

République Algérienne Démocratique et Populaire
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Microbiologie

N° d'ordre : 016/Mag/2012

N° de série : 004/SN/2012

Mémoire

Présenté pour l'Obtention du Diplôme de Magister en Biochimie

Option: Technologie des explorations biochimiques

Par : **MOKRANI El-Hassen**

Thème

Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique.

Soutenue le : 25/01/2012

Devant le jury :

Président : Mr. HAMIDECHI M A. M.C.A Université Mentouri Constantine.

Rapporteur : Mr. BENSEGUENI A. M.C.A. Université Mentouri Constantine.

Examineurs : Mr. CHIKHI A. M.C.A. Université Mentouri Constantine.

Mr. BOUDAH A. M.C.A. Université Mentouri Constantine.

Année universitaire : 2011 – 2012



Remerciements

Que ce soit d'un point de vue scientifique ou humain, la réalisation de cette thèse fut pour moi une expérience d'une valeur immense. Scientifiquement, cette année a présenté pour moi une opportunité précieuse d'apprendre un peu davantage sur le diabète de type 2 et de découvrir, avec une grande fascination, la modélisation par docking moléculaire. Humainement, cette période a été marquée par d'énormes leçons d'amitiés et de réconciliations. Ainsi je ne peux que remercier tous ceux qui étaient à mes côtés au cours de cette expérience.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude, et ma vive reconnaissance à Mr **BENSEGUENI A.** Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine pour m'avoir confié ce sujet et pour toute la confiance qu'il m'a accordé pour mener à bien cette première thèse de magister entièrement axée sur la modélisation moléculaire. Merci également pour vos nombreux conseils et pour votre aide intensive pendant la réalisation de la partie expérimentale ainsi que la rédaction et la structuration de ce manuscrit. Votre esprit critique et votre sens de l'organisation sont pour le moins remarquables.

C'est avec un grand plaisir que je remercie Mr **HAMIDECHI A.** Maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine, pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de ce mémoire et pour l'aide qu'il m'a accordé.

Que Mr **BOUDAH A.** Maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Mes plus vifs remerciements vont aussi à Mr **CHIKHI A.** Maître de conférences à l'université Mentouri de Constantine pour ces précieux conseils tout le long de travail et pour avoir accepté de juger ce travail.

Enfin, que tous ceux qui m'ont accordé un soutien, une aide technique ou un conseil, trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.





Dédicaces

Du fond de mon cœur et avec l'intensité de mes émotions, Je dédie ce travail :

*A mes **parents** qui m'ont enseigné la persévérance dans mes études,
qui m'ont toujours été d'un grand secours par leur soutien
et leur encouragement pendant les moments difficiles, qu'ils trouvent ici le fruit de leur
labeur et le témoignage de mon grand amour.*

*A Mon adorable frère **Samir** et sa femme **Sandra***

*Ainsi que mes sœurs **Ahlem, Kholoud, Sofia, Linda, Amel** et **Djazia***

Pour leurs amours et leurs encouragements.

Je vous formule les plus sincères vœux de bonheur et d'un avenir radieux.

*A mes amis les plus fidèles **seyf, choaibe, Mohamed, Asma** et **Lyes**.*

Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance et mon amitié.

*A tous mes **enseignants** ainsi que tous mes **collègues** de promotion de magister et
spécialement **Soumia, Hanane, Meriem** et **Rym**. Ce fut un honneur et un plaisir de vivre
cette période de ma vie avec vous.*

*A tous mes amis de la promotion de magister en Microbiologie au Centre Universitaire de
Khanchla et notamment **Mokhtar, Hiba, Layla** et **Asma**.*

*Et pour finir, je présente d'avance mes excuses à ceux dont j'aurais oublié de citer le
nom : ma mémoire peut me jouer de tours, mais ceci ne change rien à la considération que j'ai
et que j'aurais toujours pour chacun de vous.*

Je vous dédie ce travail tout en espérant le succès dans votre vie familiale et professionnelle.

MOKRANI EL-Hassen



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

Revue bibliographique

Chapitre1 : Les incrétines et le diabète de type 2

1. La glucorégulation.....	3
1.1 Généralités.....	3
1.2 Rôle du foie et du pancréas dans la régulation de l'homéostasie glycémique.....	3
2. Le diabète de type 2.....	4
2.1 Epidémiologie.....	5
2.2 Facteurs de risques.....	6
2.2.1 L'obésité et les facteurs environnementaux.....	6
2.2.2 L'hérédité.....	6
2.2.3 L'âge.....	7
2.3 Physiopathologie.....	7
2.4 Complications du diabète de type 2.....	8
2.4.1 Le système cardiovasculaire.....	8
2.4.2 Les yeux.....	8
2.4.3 Les nerfs.....	8
2.4.4 Les reins.....	9
3. Traitement du diabète de type 2	9
3.1 Les biguanides.....	10
3.2 Les sulfamides hypoglycémiantes.....	10
3.3 Les glinides.....	11
3.4 Les inhibiteurs des alphaglucosidases.....	11
3.5 Les thiazolidinediones (TZD).....	11
3.6 Le passage à l'insulinothérapie.....	12
4. L'effet incrétine.....	12
4.1 Synthèse sécrétion et dégradation du GLP-1.....	13
4.2 Effet physiologique du GLP-1.....	13
4.3 Stratégies thérapeutiques basées sur le GLP-1.....	14
4.3.1 Les mimétiques de l'incrétine.....	15
4.3.1.1 L'exénatide.....	16

4.3.1.2 Le liraglutide.....	16
4.3.2 Les inhibiteurs de la DPP4.....	16
4.3.2.1 Les gliptines.....	16
5. Place des incrétines dans les traitements du diabète de type 2.....	18

Chapitre 2: Les structures mises en jeu

1. Le récepteur : La dipeptidyl-peptidase 4.....	19
1.1 Rôle physiologique.....	19
1.2 Description structurale.....	21
1.3 Le site actif de l'enzyme.....	22
2. Les inhibiteurs de la DPP4.....	24
2.1 Première classe : les analogues de produits compétitifs.....	26
2.2 Deuxième classe : les analogues de produit irréversible.....	26
2.3 Troisième classe : les inhibiteurs réversibles non peptidiques.....	27

Chapitre 3: Le docking moléculaire

1. Introduction.....	29
2. Les outils du docking moléculaire.....	30
2.1 Le récepteur.....	31
2.2 Le(s) ligand(s).....	32
2.3 Un programme du docking moléculaire.....	32
3. Le docking : du docking rigide vers l'introduction de la flexibilité.....	33
3.1 Le choix de l'algorithme de recherches.....	34
3.1.1 L'ajustement de fragments (matching).....	34
3.1.2 Simulation par trajectoire.....	35
3.2 Algorithme Génétique Lamarkien (AGL).....	36
4. Scoring.....	38

Partie pratique

Chapitre 4 : Matériel et méthodes

1. Préparation du récepteur	41
2. Préparation des ligands.....	42
3. Calcul des grilles de potentiels.....	42
4. La recherche des solutions d'amarrage.....	43
5. Analyse des résultats.....	44

Chapitre 5 : Résultats et discussion

1. Tests de fiabilité du programme de docking.....	45
1.1 Le coefficient de corrélation (r).....	45
1.2 Le RMSD.....	51
1.3 L'analyse visuelle.....	52
1.4 Conclusion.....	56
2. Etude des interactions Xanthines-DPP4 par AutoDock.....	56
2.1 Le complexe 2I3Z.....	58
2.2 Le complexe 3G0B.....	58
2.3 Le complexe 3G0C.....	59
2.4 Le complexe 3G0D.....	61
2.5 Le complexe 3G0G.....	61
2.6 Le complexe 2ONC.....	62
2.7 Le complexe 2RGU.....	63
2.8 Conclusion.....	64
3. proposition de nouveaux inhibiteurs de la DPP4.....	64
3.1 Criblage virtuel d'une collection de similaires de la linagliptine.....	64
3.2 Modification structurale de la linagliptine.....	66
3.2.1 Topologie du site actif de la DPP4 en interaction avec la linagliptine.....	66
3.2.2 Mono-substitution.....	67
3.2.3 Poly-substitution.....	70
4. Le filtrage ADME/tox.....	73
Conclusion et perspectives.....	75
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

Liste des tableaux

<u>Tableau N°1 :</u> Substrats de la DPP 4 et signification biologique après le clivage du dipeptide en N-terminal.....	20
<u>Tableau N°2:</u> Corrélation entre les énergies d'interaction des 31 inhibiteurs de la DPP4 et leur activité biologique (Log IC50).....	45
<u>Tableau N°3:</u> Valeurs de RMSD des sept complexes DPP4-xanthines étudiés.....	51
<u>Tableau N°4:</u> Structure et énergie d'interaction vis-à-vis la DPP4 des meilleurs similaires de la linagliptine.....	65
<u>Tableau N°5:</u> Structure et résultats des interactions de la linagliptine modifié sur les radicaux R1, R2, R3 et R4.....	68
<u>Tableau N°6:</u> Structure et énergie d'interaction des ligands proposés : poly-substitution.....	71
<u>Tableau N°7:</u> Propriétés moléculaires des inhibiteurs de la DPP4 proposés.....	73

