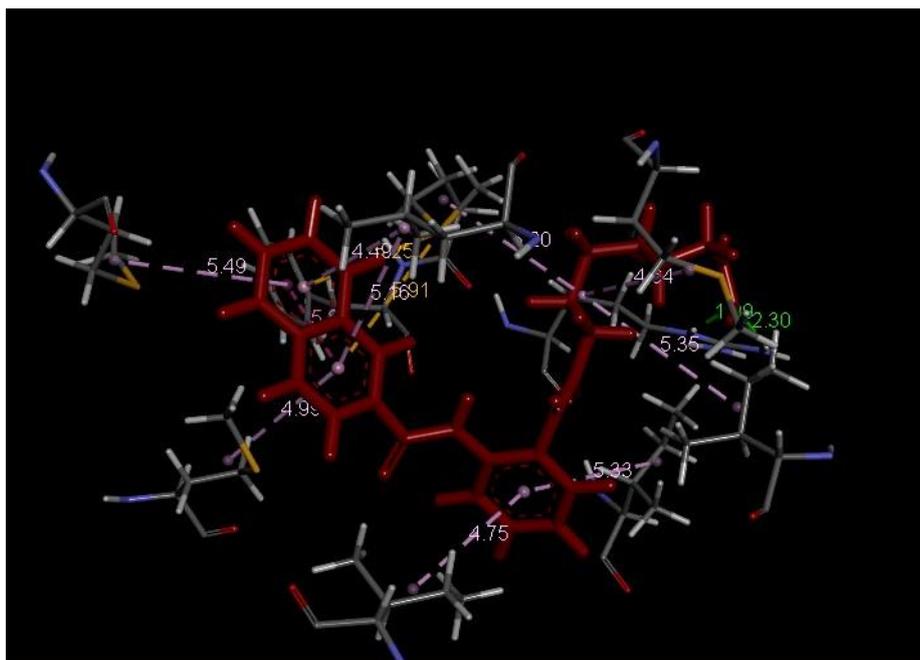


Figure III. 8 Interactions entre le ligand 54 et les résidus de site actif de 3OMM

3) Interactions 3OMM – L51 (Figure III. 9)

Les résultats montrent que le ligand 38 est caractérisé par un score de -8,84 kcal/mol. L'analyse visuelle montre que le ligand 54 se fixe fermement au site cible de 3OMM : Dont les deux premières liaisons de type liaison hydrogène entre l'atome O 4, O 1 et les résidus ARG335, TYR373 de l'enzyme elles sont séparées à des distances de 2,70 Å, 2,59Å. Le composé également affiché 10 contacts sont de type hydrophobe interviennent également pour stabiliser le complexe : 4 liaisons se forment entre le C 14 et les résidus ILE277, LEU291, MET294 de l'enzyme ils sont séparés avec des distances de 5,45 Å, 5,01 Å, 4,74 Å, 4,97 Å. Et trois liaisons entre le cycle benzénique et les résidus MET294, ILE273, MET369, de l'enzyme ils sont séparés avec des distances de 5,47Å, 5,35 Å, 5,47 Å. Il existe également trois liaisons entre H 14 et les résidus ILE356, ILE 277, LEU291 de l'enzyme ils sont séparés par des distances de 5,13Å, 4,95Å. Et des liaisons se forment entre le naphthalène et les résidus MET369, LEU291 de l'enzyme avec des distances de 5,37 Å, 4,65 Å. Les deux dernières liaisons Pi-soufre entre le naphthalène et le résidu MET 332 (5,17Å, 5,5 Å.)

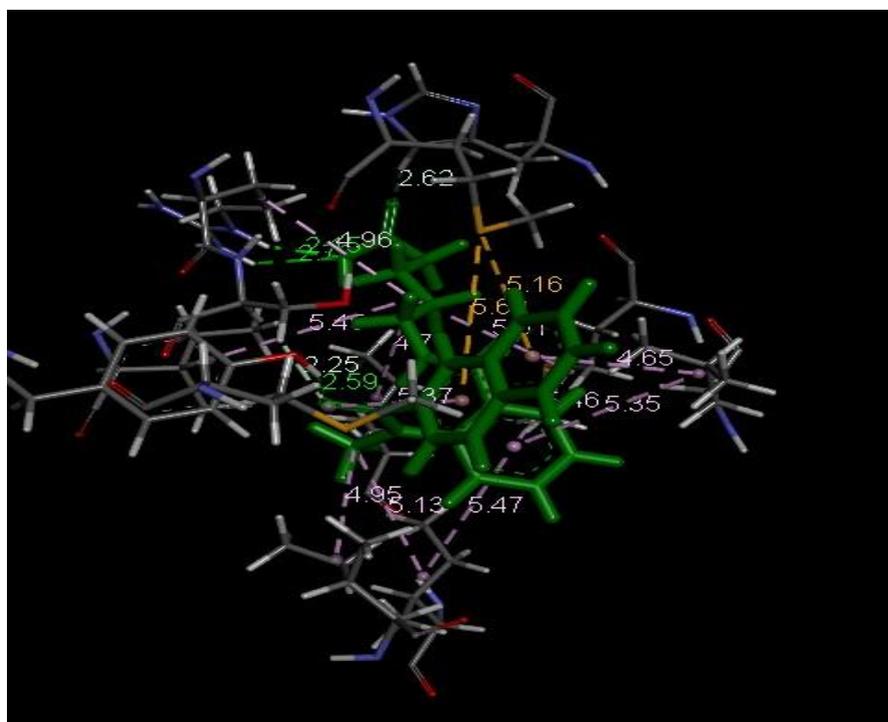
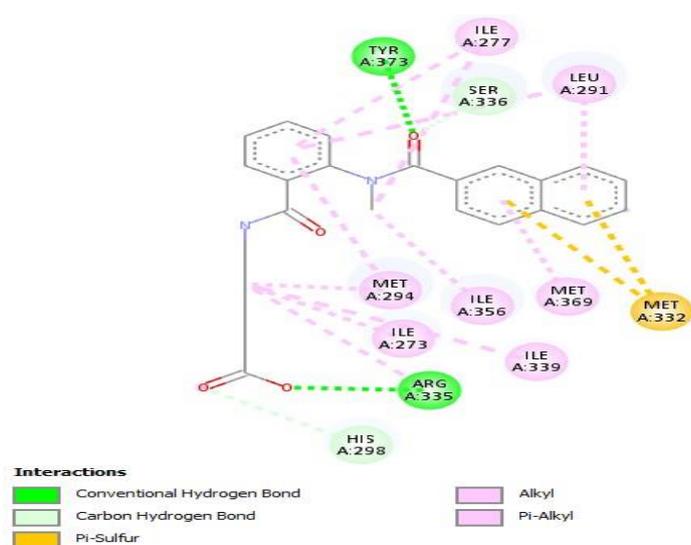
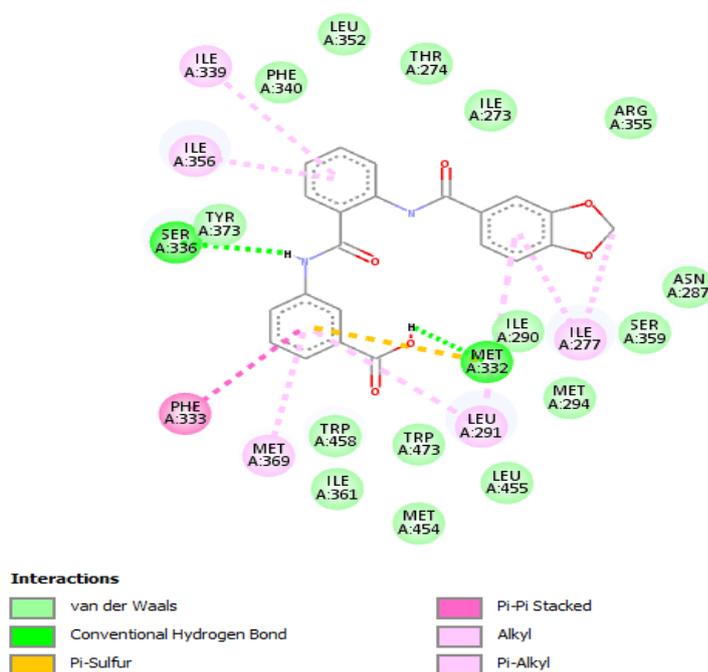


Figure III. 9 Interactions entre le ligand 51 et les résidus de site actif de 3OMM

4) Interactions 3OMM – L4 (Figure III. 10)

Les résultats montrent que le ligand 4 est caractérisé par un score de -8,69 kcal/mol. L'analyse visuelle a montré que le ligand 4 et le récepteur 3OMM formaient 12 liaisons : deux liaisons hydrogène se formaient entre les atomes H 5 et H 14 et les résidus enzymatiques MET332 et SER336, et ils étaient séparés par une distance de 2,61Å, 2,28Å respectivement. Les 8 autres liaisons sont hydrophobes et interviennent pour stabiliser le complexe : par exemple, les 3 liaisons entre le cycle benzénique et les résidus PHE333 LEU291 et ILE369 de l'enzyme ont une distance de 5,53, 5,10 et 5,11. La distance entre les deux liaisons entre le cycle benzénique et les résidus LEU291 et MET369 de l'enzyme est de 5,37 et 5,10, respectivement. 6. La liaison se forme entre le 1,3-dioxane et le résidu ILE 277 (4,19Å). 7, 8. Les formes de liaison entre le cycle benzénique et les résidus ILE359, ILE 356 (5.14Å, 4.94Å.) sont respectivement Et deux liaisons Pi-soufre entre le cycle benzénique et le résidu MET 332 (5,50Å.).



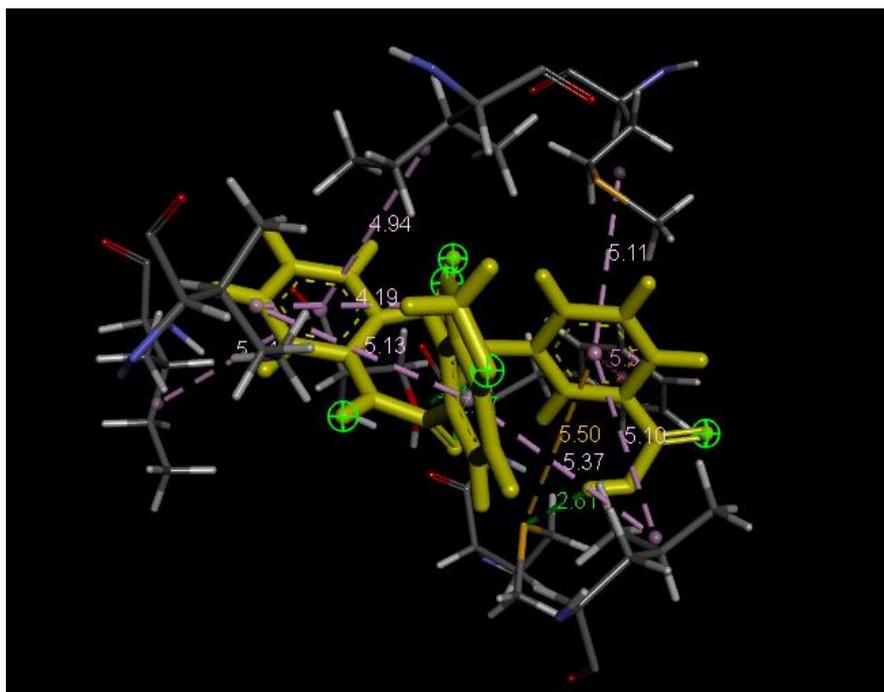


Figure III. 10 Interactions entre le ligand 4 et les résidus de site actif de 3OMM

5) Interactions 3OMM – L7 (Figure III. 11)

Les résultats montrent que le ligand 7 est caractérisé par un score de -8,30 kcal/mol. L'analyse visuelle montre que le ligand 7 et le récepteur 3OMM forment 9 liaisons : dont trois liaisons (2,57Å, 2,88Å, 2,66Å) de type liaison hydrogène entre les atomes O 3 et O 4 et les résidus SER359, ILE356 et SER336. Six autres liaisons hydrophobes sont également impliquées pour stabiliser le complexe : les trois premières liaisons entre le cycle benzénique et les résidus ARG335, HIS298 et ARG268 de l'enzyme sont séparées (5,06 Å, 5,27 Å, 2,91 Å). Deux liaisons se forment entre le cycle benzénique et les résidus ILE 290 et ILE 277 de l'enzyme, respectivement, à une distance de 5,40 et 4,80. Et la liaison entre le cycle benzénique et le résidu ILE 356 (9,40 Å).