Liste des figures

<u>Figure N°1</u> : Action physiologique du GLP1.....	14
<u>Figure N°2</u> : Diminution de l'effet incrétine chez les diabétiques de type 2.....	15
<u>Figure N°3</u> : Illustration des effets inhibiteurs de la DPP4 sur les taux de GLP-1.....	17
<u>Figure N°4</u> : Représentation schématique des différents mécanismes de fonctionnement de la DPP4.....	20
<u>Figure N°5</u> : Migration de la DPP4 sur SDS-PAGE.....	21
<u>Figure N° 6</u> : Représentation schématique des poches S1 et S2 du site actif de la DPP4.....	23
<u>Figure N°7</u> : Démonstrations des différents domaines de la DPP4.....	24
<u>Figure N°8</u> : Effet de la DPP4 sur la GLP-1.....	25
<u>Figure N°9</u> : Structure de la Sitagliptine.....	26
<u>Figure N°10</u> : Structure de la vildagliptine.....	27
<u>Figure N°11</u> : Structure de linagliptine (classe des xanthines).....	28
<u>Figure N°12</u> : Aperçu d'une plateforme de criblage haut-débit robotisé et d'une plaque à 96 puits.....	29
<u>Figure N°13</u> : Comparaison des programmes de docking les plus cités.....	33
<u>Figure N°14</u> : Méthodes automatisées de docking les plus connues et exemples d'algorithmes (en vert) fréquemment cités dans la littérature.....	36
<u>Figure N°15</u> : Principe de l'algorithme génétique de Lamarckian.....	38
<u>Figure N°16</u> : Différents types de fonctions de score les plus connues (en vert) et les exemples (en bleu) les plus fréquemment cités dans la littérature.....	39
<u>Figure N°17</u> : Position de la boîte d'amarrage dans le site actif de la DPP4.....	43
<u>Figure N°18</u> : Structures des inhibiteurs de la DPP4 utilisés dans l'étude de la régression linéaire.....	50

<u>Figure N°19:</u> Corrélation entre l'activité biologique (Log IC ₅₀) de 31 ligands et leur énergie d'interaction avec la DPP4.....	50
<u>Figure N°20:</u> Ancrage du ligand 356 dans le site actif de la DPP4 : Comparaison des conformations obtenues par cristallographie (coloré par type d'atomes) et par docking avec AutoDock (coloré en vert).....	52
<u>Figure N°21:</u> Superposition des géométries de l'inhibiteur LIR donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec AutoDock (coloré en vert).....	53
<u>Figure N°22:</u> Comparaison entre la conformation du ligand T22 issue de la diffraction par rayons X (colorées par type d'atomes) et celle conçue par AutoDock.....	53
<u>Figure N°23:</u> Superposition spatiale entre la pose du ligand RUF calculée par AutoDock (coloré en vert) et la conformation dans le complexe expérimentale 3G0C (coloré par type d'atome).....	54
<u>Figure N°24:</u> Superposition du modèle du ligand XIH simulé par AutoDock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation déterminée expérimentalement (coloré par type d'atome).....	54
<u>Figure N°25:</u> Alignement des conformations expérimentale (colorées par type d'atome) et calculée par AutoDock (colorée en vert) de l'inhibiteur RUM.....	55
<u>Figure N°26:</u> Comparaison de la conformation expérimentale de l'inhibiteur SY1 (colorée par type d'atome) et sa conformation optimale simulée par AutoDock (colorée en vert).....	55
<u>Figure N°27:</u> Structure de base du noyau xanthine.....	56
<u>Figure N°28 :</u> Structure des inhibiteurs xanthiniques étudiés.....	57
<u>Figure N°29:</u> Interactions entre l'inhibiteur LIR et le site actif de la DPP4.....	58
<u>Figure N°30:</u> Interactions de l'inhibiteur T22 avec le site actif de la DPP4.....	59
<u>Figure N°31:</u> Représentation des interactions RUF- DPP4.....	60
<u>Figure N°32:</u> Régression linéaire entre IC ₅₀ et les valeurs du docking : le complexe 3G0C est présenté en rouge.....	60
<u>Figure N°33:</u> Interactions du composé XIH avec le site actif de la DPP4.....	61

<u>Figure N°34:</u> Représentation des interactions entre le composé RUM et le site actif de la DPP4.....	62
<u>Figure N°35:</u> Représentation des interactions SY1-DPP4.....	63
<u>Figure N°36:</u> Représentation des interactions linagliptine-DPP4.....	64
<u>Figure N°37:</u> Numérotation des atomes constituant la linagliptine: le radical R1 est représenté en bleu, R2 en rouge, R3 en vert et R4 en rose.....	66
<u>Figure N°38:</u> Représentation de la topologie du site actif de la DPP4 en interaction avec la linagliptine: la seule liaison hydrogène est représenté en ligne vert, les distances entre les atomes susceptibles d'établir des liaisons hydrogènes sont représentés en lignes pointillées.....	67
<u>Figure N°39:</u> illustrations des interactions A1-DPP4.....	70
<u>Figure N°40:</u> Illustration du positionnement de l'inhibiteur E4 dans le site actif de la DPP4.....	72
<u>Figure N° 41:</u> Mode d'interaction du composé E4 dans le site actif de la DPP4.....	72

Liste des abréviations

3D: Trois dimensions

Å: Angström

ADO: Antidiabétiques oraux

ADT: AutoDock Tools)

AG : Algorithme Génétique

AGL : Algorithme Génétique Lamarkien.

AGL : Acides Gras Libres.

AM1: Austin Model 1.

AVC : Accident Vasculaire Cérébral.

CD26 : Cluster of Differentiation 26.

Dlg: Docking LoG file.

Dpf : Dock Parameters File.

DPP4 : La dipeptidyl-peptidase-IV

DPP8 : La dipeptidyl-peptidase 8.

DPP9 : La dipeptidyl-peptidase 9.

FAP : Fibroblast Activation Protein

GHRF : Growth Hormone-Releasing Factor.

GHZ: Giga hertz

GIP : Glucose-dependent Insulinotropic Peptide.

Glg: Grid LoG file.

GLP1 : Glucagon-Like Peptide-1

GLUT 4: Glucose transporter type 4.

Go: Giga opté

GOLD: Genetic Optimisation for Ligand Docking.

Gpf: Grid Parameters File.

GRP : Gastrin-Releasing Peptide.

HIV: Human immunodeficiency virus.

HTS: High Throughput Screening (criblage à haut débit).

IC₅₀ : Inhibitory Concentration 50.

IMC : Indice de Masse Corporelle.

IP10: Interferon gamma-induced protein 10.

ITAC : Interferon Inducible T-Cell Alpha Chemoattractant

kDa: Kilo Dalton.

Ki : Constante d'inhibition.

MDC: Macrophage-Derived Chemokine.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

PACAP-(1–38) : The Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide-(1–38).

PDB: Protein Data Bank.

PPAR-gamma : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma.

r : Coefficient de corrélation linéaire

RMSD: Root Mean Square Deviation.

SDF-1: Stromal Derived Factor-1.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.

TZD : Thiazolidinediones

VLDL : Very Low Density Lipoprotein (Lipoprotéines de très faible densité)

Introduction

Le diabète de type 2 est une pathologie métabolique qui pose un grand problème de santé publique engendrant, chaque année, près de quatre millions de décès dans le monde. A l'échelle nationale, l'Algérie compte, actuellement, plus de 2.7 millions de diabétique et risque d'en comptabiliser 4.2 millions, d'ici 2025, si rien n'est fait pour enrayer l'épidémie [1,2].

Les complications du diabète de type 2 ont des conséquences humaines. En effet, cette pathologie constitue la première cause de cécité acquise, d'insuffisance rénale terminale, de neuropathie, d'artériopathie des membres inférieurs et 25 à 35 % des accidents vasculaire cérébrale et d'infarctus de myocarde [3].