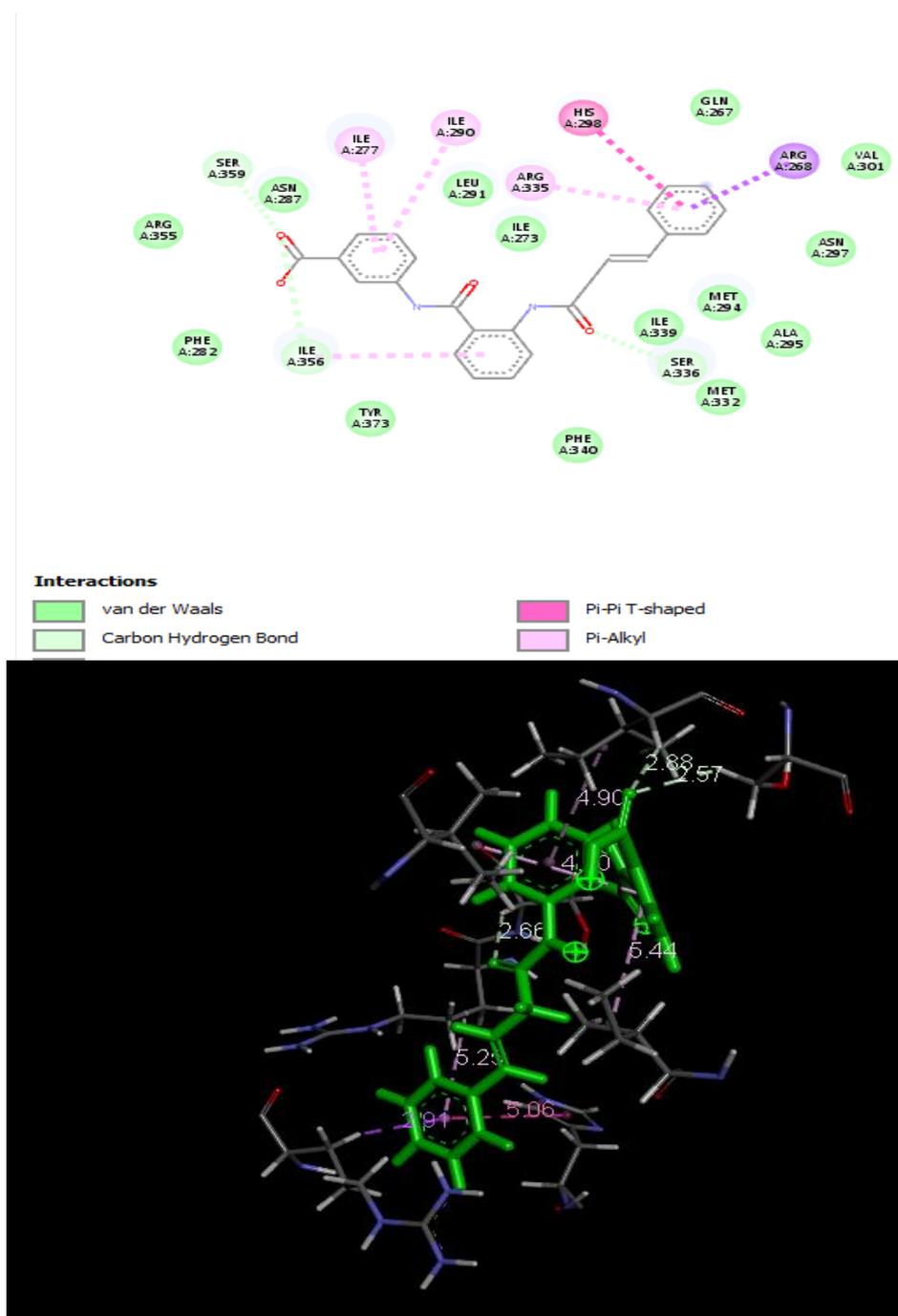


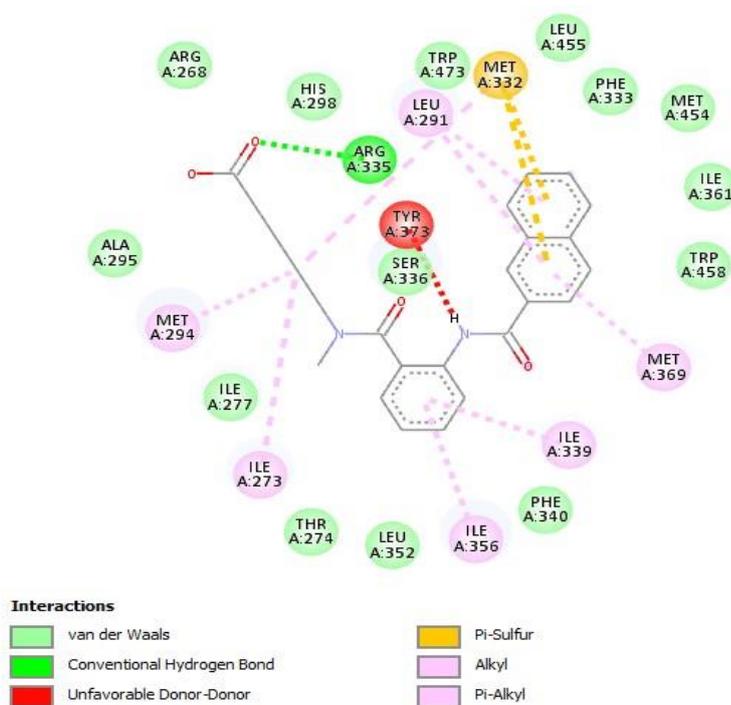
Figure III. 11 Interactions entre le ligand 7 et les résidus de site actif de 3OMM

6) Interactions 3OMM – L50 (Figure III. 12)

Les résultats montrent que le Ligand 50 est caractérisé par un score de -8,55 kcal/mol. L'analyse visuelle montre que le ligand 50 forme 11 liaisons avec le récepteur 3OMM : l'une d'entre elles est une liaison hydrogène, formant une distance de 2,40Å entre l'atome O1 et le

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

résidu ARG335 de l'enzyme. Les huit autres liaisons sont hydrophobes et participent également à la stabilisation du complexe : trois liaisons se forment entre l'atome C 14 et les résidus MET294 ILE273 et MET332 de l'enzyme (5.21Å, 4.31Å, 5.42Å). Deux liaisons se forment entre le cycle benzénique et les résidus ILE356 et ILE359 de l'enzyme, et la distance entre eux est respectivement de 5,28 et 4,78. Les trois autres liaisons (5,29Å, 4,56Å, 4,97Å) entre le naphtalène et les résidus MET 369 et LEU 291 de l'enzyme. Les deux dernières liaisons Pi-soufre se forment entre le naphtalène et le résidu MET 332 (5,84Å, 5,27Å) de l'enzyme.



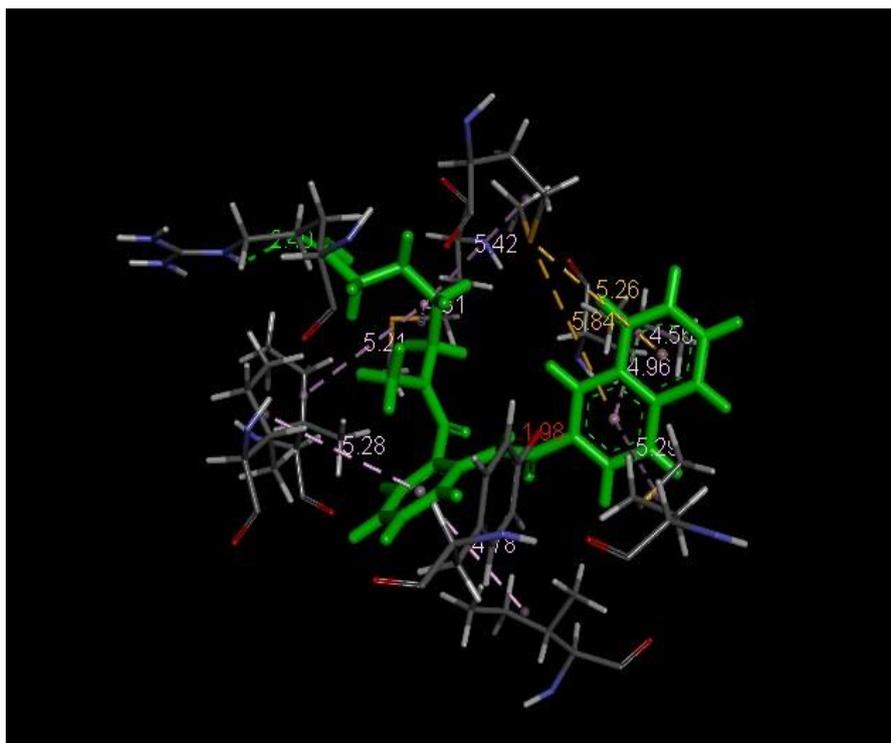
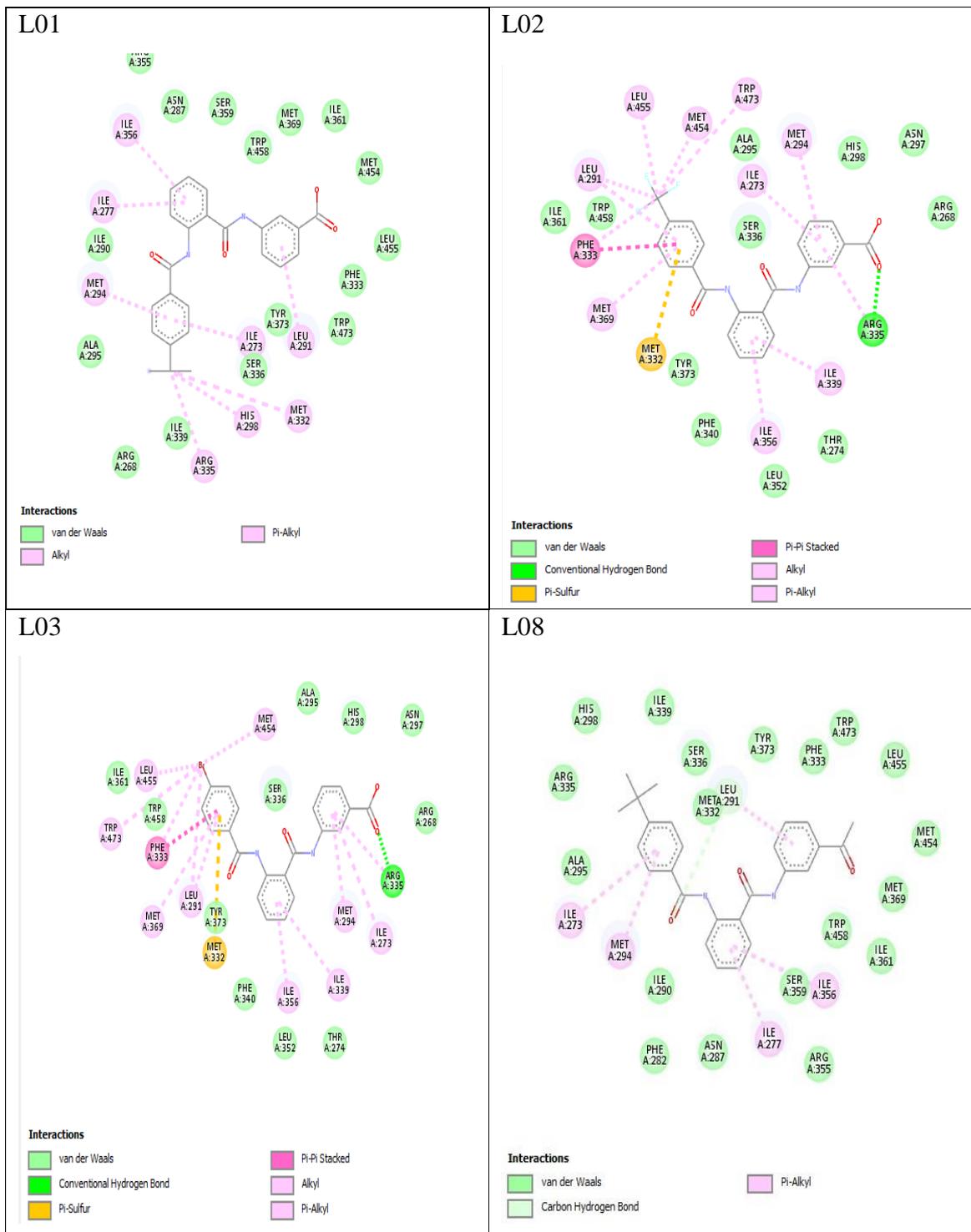