Le traitement pharmacologique du diabète de type 2 a longtemps été limité à la prescription d'un sulfamide hypoglycémiant (sulfonylurée) et/ou de metformine. De nouvelles approches qui arrivent en plein lumière sont, depuis quelques mois, sur le marché. Elles se basent sur le concept des incrétines et utilisent comme cible la GLP1 (*glucagon-like peptide-1*). Il s'agit d'une hormone digestive aidant l'organisme à normaliser la glycémie seulement lorsque celle-ci s'élève, ce qui écarte tout risque d'hypoglycémie. Cependant, la demi-vie de cette hormone est très courte en raison de sa dégradation par une enzyme : la dipeptidyl-peptidase-IV (DPP4) rendant ainsi son potentiel en tant qu'agent thérapeutique très réduit. Pour contourner cet obstacle, deux stratégies thérapeutiques ont été adoptées : d'une part, le développement d'analogues exogènes injectables du GLP-1 résistant à l'action de la DPP4 et d'autre part, l'utilisation de médicaments oraux bloquant sélectivement la DPP4 afin d'allonger la demi-vie de GLP-1 endogène [4,5].

C'est à cette nouvelle approche du traitement du diabète de type 2 par inhibition de la DPP4 que nous nous intéressons dans le présent travail. Les inhibiteurs de la DPP4 sont de petites molécules de synthèse appartenant à plusieurs familles chimiques, inhibant sélectivement la DPP4 en contribuant significativement à normaliser la glycémie avec très peu d'effets indésirables. A titre d'exemple, les xanthines, sont des inhibiteurs compétitifs hautement sélectifs et très puissants constituant ainsi la plus récente classe des inhibiteurs de la DPP4 [6].

Le présent travail a pour but de mieux comprendre les mécanismes d'action des xanthines afin de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de cette classe en

faisant appel aux approches *in silico* de modélisation des interactions enzyme-inhibiteur par docking moléculaire.

Dans notre travail de recherche, il nous a semblé judicieux, dans un premier temps, de tester la fiabilité du programme de docking moléculaire AutoDock utilisé dans cette étude. Pour cela, deux tests ont été réalisés. Le premier test consiste à calculer le coefficient de corrélation entre les énergies d'interaction obtenues par docking des molécules retenues dans cette étude et les valeurs expérimentales de leurs IC50. Le deuxième test consiste à calculer la déviation en angströms ou RMSD, entre la géométrie du ligand conçue par le logiciel et celle déterminée expérimentalement.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes attachés à mieux comprendre les mécanismes d'interaction mis en jeu entre la DPP4 et les xanthines. Dans la mesure où aucune étude préalable de modélisation par docking moléculaire de ces composés n'a été réalisée, il nous a paru important d'évaluer leurs énergies d'interaction avec la DPP4 tout en analysant visuellement les interactions qui président à la stabilité des différents complexes DPP4-xanthines formés.

Dans une dernière partie, en nous appuyant sur les résultats précédents, nous avons tenté de modéliser de nouveaux inhibiteurs xanthiniques pouvant inhiber plus fortement la DPP4.

Chapitre 1: Les incrétines et le diabète de type 2

1. La glucorégulation

1.1 Généralités

Le glucose est la principale source d'énergie de la majorité des cellules. Cette molécule appartient à la catégorie des glucides qu'on retrouve dans notre alimentation sous forme d'amidon, de glycogène, de saccharose...etc. le glucose arrive aux cellules par l'intermédiaire du sang après son absorption au niveau de l'intestin.

Bien que les apports de glucose sont très variables dans le temps, la glycémie (le taux du glucose dans le sang) reste relativement stable et oscille autour de 1g/l chez les personnes normales. Pour maintenir son homéostasie glycémique, l'organisme fait appelle à deux systèmes antagonistes où les hormones jouent un rôle important :

- le système hypoglycémiant hiérarchisé par l'insuline
- le système hyperglycémiant assuré par l'action de plusieurs hormones dont le glucagon, l'hormone de croissance, l'adrénaline et le cortisol [7].

1.2 Rôle du foie et du pancréas dans la régulation de l'homéostasie glycémique

La régulation de la glycémie met en jeu le système hormonal, ainsi que plusieurs organes; principalement le foie et le pancréas. Cette régulation fait partie des processus de maintien de l'homéostasie au sein de l'organisme. Elle est contrôlée pour maintenir un apport énergétique constant à tous les organes notamment le cerveau et la rétine.

Les études réalisées par Oskar Minkowski et Von Merring, en 1889, ont montré que le pancréas est le principal organe responsable de la régulation hormonale du taux de sucre dans le sang [8-9]. Effectivement, Les îlots de Langerhans, amas de cellules dispersés dans tout le pancréas, sécrètent des hormones ayant la faculté, en agissant ensemble, de normaliser la glycémie. Il s'agit surtout de l'insuline qui est produite par les cellules bêta, du glucagon et de la somatostatine produites respectivement par les cellules alpha et delta [10].

Il est admis qu'une partie du glucose sanguin d'origine digestive pénètre directement dans les cellules de tout l'organisme où il est utilisé. Le reste du glucose ingéré est stocké sous forme d'une macromolécule de glucose appelée glycogène qu'on retrouve dans les

cellules du foie essentiellement mais aussi dans les cellules musculaires. Le glucose peut être, dans une moindre mesure, transformé en lipide (triglycérides) par le foie puis stocké dans les cellules du tissu adipeux grâce à l'insuline. L'insuline est une hormone de nature peptidique facilitant l'entrée du glucose dans les cellules cibles en augmentant la perméabilité de leur membrane au moyen de récepteurs au glucose appelés GLUT 4 [11].

La nuit, lorsqu'il n'y a plus d'apport nutritif de glucose, ce sont les cellules du foie qui libèrent le glucose dans la circulation sanguine par dégradation du glycogène hépatique au cours de la glycogénolyse. Cette réaction est stimulée essentiellement par le glucagon.

Il est à noter que le glycogène des cellules musculaires peut aussi produire du glucose par glycogénolyse, mais ce glucose n'est pas libéré dans le sang, car la cellule musculaire ne possède pas les transporteurs nécessaires pour l'évacuer. En revanche, il est utilisé localement et directement par les cellules musculaires au cours d'un effort sportif par exemple. (Elles stockent jusqu'à 1% de leur masse)

Les adipocytes ne sont pas capables de transformer les triglycérides en glucose et de le libérer dans le sang. Seul, le foie est capable de libérer du glucose sanguin en cas d'hypoglycémie [12].

Si l'un des deux systèmes de régulation de l'homéostasie glycémique, voire même les deux à la fois sont altérés, l'organisme ne parvient plus à contrôler la glycémie. On parle alors d'hypoglycémie lorsqu'elle est inférieure à 0.8g/l et d'hyperglycémie lorsqu'elle dépasse 1.26g/l, entraînant, dans les deux cas de troubles métaboliques et physiologiques très graves [13]. L'hyperglycémie est provoquée par une maladie appelée diabète qui existe sous deux formes : le diabète de type 1 et le diabète de type 2. C'est ce dernier qui nous intéresse dans cette étude.

2. Le diabète de type 2

Le diabète sucré est une affection du métabolisme général des hydrates de carbone, des graisses et des protéines caractérisée par une augmentation anormale du taux de sucre dans le sang (hyperglycémie). Cette affection est due à un défaut de la sécrétion de l'insuline, de son action, ou des deux cas conjugués.

Selon l'OMS, le diabète est défini par une glycémie supérieure à 1,26 g/l (7 mmol/l) après un jeûne de 8 heures et vérifiée à deux reprises. Il est aussi caractérisé par la présence de

symptômes tels que polyurie, polydipsie, amaigrissement. Ces signes sont associés aussi à une glycémie post prandiale supérieure ou égale à 2 g/l (11,1 mmol/l) 2 heures après une charge orale de 75 g de glucose [14].

On dénombre deux grands types de diabète :

Le diabète de type 1 est une affection auto-immune, caractérisée par la destruction des cellules β du pancréas. Le manque d'insuline qui en découle rend l'administration de cette hormone indispensable. Cette affection apparaît généralement pendant la jeunesse et le diagnostic est souvent posé suite à la présence de symptômes sévères.

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant, appelé aussi diabète gras est une maladie assez mal définie qui survient typiquement après la cinquantaine, tout particulièrement chez les personnes en surpoids ou qui ont des antécédents familiaux de la même maladie. Il évolue de façon insidieuse et reste longtemps asymptomatique c'est-à-dire sans signes cliniques. De ce fait, de nombreux diabétiques ignorent leur état [15].

2.1 Epidémiologie

Le diabète est désormais en passe de devenir un véritable fléau qui ronge de plus en plus la santé des adultes et les jeunes aux quatre coins du monde. L'organisation mondiale de la santé (OMS) a annoncé cette année que plus de 250 millions de personnes sont atteintes de diabète dans le monde dont 90% sont diabétiques de type 2. Longtemps considérée comme une maladie des pays riches, le diabète de type 2 voit sa prévalence augmenter de façon dramatique dans certains pays du tiers-monde. Selon cette même organisation, le nombre de diabétiques dépassera 366 millions d'ici 2030 si rien n'est fait pour enrayer l'épidémie [16].

En France, le diabète constitue l'une des dépenses de santé les plus importantes parmi les maladies chroniques de longue durée. Une étude récente réalisée par Bringer et al, en 2008, menée sur près de dix mille personnes indique que 5,08% des hommes et 4,11% des femmes français sont diabétiques de type 2 [7].

Dans les pays du Maghreb, les dernières études menées par l'OMS évaluent l'incidence du diabète à 12% de la population. Dans cette optique, des chiffres alarmants ont été communiqués, lors de la célébration de la journée mondiale du diabète en 2010, indiquent la présence de près d'un million de diabétiques en Tunisie en 2010. Ce chiffre doublera d'ici 2020 [16].

Selon les déclarations du ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme hospitalière à l'occasion de la journée mondiale du diabète, l'Algérie compte, en 2010, plus de 2,7 millions de diabétiques et risque d'en comptabiliser près de 4,2 millions, en 2025, si des mesures de prévention ne sont pas prises [17]. Le diabète de type 2 occupe la quatrième place parmi les maladies non transmissibles et sa prévalence ne cesse pas d'augmenter. Elle est beaucoup plus élevée par rapport à celle mondiale (7.3% contre 3-5%) [2]. Ces chiffres alarmants expliquent en partie les raisons ayant motivé notre choix d'étudier le diabète de type 2 dans le cadre de la réalisation de notre travail de magistère.

2.2 Facteurs de risques

L'étude de populations diabétiques, incluant parfois des jumeaux monozygotes, à permis de mettre en évidence de nombreux facteurs liés à cette pathologie :

2.2.1 L'obésité et les facteurs environnementaux

En un siècle, nos styles de vie ont radicalement changé pour le meilleur mais également pour le pire. L'industrialisation s'est accompagnée de son lot de stress, de fast-food et de sédentarité, qui sont autant de facteurs de risque dans le développement du diabète de type 2. Dans ce contexte, les personnes ayant un Indice de Masse Corporelle (IMC) supérieur à 30 (donc qualifiées d'obèses) ont environ 10 fois plus de risque de devenir diabétique. Cette obésité est notamment due au mode de vie actuel : les apports énergétiques dépassent trop souvent les dépenses. Ce n'est pas tant la quantité de l'alimentation qui a changé, mais surtout sa qualité. De plus, les modes de vie actuels se caractérisent par une sédentarité et un manque d'exercice physique croissant. Les conditions de vie et de travail sont de plus en plus confortables, et les loisirs plus sédentaires. D'ailleurs, l'obésité est corrélée au nombre de voitures par foyer ou aux nombres d'heures passées devant la télévision. L'association de ces facteurs construit peu à peu le terrain du diabète. Les experts parlent même de "diabésité" pour qualifier cette épidémie de cas de diabète dus à l'obésité [18.19].

2.2.2 L'hérédité

Aux facteurs environnementaux viennent s'ajouter les facteurs génétiques. Le diabète de type 2 est une maladie à prédisposition familiale. En effet, l'existence d'un père ou d'une mère diabétique multiplie le risque de survenue de la maladie par deux. De même, un quart des frères et sœurs d'un diabétique de type 2 sont ou seront atteints. A savoir, chez les vrais

jumeaux, si l'un souffre de diabète, l'autre présente un risque de presque de 100% d'être touché.

2.2.3 L'âge

Le risque de diabète de type 2 augmente avec l'âge. Actuellement, la tranche d'âge la plus touchée par le diabète est celle des 40-59 ans [20].

2.3 Physiopathologie

Le diabète de type 2 apparaît généralement suite à un double problème: Dans un premier temps, un état d'insulinorésistance vient s'installer, empêchant l'organisme d'utiliser efficacement l'insuline qu'il produit. En fait, l'insulinorésistance peut mener à une aggravation du diabète. Chez les personnes insulinorésistantes, le glucose sanguin pénètre plus difficilement dans les cellules musculaires, adipeuses et hépatiques, où il doit être normalement stocké, ce qui cause une hyperglycémie. Dans ces circonstances, l'organisme doit produire une quantité de plus en plus importante d'insuline afin de maintenir une glycémie constante. On estime que 90 % des personnes atteintes de diabète de type 2 sont insulinorésistantes [21]. Après plusieurs années (10 à 20 parfois), le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline : c'est l'insulino-déficience.

Il est admis que la pathologie du diabète de type 2 se caractérise principalement par une glycémie élevée alors que l'insulinémie est normale ou élevée. Cette hyperglycémie exerce un effet toxique sur les cellules B pancréatiques, les hépatocytes dont la production glucosée est perturbée et les tissus périphériques (consommation glucosée anormale). Pour bien comprendre la gravité du diabète, il faut avoir présent à l'esprit que le glucose, très abondant dans l'organisme, n'est pas un produit neutre (glucotoxicité). Trop abondant, il va exercer des effets délétères :

- Physiques, en accroissant la viscosité du sang, ce qui endommage les vaisseaux.
- Physiologiques en modifiant les sécrétions pancréatiques (c'est là l'origine de la plupart des effets de cette pathologie).
- Chimiques, en formant des liaisons avec les acides aminés des protéines d'où la formation de l'hémoglobine glyquée [22].

2.4 Complications du diabète de type 2

Le diabète de type 2 apparaît enfin comme un enjeu très important pour la santé publique. Son coût est en grande partie imputable aux complications. En Europe, les coûts du traitement du diabète et de ses complications sont estimés à 5.8 % du budget total des soins de santé [23]. Effectivement, cette forme du diabète, par fréquence, est responsable de la très grande majorité des complications liées à l'ensemble des diabètes. Ainsi ce diabète longtemps qualifié de « petit diabète » est en réalité un redoutable et silencieux « pourvoyeur de complications ». Les organes ainsi touchés sont :

2.4.1 Le système cardiovasculaire

Le diabète contribue à l'émergence des maladies cardiovasculaires. Elles sont de 2 à 4 fois plus fréquentes chez les diabétiques que dans la population générale. Un taux élevé de glucose dans le sang contribue à la coagulation du sang. Avec le temps, le risque d'obstruction de vaisseaux sanguins près du cœur (infarctus) ou au cerveau (AVC) augmente. L'âge, l'hérédité, l'hypertension, l'embonpoint et le tabagisme accroissent aussi les risques. Les diabétiques de type 2 ont souvent un profil qui les rend au départ plus à risque de ce genre de maladie. En moyenne, les personnes diabétiques de type 2 mourront de 5 à 10 ans plus tôt que celles qui n'ont pas le diabète. Cela est surtout attribuable aux maladies cardiovasculaires [24].

2.4.2 Les yeux

Le diabète sucré provoque des occlusions des petits vaisseaux capillaires de la rétine, une ischémie (absence d'irrigation) de zones de la rétine et des hémorragies. Cette éventuelle atteinte de la rétine implique de faire réaliser un examen ophtalmologique annuel, même en l'absence de troubles visuels, afin de détecter la survenue de telles complications. La rétinopathie diabétique est aujourd'hui la première cause de cécité avant l'âge de 50 ans. Globalement, on peut estimer qu'après 15 années de diabète, 2% des diabétiques perdent la vue et 10% souffrent de malvoyance.

2.4.3 Les nerfs

La neuropathie est le nom donné aux affections qui touchent les nerfs et qui peuvent être passablement douloureuses, quelle qu'en soit la cause. Elle se forme dans les 10 premières années du diabète chez 40 % à 50 % des personnes diabétiques de type 1 ou 2.

La neuropathie découle d'une mauvaise circulation sanguine (donc d'un apport en oxygène insuffisant pour les nerfs) et du taux élevé de glucose qui altère la structure des nerfs. Le plus souvent, le sujet ressent des picotements, des pertes de sensibilité et des douleurs qui se manifestent d'abord au bout des orteils ou des doigts, puis remontent progressivement le long des membres atteints. La neuropathie peut aussi toucher les nerfs qui contrôlent la digestion, la pression sanguine, le rythme cardiaque, les organes sexuels et la vessie.

2.4.4 Les reins

La capacité de filtration du rein est altérée et entraîne une glomérulopathie. On assiste à une accumulation de déchets dans le sang ainsi qu'à une élimination anormale de certaines substances dans les urines (albumine par exemple). Cette glomérulopathie évolue au fil des années et peut aboutir au stade d'insuffisance rénale chronique puis terminale. La dialyse ou la transplantation rénale sont à ce stade les deux seules alternatives pour permettre au sang d'être filtré. La néphropathie diabétique se développe chez environ 8% des personnes atteintes de diabète de type 2.

Rappelons que la néphropathie diabétique est la principale cause d'insuffisance rénale dans les pays développés. A l'heure actuelle, 30 à 50% des personnes qui atteignent le stade d'insuffisance rénale terminale dans les pays occidentaux sont atteintes de diabète et plus généralement de diabète de type 2. De plus, les diabétiques représentent 20 à 50% de toutes les personnes sous dialyse [25].