Figure III. 12 Interactions entre le ligand 50 et les résidus de site actif de 3OMM

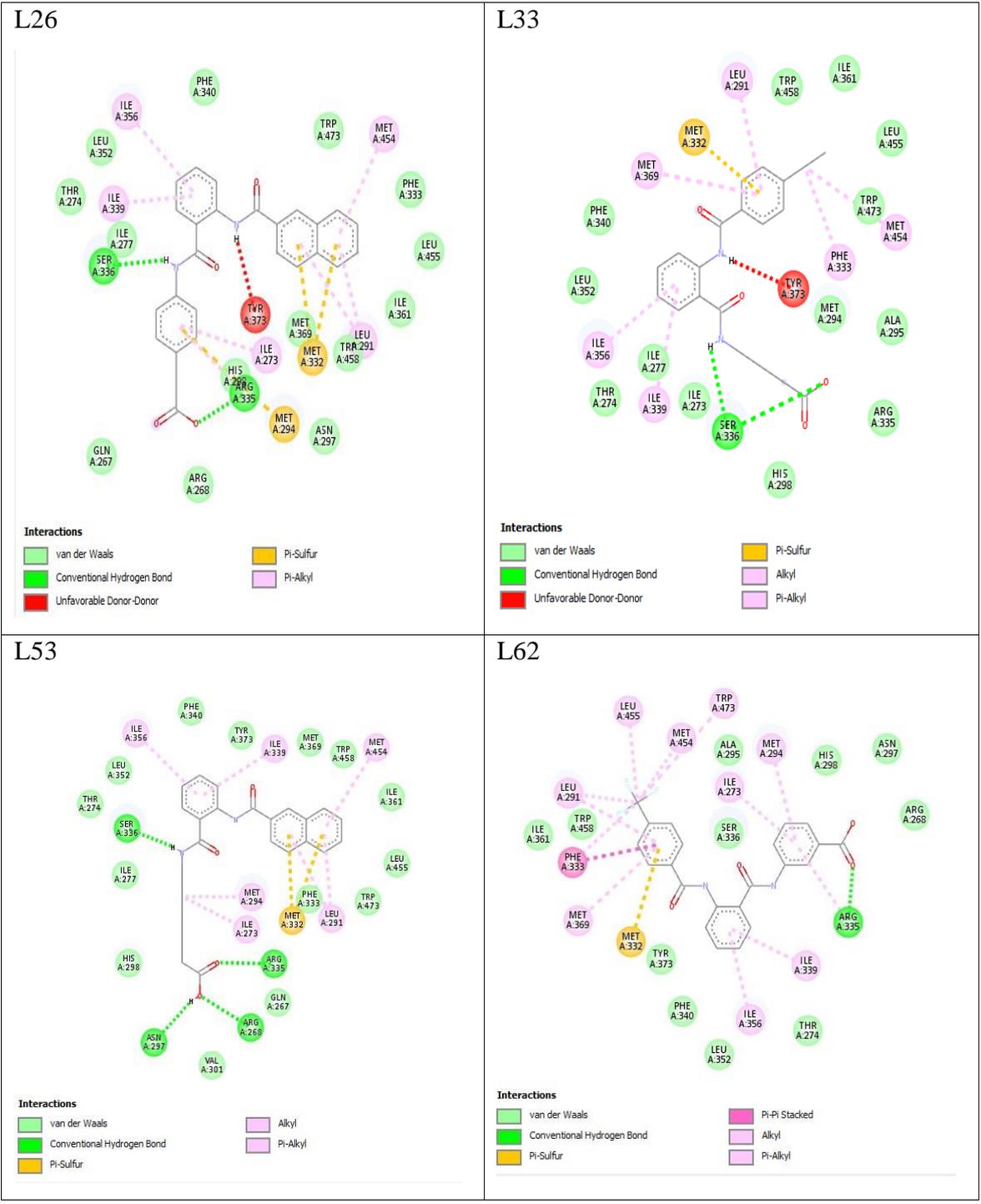
Les ligand L73 (-8.4899931Kcal/mol), L53 (-8.45623589Kcal/mol), L26(-8.44591427Kcal/mol), L01 (-8.3647747Kcal/mol), L33 (-8.34691906Kcal/mol), L03 (-8.32449627Kcal/mol), L08 (-8.25921822Kcal/mol), L63 (-8.29486656Kcal/mol), L02(-8.29139519Kcal/mol), L62 (-8.2837801, L68 (-8.26074409Kcal/mol) ont des valeurs légèrement faible d'énergie score, ceci confirme que ces ligands forment des complexes moins stables que les complexes des ligands précédents.