Ces complications aggravent le diabète et diminuent l'espérance de vie des personnes atteintes de cette maladie. En fait, Les diabétiques voient leur risque de mourir prématurément multiplié par deux on comparaison des non diabétiques, leur espérance de vie serait réduit de 12 à 13 ans. Néanmoins, la majorité de ces complications peuvent être évitées, diminuées ou retardées si le diabète est dépisté et traité précocement et correctement [26].

3. Traitement du diabète de type 2

Le facteur le plus important du traitement du diabète de type 2 est l'aspect nutritionnel. Même si certaines personnes qui présentent ce type de diabète sont minces, la majorité (de 80 % à 90 %) sont obèses. Le fait de perdre du poids (même de 2 kg à 5 kg) peut contribuer à abaisser le taux de sucre sanguin. Pour bien des gens, une alimentation saine et un programme d'exercices peuvent suffire à équilibrer la glycémie. Dans d'autres cas, le régime alimentaire et

l'exercice ne suffisent pas à eux seuls; la prise de médicaments devient alors nécessaire pour maintenir constant le taux de sucre sanguin [23].

Les antidiabétiques oraux (ADO), également appelés hypoglycémisants oraux, permettent d'abaisser le taux de sucre dans le sang. Ces agents agissent sur la cellule B du pancréas, la production hépatique du glucose, la digestion des glucides ou encore sur l'insulinosensibilité. On distingue :

3.1 Les biguanides

Ce groupe de produits agit contre l'insulinorésistance. La metformine qui fait partie de ce groupe est connue sous le nom commercial de Glucophage ou Glumetza. Elle freine la production hépatique de glucose par inhibition de la néoglucogenèse, augmente le captage musculaire du glucose par translocation des transporteurs du glucose GLUT-4 et la synthèse musculaire de glycogène et inhibe la lipolyse au niveau du tissu adipeux et la production de VLDL (lipoprotéines de très faible densité) par le foie, ce qui réduit considérablement la résistance à l'insuline [27].

La metformine n'entraîne aucune stimulation de la sécrétion d'insuline. C'est pourquoi aucune hypoglycémie n'a jamais été constatée en monothérapie ou en association aux autres antidiabétiques oraux. De plus, elle freine la prise du poids. La durabilité de son effet ainsi que son efficacité sur le contrôle glycémique ont été globalement en faveur de la metformine comme monothérapie de première intention. Seules l'intolérance digestive (diarrhée) et un très faible risque d'acidose lactique (sujets très âgés, insuffisants cardiaques ou rénaux, états d'hypoxies tissulaires) limitent modérément l'usage [28].

3.2 Les sulfamides hypoglycémisants

Premiers antidiabétiques oraux disponibles, ils ont été ceux les plus prescrits en France jusqu'à il y a peu de temps. Ils agissent exclusivement en stimulant l'insulinosécrétion prandiale et plus modérément à distance des repas. Leur pouvoir hypoglycémiant est puissant et démontré. Ils sont neutres sur le plan métabolique. Leur association avec tous les autres ADO non insulinosécréteurs est possible. Leur usage est logique en première intention chez des diabétiques de type 2 sans surpoids ni obésité. Stimulant la sécrétion d'insuline, ils sont responsables d'une discrète prise de poids et peuvent constituer un obstacle à l'amaigrissement. Leur effet sur la sécrétion d'insuline s'exerçant quel que soit le niveau

glycémique ce qui fait que leur principal risque est l'hypoglycémie, dont la fréquence, la durée et la profondeur doivent être bien connues [29].

3.3 Les glinides

Ce sont des insulinosécréteurs plus récemment introduits sur le marché. Ils agissent plus rapidement et plus brièvement sur la sécrétion d'insuline et ciblent plus spécifiquement la phase d'hyperglycémie postprandiale. Leur action plus courte réduit le risque hypoglycémique mais oblige à plusieurs prises quotidiennes (une avant chaque repas). En France, seul le répaglinide est disponible : ses indications recouvrent celles des sulfamides hypoglycémiantes avec moins de limitation d'usage chez les sujets âgés et insuffisants rénaux [29].

3.4 Les inhibiteurs des alphaglucosidases

Leurs effets s'exercent uniquement sur le tractus digestif. Ils entravent la décomposition des oligo- et polysaccharides dans l'intestin grêle et inhibent de cette manière l'absorption du glucose. Ils ne sont pas beaucoup utilisés car ils ne sont pas très puissants et provoquent souvent des troubles gastro-intestinaux en raison des gaz qui apparaissent lors de la dégradation bactérienne des saccharides partiellement digérés dans le colon. L'association à la metformine est efficace mais souvent mal tolérée du fait du renforcement des effets secondaires digestifs respectifs des deux molécules [30].

3.5 Les thiazolidinediones (TZD)

Cette classe est représentée, aujourd'hui par deux types de molécules : la rosiglitazone et la pioglitazone connues commercialement sous les noms respectifs de Avandia et Actos. Il s'agit de molécules insulinosensibilisatrices, qui requièrent la présence d'insuline dont elles potentialisent les effets sur le tissu musculaire et à un moindre degré sur le foie. Il s'agit d'agonistes des récepteurs PPAR-gamma qui jouent un rôle majeur dans le métabolisme au niveau du tissu adipeux et qui, indirectement, contrôlent le métabolisme glucidique. Chez les diabétiques de type 2, l'action s'exerce principalement en abaissant les taux anormalement élevés d'acides gras libres (AGL) circulants. À l'inverse de la metformine, les TZD accroissent principalement l'utilisation du glucose par le muscle et, à moindre degré, elles réduisent la production hépatique de glucose. Cette diminution des AGL semble expliquer l'accumulation de tissu adipeux sous-cutané qui est responsable en partie de la prise de poids

constamment enregistrée avec les deux TZD. Les TZD n'entraînent pas d'hypoglycémie en monothérapie ni en association avec la metformine [31].

3.6 Le passage à l'insulinothérapie

Au fur et à mesure que le diabète de type 2 progresse, la carence insulinosécretoire s'aggrave inéluctablement, ce qui peut conduire à terme à la nécessité de recourir à une insulinothérapie. En effet, des injections d'insuline peuvent s'imposer lorsque les médicaments ne suffisent plus, car la sécrétion d'insuline diminue avec le temps chez les diabétiques de type 2. Cela peut aider à prévenir les complications du diabète [32].

Malgré l'apparition de nouvelles classes thérapeutiques d'ADO, nombre de patients ne parviennent pas à équilibrer leur glycémie de façon constante. C'est pourquoi il était utile de développer à chaque fois de nouveaux traitements plus efficaces. Récemment, l'arsenal médicamenteux du traitement du diabète de type 2 vient d'être enrichi par une nouvelle catégorie thérapeutique basée sur le concept incrétine. Étant donné que tous les ADO susmentionnés ont environ un effet hypoglycémiant maximal identique, les incrétines, hormones digestives nouvellement découvertes, sont capables de diminuer la glycémie mais sans risque d'hypoglycémie. Il s'agit d'une première de très grande importance dans le **traitement du diabète de type 2** [5,33].

4. L'effet incrétine

Depuis plusieurs décennies, il a été remarqué que l'administration du glucose par voie orale provoque une sécrétion d'insuline beaucoup plus importante que par voie veineuse. Deux peptides découverts plus tard, le *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP) et le *glucagon-like-peptide-1* (GLP-1), se sont avérés être à l'origine du phénomène appelé effet incrétine. Ces deux hormones sont sécrétées par le tube digestif lors de la prise d'un repas pour stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas, uniquement lorsque le taux de glucose dans le sang est élevé. Autrement dit, elles ne diminuent la **glycémie** que quand celle-ci est élevée, ce qui écarte tout risque d'hypoglycémie. Ce phénomène est à la base de la régulation de la **glycémie** étant donné que 50 à 60% de l'insuline sécrétée dans le sang en réaction à un repas standard est diffusée uniquement à travers l'effet de ces hormones [5, 34].

4.1 Synthèse sécrétion et dégradation du GLP-1

Le GLP-1 fait partie de la superfamille des hormones aux quelles appartient le glucagon. C'est un produit du gène du proglucagon, localisé sur le bras long du chromosome 2. Ce gène s'exprime aussi dans le pancréas des mammifères, dans le cerveau et l'intestin. Le principal produit génique du proglucagon dans le pancréas est le glucagon alors que dans l'intestin c'est le GLP-1 [35]. Ce dernier est un peptide de 30 acides aminés qui est sécrété principalement sous la forme d'un fragment [7-36] chez les êtres humains. Il est sécrété par les cellules L ou les cellules entéro-endocriniennes de l'iléum et du côlon.

Les concentrations plasmatiques de GLP-1 sont extrêmement faibles à jeûne et augmentent rapidement en réponse à la prise alimentaire. Ce peptide est, par la suite, très rapidement dégradé par une enzyme appelée la dipeptidyl-peptidase IV (DPP4 ou EC 3.4.14.5) qui clive les deux premiers acides aminés N-terminal du GLP-1, générant un peptide inactif, ayant même une action antagoniste. La demi-vie du GLP-1 est de l'ordre d'une à deux minutes [36,37].

4.2 Effet physiologique du GLP-1

Le GLP-1 possède des récepteurs spécifiques transmembranaires couplés aux protéines-G, qu'on retrouve dans le pancréas, l'estomac, le cœur, les poumons, les reins, le foie, les muscles, les tissus adipeux et le système nerveux central. Des études précliniques et cliniques ont démontré que le GLP-1 exerce un certain nombre d'actions biologiques dont la stimulation de la sécrétion d'insuline de façon glucodépendante qui disparaît dès que la glycémie est normalisée. À côté de ces effets sur l'insulinosécrétion, il a été clairement montré que le GLP-1 active la transcription du gène de l'insuline et toutes les étapes de la biosynthèse de l'insuline [38].

Fait important, Le GLP-1 inhibe la sécrétion du glucagon par une action directe sur la cellule alpha pancréatiques [5]. Cet effet est aussi glucodépendant et représente un mécanisme important dans le contrôle de la glycémie par le GLP-1. Par ailleurs, le GLP1 ralentit la vidange gastrique et diminue la prise alimentaire chez l'homme. De plus, Il a été montré en conditions expérimentales chez l'animal qu'il possède également des capacités trophiques sur la masse des cellules β des îlots de Langerhans (voir figure N°1) [39].

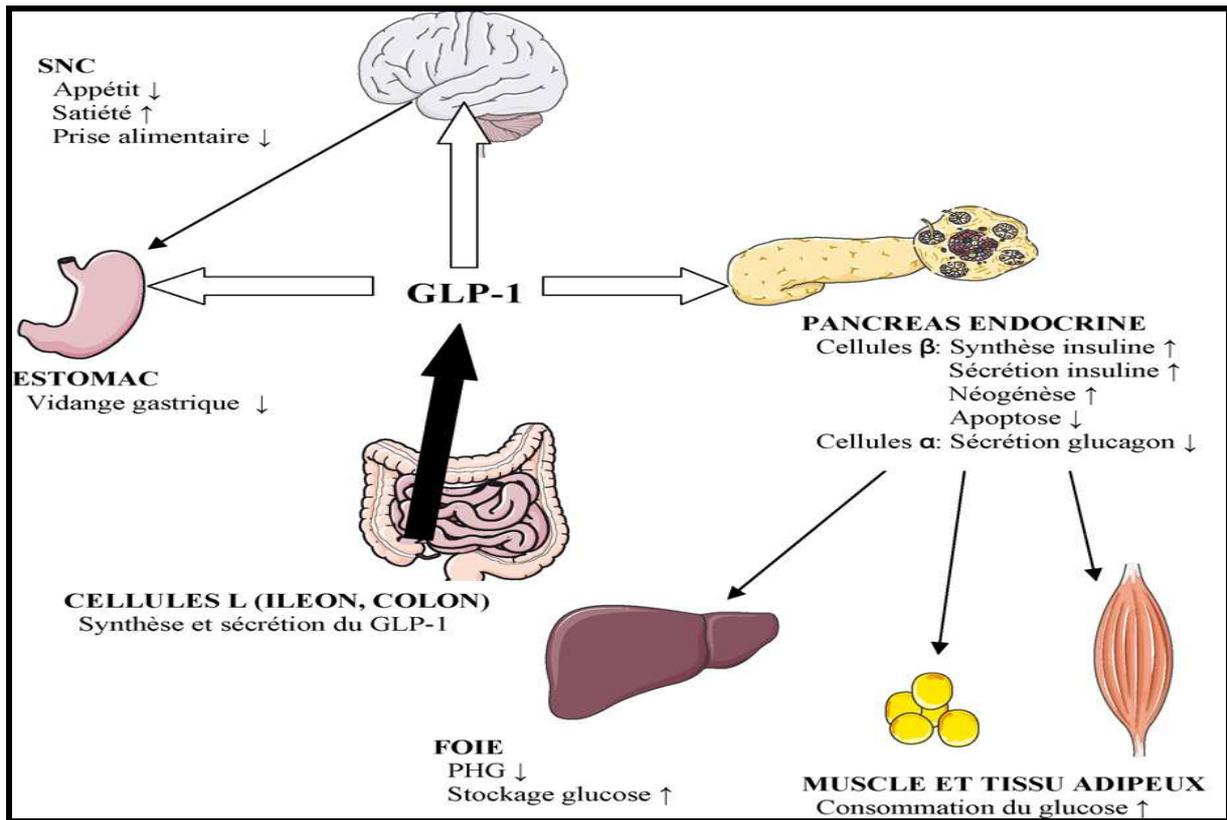


Figure N°1 : Action physiologique du GLP1.

SNC : système nerveux central ; PHG: production hépatique de glucose ; (↑) : stimulation, augmentation ; (↓) : inhibition, diminution ; (⇒) effets directs du GLP-1 ; (→) effets indirects du GLP-1 [5].

4.3 Stratégies thérapeutiques basées sur le GLP-1

Au cours du diabète de type 2, l'effet incrétine est globalement réduit (voir figure N°2). La majorité des données disponibles montrent que la sécrétion du GLP-1 est diminuée alors que celle du GIP est maintenue, et que l'action insulinothèque du GLP-1 est préservée alors que celle du GIP est altérée. Ainsi, des deux hormones, le GLP-1 pourrait être la réponse thérapeutique à bon nombre de problèmes rencontrés par les personnes atteintes de diabète de type 2. [40].

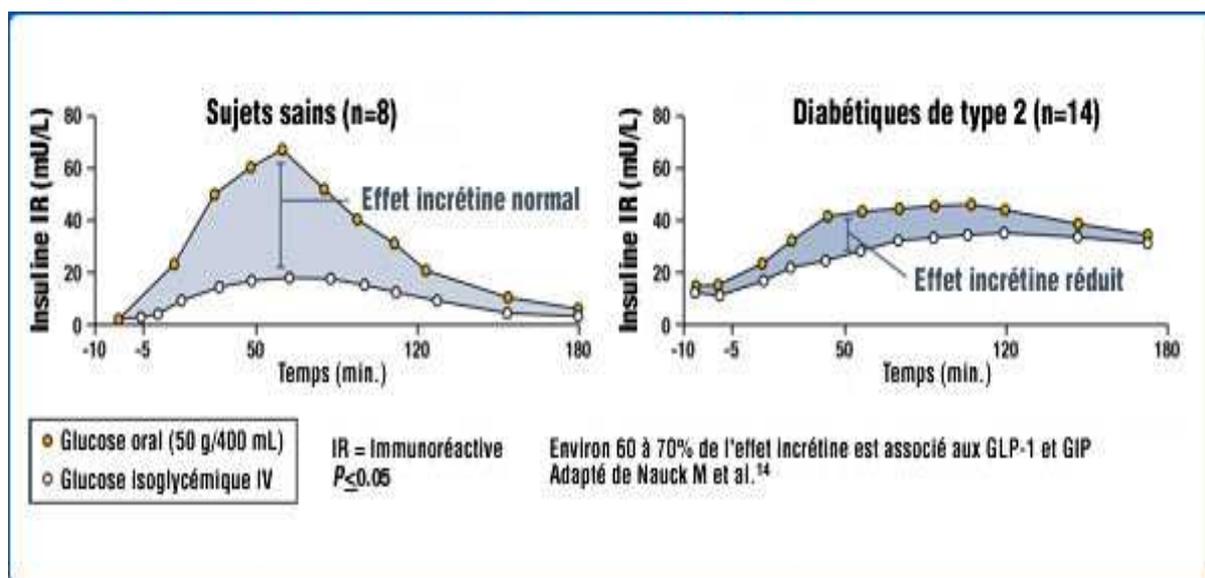


Figure N°2 : Diminution de l'effet incrétine chez les diabétiques de type 2.

L'administration sous-cutanée continue de GLP1 s'avère très efficace pour corriger nombre d'anomalies chez les diabétiques de type 2, en particulier l'hyperglycémie, les anomalies de la sécrétion d'insuline et du glucagon [41]. Toutefois, cette approche thérapeutique qui a validé le concept n'est pas envisageable car les injections peuvent être douloureuses, voire très mal supportées par les patients. Et de même, ce peptide a une demi-vie circulante très courte en raison de sa dégradation rapide par la DPP4. Par conséquent, son potentiel en tant qu'agent thérapeutique est réduit. Les tentatives actuelles pour contourner cet obstacle sont orientées dans deux directions: prolonger la durée d'action des composés exogènes qui simulent l'activité du GLP-1 (les mimétiques de l'incrétine) ou bloquer l'activité de la DPP4 afin d'améliorer l'activité du GLP-1 endogène [4].