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

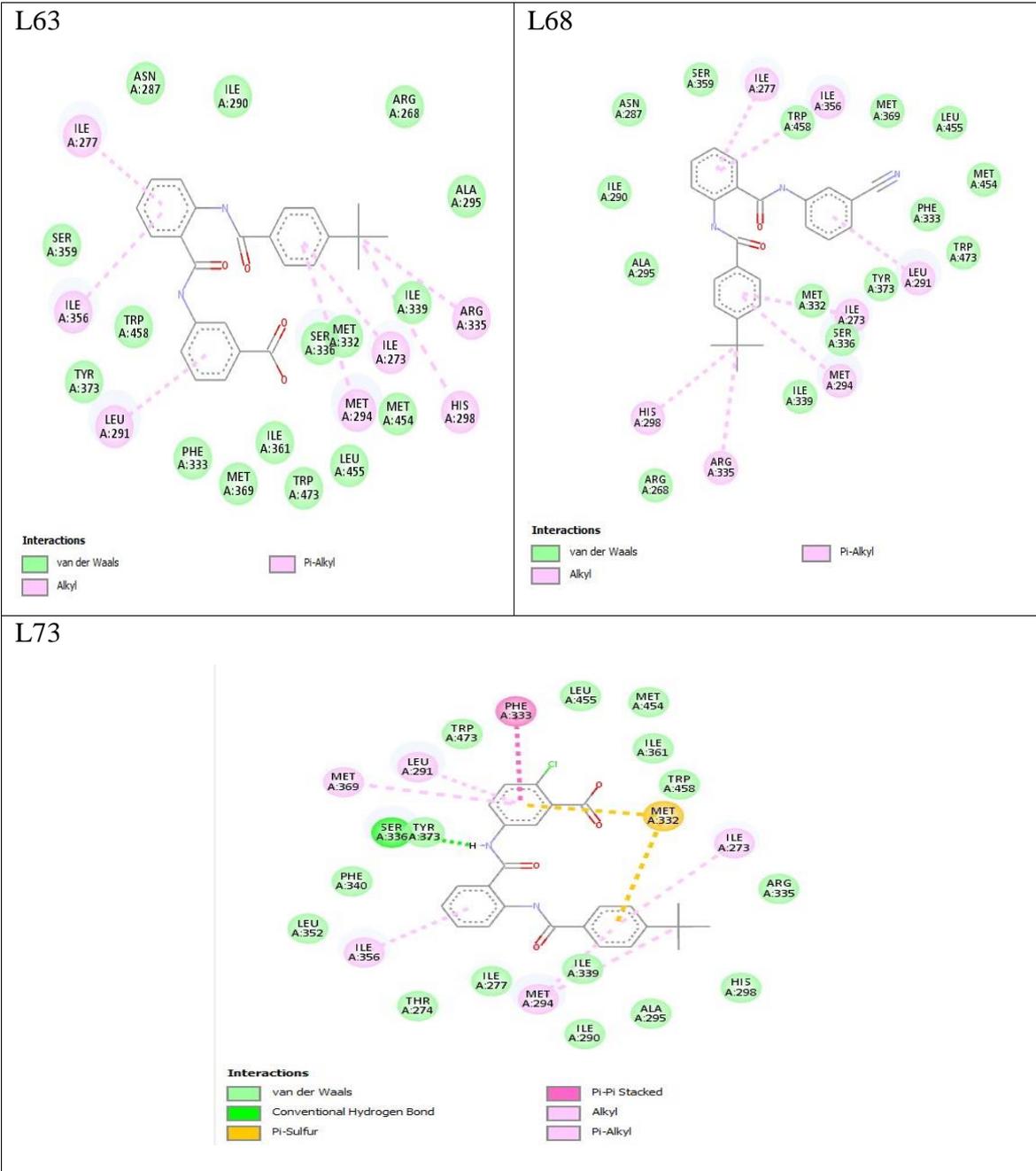
Figure III. 13 les interactions des ligands que forment des complexes moins stables



Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions



Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions



6. Résultats Des Propriétés Moléculaires (Drug likeness)

6.1. Composés "Drug-Like"

Idéalement, on souhaiterait ne tester que les molécules ayant un fort potentiel à devenir un médicament : absence de toxicité, grande efficacité thérapeutique, bonne absorption pour les médicaments destinés à la prescription par voie orale, etc. En l'absence de définition universelle ou de méthode prédictive parfaite, de nombreuses études ont tenté de faire la différence entre une molécule biologiquement active et une molécule "drug-like" se rapprochant du médicament idéal [11–14].

La définition la plus célèbre d'un composé "drug-like" est celle de Lipinski [15]. A partir de composés administrés par voie orale ayant passé avec succès la phase 2 des tests cliniques, il observe que les molécules ayant le plus de chances d'être absorbées par voie orale satisfont au moins trois des caractéristiques suivantes :

- (1) un poids moléculaire inférieur à 500 Dalton,
- (2) un LogP calculé inférieur à 5,
- (3) un nombre d'accepteurs de liaison hydrogène inférieur ou égal à 10,
- (4) un nombre de donneurs de liaison hydrogène inférieur ou égal à 5.

De plus, Veber a introduit deux critères supplémentaires à ce qui est aujourd'hui communément appelé "la règle des 5". D'après l'étude de 1100 composés candidats médicaments chez GlaxoSmithKline, la surface polaire (PSA, polar surface area) du composé doit être inférieure à 140 \AA^2 et le nombre de liaisons de rotation ("rotatable bonds" en anglais) doit être inférieur à 10 pour une bonne biodisponibilité par voie orale chez le rat [16]. La surface polaire est représentée par la somme des surfaces des atomes polaires de la molécule (calcul basé sur la topologie de la molécule ou TPSA) et permet de prédire l'absorption intestinale et le passage de la barrière hémato encéphalique. Le calcul de la surface polaire à partir de la structure 3D du composé est possible mais gourmande en temps de calcul. Or, le calcul basé sur la topologie montre une très bonne corrélation avec ces résultats ($r^2=0.982$), [17]. Ces critères peuvent être adaptés à la cible visée par la molécule. En effet, alors que l'absorption intestinale devient difficile pour un composé de surface polaire supérieure à 140 \AA^2 , 60 \AA^2 est le seuil maximal pour le passage de la barrière hématoencéphalique [18].