4.3.1 Les mimétiques de l'incrétine

Le développement d'analogues du GLP-1 résistant à l'action de la DPP4 consiste soit à remplacer l'alanine située en avant-dernière position N-terminale (site d'action de la DPP4) du GLP-1 natif par un autre acide aminé (exemple : exénatide), soit en l'adjonction d'une chaîne latérale sur le GLP-1 (exemple : liraglutide) [5].

4.3.1.1 L'exénatide

C'est le tout premier analogue du GLP-1 disponible, mis sur le marché américain en avril 2005 sous le nom de Byetta. Il est la version synthétique de l'exendine-4, peptide naturel

isolé du venin d'un lézard appelé *Heloderma suspectum* ; il présente 53% d'homologie structurelle avec le GLP-1 humain. Dans sa structure, l'alanine en avant dernière position N-terminale est remplacée par la glycine, lui conférant sa résistance à la DPP4 [42]. Dès lors, ce peptide de 39 acides aminés est doté des activités du GLP-1 citées ci-dessus, et présente l'avantage d'une demi-vie d'environ 4 heures, ce qui autorise son administration par voie sous-cutanée en deux injections par jour [43].

Les avantages par rapport à l'insuline consistent en une absence de prise de poids (au contraire, un amaigrissement est généralement observé) et en la non-nécessité de recourir à une titration posologique basée sur une autosurveillance glycémique régulière. Le risque hypoglycémique avec l'exénatide est également très faible. Néanmoins, Les effets indésirables principaux sont d'ordre digestif, en particulier des nausées et des vomissements survenant chez 10 à 30% des patients en début de traitement [32].

4.3.1.2 Le liraglutide

Le liraglutide est un autre analogue du GLP-1 à longue durée d'action en raison d'une résistance partielle vis-à-vis de l'enzyme DPP4 [44]. Il présente 97% d'homologie structurelle avec le GLP-1 natif et porte une chaîne latérale d'acide gras de 16 carbones sur la lysine située en position 26 pour former une liaison non covalente avec l'albumine *in vivo*, réduisant ainsi l'accès à la DPP4 et l'élimination rénale. La demi-vie du liraglutide est de 15 heures permettant à cet analogue d'être utilisé en une seule prise par jour. Des effets favorables, comparables à ceux rapportés avec l'exénatide, ont été décrits en ce qui concerne l'amélioration du contrôle glycémique et la perte pondérale. Cependant, Les effets indésirables digestifs ont été plus fréquents dans le groupe liraglutide [42].

4.3.2 Les inhibiteurs de la DPP4

4.3.2.1 Les gliptines

Les gliptines sont des inhibiteurs compétitifs puissants et sélectifs de la DPP4 utilisés dans le traitement du diabète de type 2. Les plus connus sont la sitagliptine (Januvia) et la vildagliptine (Galvus). Il est important de souligner que ces inhibiteurs sont des petites molécules stables qui peuvent être prises par voie orale, sous la forme de comprimés. En inhibant la DPP4, ces molécules entraînent une augmentation importante de la concentration

de GLP-1 et de GIP ce qui provoque une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la sécrétion de glucagon (voire figure N°3) [45].

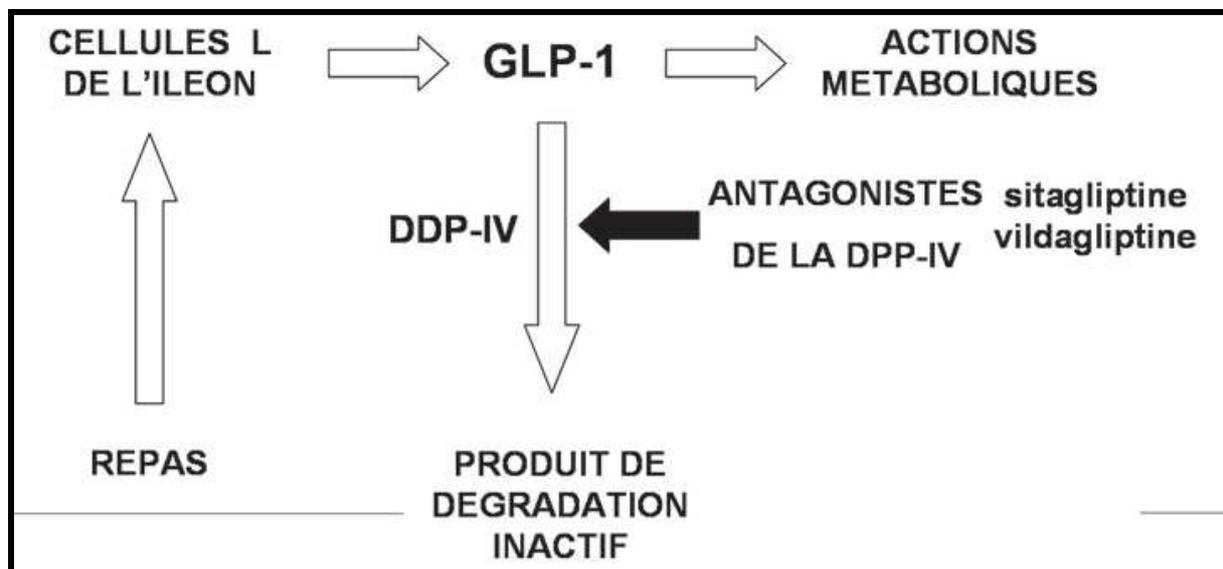


Figure N°3: Illustration des effets inhibiteurs de la DPP4 sur les taux de GLP-1.

La stimulation de l'insulinosécrétion dite gluco-dépendante, c'est-à-dire présente en cas d'hyperglycémie et disparaissant en cas d'hypoglycémie, représente un avantage incontestable par rapport aux sulfamides. En effet, cette caractéristique devrait fortement limiter, voire supprimer, le risque hypoglycémique, principal problème rencontré avec les insulinosécrétagogues actuellement utilisés en clinique [34]. Une autosurveillance glycémique régulière n'est donc pas indispensable avec les inhibiteurs de la DPP4. Dans les essais cliniques contrôlés, l'incidence des hypoglycémies avec la sitagliptine s'est avérée similaire à celle rapportée avec le placebo et, en combinaison avec la metformine, inférieure à celle observée avec le glipizide (sulfamide) [46].

La sitagliptine, comme la vildagliptine, ont un effet relativement neutre en ce qui concerne le poids, contrastant avec la prise pondérale généralement observée avec les sulfamides. Les inhibiteurs de la DPP4 ne s'accompagnent cependant pas d'une perte pondérale notable, contrairement à ce qui est observé avec l'exénatide ou avec le liraglutide [43.44]. Ces derniers incrétinomimétiques permettent sans doute d'obtenir un effet de type GLP-1 plus marqué que les antagonistes DPP4, mais au prix de la nécessité de recourir à une injection sous-cutanée.

Les antagonistes de la DPP4 sont sans doute un peu moins puissants, par contre, ils ont l'avantage d'une utilisation très simple, avec une prise orale unique par jour, ainsi que d'une excellente tolérance subjective et objective [34].

5. Place des incrétines dans les traitements du diabète de type 2

Les nouveaux ADO basés sur le concept incrétine ouvrent, sans aucun doute et avec très peu d'effets indésirables, des perspectives thérapeutiques qui touchent à des dimensions de la pathogénie que les autres agents ne prenaient pas en compte jusqu'alors. À court et moyen terme, leur efficacité sur le contrôle glycémique apparaît légèrement inférieure à celle de la metformine, des sulfamides et des TZD, mais leur effet pondéral, l'absence d'hypoglycémies et, plus encore, l'espoir d'une préservation de la fonction insulaire pourraient leur conférer des avantages à long terme par rapport aux précédents [4]. Ceci explique notre intérêt pour l'effet incrétine et l'inhibition de la DPP4 en particulier. Le but de notre travail est de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs de la DPP4 par une approche théorique de modélisation par docking moléculaire.

Chapitre 2:

Les structures mises en jeu

1. Le récepteur : La dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4)

Les liaisons peptidiques formées avant ou après un résidu de proline sont relativement résistant à l'hydrolyse de la plupart des protéases connues, en raison de sa structure unique parmi la panoplie des acides aminés existant. Il n'est pas étonnant donc que des enzymes spécifiques participent au clivage de telles liaisons [47].

La dipeptidyl-peptidase IV, aussi appelé *adenosine deaminase complexing protein-2*, est une protéase de surface cellulaire appartenant à la famille S9b (aussi appelée famille des dipeptidyl-peptidases) parmi lesquelles on retrouve également la DPP8, la DPP9 et FAP. Ce sont des prolyl oligopeptidases qui éliminent sélectivement les dipeptides N-terminal des peptides contenant une proline ou une alanine en deuxième position [48]. Grâce à cette rare capacité de clivage spécifique de telles liaisons, ces protéases proline-spécifiques, dont les dipeptidyl-peptidases, jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme des peptides biologiquement actifs.