Ces critères sont aujourd'hui très utilisés dans le processus de découverte de molécules têtes de série et ce, à un stade très précoce. Il est à noter qu'une stringence plus forte sur les règles

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

peut être appliquée lors de la recherche de molécules touchées, dans la mesure où celles-ci doivent encore être optimisées pour devenir candidat-médicament.

6.2. Application De La Règle De Cinq (Règle De Lipinski)

D'après l'étude précédente, nous avons récupéré 18 composés comme meilleurs agoniste. Pour une étude plus détaillée nous évaluons des propriétés moléculaires de ces composés sous la règle de lipinski, les résultats sont obtenus en utilisant l'outil web Molinspiration.

Le coefficient de partage, est une manière de mesurer la tendance d'une molécule à se dissoudre dans les membranes, qui est corrélée à sa tendance à se dissoudre dans un solvant organique, tous Les valeurs du logarithme P de nos composés sont inférieures à 5 sauf pour les composés 1. 68.73 plus L_{ref} . Sachant que, une valeur positive pour log P indique que les composés sont trop lipophiles, donc ils ont : une bonne perméabilité à travers la membrane biologique, une meilleure liaison aux protéines plasmatiques, une bonne élimination par le métabolisme, mais une faible solubilité une mauvaise tolérance gastrique.

Tableau III. 6 Résultats d'application de la Règle de Lipinski

Composé N°1	N° ON	N°OHNH	Masse(UMA)	Log P	Nombre de la violation
1	6	3	402.45	5.07	1
2	6	3	428.37	4.45	0
3	6	3	439.26	4.37	0
4	8	3	404.38	3.45	0
7	6	3	446.36	4.54	0
8	6	3	400.43	4.47	0
26	6	3	424.46	4.25	0
33	6	3	354.41	2.67	0

Chapitre III : Applications, Résultats et Discussions

38	6	3	404.47	3.95	0
50	6	2	404.47	3.22	0
51	6	2	404.47	3.69	0
52	6	3	396.49	3.97	0
53	6	3	390.44	3.45	0
54	6	3	418.49	4.46	0
58	6	3	424.46	4.47	0
62	6	3	442.39	4.18	0
63	6	3	430.50	4.99	0
68	6	3	416.48	5.26	1
73	6	3	436.89	5.36	1
L_{ref}	6	2	541.96	7.60	2

— Tous les ligands ont des valeurs du poids moléculaire inférieur à 500Da, donc sont facilement à traverser les membranes cellulaires, Alors que le ligand OMM a une masse supérieure à 500 Da, ce qui les rend difficile à pénétrer la membrane cellulaire.

— Tous les ligands ont un nombre accepteur d'hydrogène inférieur à 10 et un nombre donneur d'hydrogène inférieur à 5 ce qui conduit à une meilleure perméabilité.

— Le nombre de violation, nous remarquons que nos composés ont une violation nulle à part les composés 1, 68 et 73 (N_v=1).

Les résultats de calcul qui se représente dans le (tableau III.6) montrent que tous les composés sont en accord avec les règles de cinq de Lipinski, ce qui suggère que ces composés théoriquement n'auront pas des problèmes avec la biodisponibilité orale. Par contre le L_{ref} ne répond pas à cette règle.

6.3. Application de la Règle de Veber

Le [Tableau 3.7](#) présente les résultats des propriétés concernant la règle de Veber. Ces résultats sont calculés et obtenus en utilisant le logiciel Molinspiration.

Tableau III. 7 Résultats de l'application de la Règle Veber

Composé N°	TPSA (Å ²)	N° rotb
1	95.50	6
2	95.50	6
3	95.50	5
4	113.96	5
7	95.50	6
8	95.50	7
26	95.50	6
33	95.50	8
38	95.50	9
50	86.71	8
51	86.71	8
52	95.50	9
53	95.50	8
54	95.50	10
58	95.50	6
62	95.50	7
63	95.50	7
68	95.50	6
73	95.50	6
L _{ref}	84.22	6

D'après les résultats du tableau on remarquant que :

— **Pour la surface (TPSA) :**

Tous les composés étudiés ont des valeurs inférieures à 140 Å² ce qui montre la bonne prédiction de la biodisponibilité orale et le transport à travers les membranes biologiques. Alors que le ligand de référence possède un TPSA inférieur à 140 (=84.22) donc une bonne biodisponibilité par voie orale et bonne transport à travers les membranes biologiques.

— **Pour les NRB :**

Nos composés ont des valeurs de liaisons rotatives inférieures à 10 par rapport au ligand de référence (NRB=6). Un faible nombre des liaisons rotatives donc une flexibilité réduite pour tous les composés ce qui indique que ces ligands lors de la liaison à une protéine ne changent que légèrement leur conformation.

Références Bibliographique

- [1] Molecular Operating Environment (MOE), 2015.10 ; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2015.
- [2] Stanislas Dorey. Les logiciels de visualisation moléculaire dans l'enseignement des sciences de la vie : conceptions et usages. PhD thesis, 2012.
- [3] Molinspiration Cheminformatics. Calculation of molecular properties and bioactivity score. Computer software]. Retrieved from <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>, 2018
- [4] <https://chemaxon.com/products/marvin>
- [5] K Benarous. Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase. In Mémoire d'Ingénieur d'état en 93Chap 3. BIBLIOGRAPHIE génie biologique 2006, Université Amar Telidji Laghouat, Algérie - Ingénieur d'état en génie biologique 2006. 2006.
- [6] Hong-Xing et Mezei Mihaly et Cui Meng Meng, Xuan-Yu et Zhang. Amarrage moléculaire : une approche puissante pour la découverte de médicaments basée sur la structure. Conception actuelle de médicaments assistée par ordinateur, 7 :146–157.
- [7] Eddy Thiriot. Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : Développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. PhD thesis, Université Henri Poincaré-Nancy 1, 2009.
- [8] Richard A Friesner, Jay L Banks, Robert B Murphy, Thomas A Halgren, Jasna J Klicic, Daniel T Mainz, Matthew P Repasky, Eric H Knoll, Mee Shelley, Jason K Perry, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of medicinal chemistry*, 47(7):1739–1749, 2004.
- [9] Hui Sun Lee, Sunhwan Jo, Hyun-Suk Lim, and Wonpil Im. Application of binding free energy calculations to prediction of binding modes and affinities of mdm2 and mdmx inhibitors. *Journal of chemical information and modeling*, 52(7) :1821–1832, 2012.

- [10] Michael S Lajiness, Michal Viet, and Jon Erickson. Molecular properties that influence Oral drug-like behavior. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* **7**(4), 470–477 (2004).
- [11] Ingo Muegge. Selection criteria for drug-like compounds. *Medicinal Research Reviews* **23**(3), 302–321 (2003).
- [12] Giulio Vistoli, Alessandro Pedretti, and Bernard Testa. Assessing drug-likeness—What are we missing? *Drug Discovery Today* **13**(7-8), 285–294 (2008).
- [13] Ming-Qiang Zhang and Barrie Wilkinson. Drug discovery beyond the 'rule-of-five'. *Current Opinion in Biotechnology* **18**(6), 478–488 (2007).
- [14] Paul D Leeson and Brian Springthorpe. The influence of drug-like concepts on decisionmaking in medicinal chemistry. *Nature Reviews. Drug Discovery* **6**(11), 881–890 (2007).
- [15] J C A Lipinski, F Lombardo, B W Dominy, and P J Feeney. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **46**(1-3), 3–26 (2001).
- [16] D.F.Veber; S.R.Johnson; Cheng HY; B.R. Smith; K.W.Ward; K.D.Kopple, *Journal of Medicinal Chemistry*.**45** (2002) 2615.
- [17] p.Ertl,B.Rohde, P.Selzer, *Journal of Medicinal Chemistry*. **43** (2000) 3714.
- [18] R.Cecchelli; V.Berezowski; S.Lundquist; M.Culot;M.Renftel;M.P. Dehouck; L.Fenart, *Nature Reviews Drug Discovery*.**6** (2007) 650.

Conclusion Général

Le Docking moléculaire se concentre sur la simulation informatique du processus de reconnaissance moléculaire. Il vise à obtenir une conformation optimisée à la fois pour la protéine et le ligand et une orientation relative entre la protéine et le ligand de telle sorte que l'énergie libre du système global soit minimisée. Notre objectif dans ce travail était l'adoption de la modélisation moléculaire par le Docking afin d'étudier et d'optimiser des nouveaux agoniste ; qui ont été proposés comme des nouveaux agents thérapeutiques possibles ciblant l'enzyme de 3OMM dans le but de conception des nouveaux agoniste des récepteur FXR

Dans ce présent travail, nous nous sommes intéressés aux interactions moléculaires entre le récepteur 3OMM et les dérivés de L'acide anthranilique utilisés comme des agonistes à l'aide du docking moléculaire pour mieux comprendre le mécanisme d'activation de ces enzymes.

Dans un premier lieu, nous avons conçu et préparer 75 dérivés de (acide 2-aminobenzoïque (L'acide anthranilique)), puis on a appliqué le docking moléculaire sur ces agoniste avec l'enzyme FXR (ID : 3OMM), les résultats obtenus nous permet de déterminer les meilleurs complexes stables formés.

Nos études sont basées sur le calcul des énergies d'interactions, les distances d'interaction entre les agonistes et le récepteur. Selon les résultats obtenus on peut choisir le meilleur agoniste qui a une grande affinité à se lier avec l'enzyme.

Les résultats obtenus montrent que les 18 ligands L1, L2, L3, L4, L7, L8, L26, L38, L50, L51, L53, L54, L58, L62, 63, L68, L73. Formant des complexes avec le récepteur ID : 3OMM, et qui possèdent les plus petites énergies Score par rapport à la molécule de référence OMM, ceci montre que ces complexes sont plus stables. On peut les classer selon l'ordre suivant : L38 < L54 < L51 < L4 < L8 < L58 < L50 < L73 < L53 < L26 < L01 < L33 < L03 < 07 < L3 < L02 < L62 < L68. On en conclut que les valeurs des 18 ligands obtenues sont considérés comme parfaites et surtout les ligands L38 et L54 sont les meilleurs ligands pour activer l'activité de 3OMM puisqu'il forme un complexe stable avec cette enzyme en se liant mieux au site actif.

Les résultats ont également révélé Les acides aminés suivants, Arg335, SER336, MET294, MET333, ILE339, LEU291, ILE273, MET454, ILE277, MET369, ILE356, Met294, Phe333, se sont avérés jouer un rôle important dans les conformations les plus favorables, ils se sont également avérés être les résidus clés interagissant dans le site actif de la cible. De plus, ARG335, SER336 (interactions de liaison H), MET294et ILE339 (interactions hydrophobes) étaient les plus dominants, ils ont donc été impliqués dans de nombreux cas possibles pour former les complexes amarrés.

Les structures des molécules qui ont la meilleure affinité dans le site actif de la FXR montrent que la présence de deux fonctions azotées des amides dans la structure pourrait contribuer à la liaison au récepteur nucléaire via des ponts hydrogène et la présence de groupe naphthalène dans la structure augmente la capacité de formation de type d'interaction hydrophobique.

L'affinité de liaison plus élevée peut être attribuée au plus grand nombre de liaisons hydrogène dans le complexe, entre le ligand et la protéine.

L'application de la règle de 5 de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME de ces molécules qui se présente comme un agonistes potentiellement plus actif que le FXR

Cependant, notre étude reste seulement une étude théorique préliminaire, qui nécessite une étude empirique in vitro pour s'assurer que ses résultats sont corrects et les mieux développés.