Il est important de signaler que cette famille d'enzymes, codée par un gène localisé dans le chromosome 2 en position q24.2, exclue la DPP I (l'EC 3. 4. 14. 1) et DPP II (l'EC 3. 4. 14. 2) situées dans les lysosomes et la DPP III (l'EC 3. 4. 14. 4) dans le cytosol [49].

La DPP4 est exprimé de manière ubiquitaire dans l'organisme, notamment dans la moelle osseuse, la bordure en brosse des entérocytes et dans l'endothélium vasculaire; appelée CD26 au niveau des lymphocytes-T, elle en constitue un marqueur de l'activation, signalisation et de prolifération [50].

1.1 Rôle physiologique

La DPP4 est impliquée dans plusieurs processus physiologiques [51.52] dont les mécanismes d'action (voir figure N°4) peuvent être résumés en trois points essentiels :

- ❖ La dégradation protéolytique des molécules biologiquement actives.
- ❖ L'adhérence aux protéines extracellulaires.
- ❖ Le rôle co-stimulateur dans l'activation des lymphocytes T.

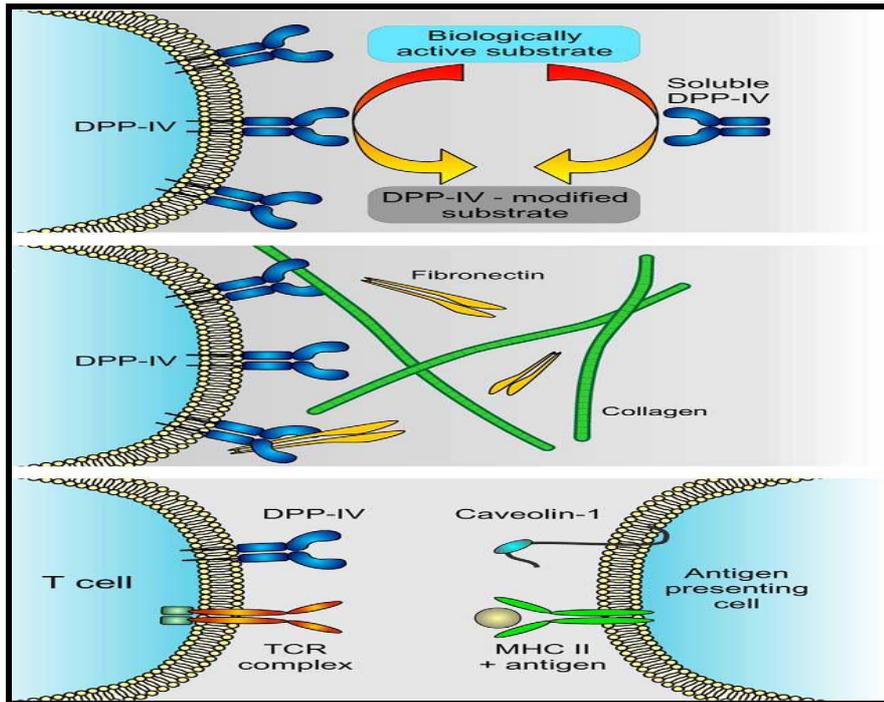


Figure N° 4 : Représentation schématique des différents mécanismes de fonctionnement de la DPP4.

Concernant le premier rôle de la DPP4 qui nous intéresse ici, les substrats spécifiques, notamment le GLP1 et GIP, sont connus et incluent en plus, plusieurs facteurs de croissance, neuropeptides et chemokines (voir tableau N°1) [50].

Tableau N°1 : Substrats de la DPP 4 et signification biologique après le clivage du dipeptide en N-terminal [48].

Substrat	signification	N-terminal
Peptides de régulation		
GIP	Inactivation	Tyr-Ala-Asp-
GRP	Inactivation	Val-Pro-Leu-
GLP1	Inactivation	His-Ala-Glu-
GLP2	Inactivation	His-Ala-Asp-
GHRF	Inactivation	Tyr-Ala-Glu-
PACAP-(1-38)	Inactivation	His-Ser-Asp-
Peptide YY(1-36)	Altération du récepteur	Tyr-Pro-Ile-
Neuropeptides		
Neuropeptide-Y (NPY)	Altération du récepteur	Tyr-Pro-Ser-
Substance P	Inactivation	Arg-Pro-Lys-
Chemokines		
Eotaxin (CCL11)	Altération du récepteur	Gly-Pro-Gly-
IP10 (CXCL10)	Altération du récepteur	Val-Pro-Leu-

ITAC (CXCL11)	Altération du récepteur	Phe-Pro Met-
(MDC, CCL22)	Altération du récepteur	Gly-Pro-Tyr-
Monokine induced by IFN-g	Réduction de l'activité	Thr-Pro-Val-
RANTES (CCL5)	Altération du récepteur	Ser-Pro-Tyr-
(SDF-1, CXCL12)	Altération du récepteur	Lys-Pro-Val

1.2 Description structurale

La DPP4 est une glycoprotéine de 110 kDa. On la trouve au niveau de la surface de la cellule mais elle existe aussi sous forme libre dans le sang. Elle a été identifiée en 1966 par Hopsu-Havu et Glenner, puis purifiée du foie du rat et du rein de porc, respectivement en 1967 et 1968, [53-55]. À cette époque, elle a été connue sous plusieurs noms dont «Dipeptidyl aminopeptidase IV », « Postprolinedipeptidyl aminopeptidase IV », « X-Pro dipeptidyl aminopeptidase » ou « Gly-Pro naphthylamidase » [49].

En pratique, le fragment soluble de la DPP4 est déterminé en utilisant la technique SDS-PAGE. En effet, quand on lance l'électrophorèse, dans des conditions dénaturantes, le fragment glycoprotéique correspondant à la forme soluble de la DPP4 migre approximativement à 90 kDa. Quant à la DPP4 totale, comme le montre la figure N° 5, migre à 110 kDa [56].

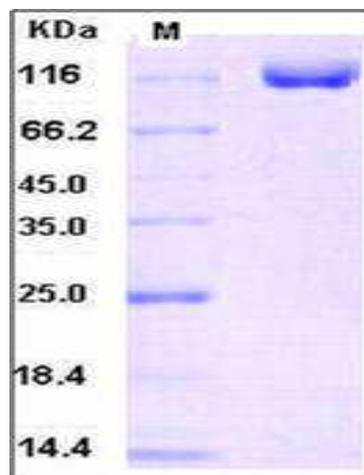


Figure N°5 : Migration de la DPP4 sur SDS-PAGE.

En raison de sa sensibilité au diisopropylfluorophosphate, la DPP4 a été définie comme une peptidase à sérine. Plus tard, ceci a été confirmé par de nombreuses analyses des séquences de sa structure primaire ainsi que son ADNc. La triade catalytique reportée par ces études (Ser/Asp/His) est caractéristique de quelques familles des peptidases à sérine [57,58].

Il est important de souligner que la DPP4 doit être sous forme homodimérique pour agir en tant que protéase à serine. En effet, chaque sous unité est ancrée à la membrane cytoplasmique par une simple hélice hydrophobique d'acides aminés (23 résidus sont transmembranaires) avec une région N-terminal intracellulaire (cytoplasmique) constituées par 6 acides aminés [59]. Quant aux 727 résidus restant, ils forment le domaine extracellulaire de la protéine et qui se caractérise par:

- une région glycosylée à côté de la membrane offrant à la protéine un grand pouvoir d'adhésion face à d'autres protéines. Sur le plan structural, on constate la présence de 9 liaisons de type N entre les résidus N-acétyl-glucosamine de la partie glucidique et les résidus Asparagine 85, 92, 150, 219, 229, 281, 321, 520 et 685 de l'enzyme.
- une région centrale riche en cystéine qui est à l'origine des 5 ponts disulfures constatés au niveau de l'enzyme. Ces ponts formés entre les résidus cystéine 328-339, 385-394, 444-447, 454-472 et 649-762 participent au maintien de la conformation tridimensionnelle du domaine extracellulaire active de la DPP4.
- un domaine C-terminal qui contient « la triade » **Ser630**, **Asp708** et **His740** caractéristique de la famille des peptidases à serine, bien entendu [56].

1.3 Le site actif de l'enzyme

Des études récentes menées sur la DPP4 utilisant la cristallographie au rayon X et la microscopie électronique de cryo-transmission ont fourni des informations précieuses sur la structure tridimensionnelle de la partie extracellulaire de l'enzyme ainsi que son mode d'action. Cette région est constituée de deux domaines, « **alpha/beta hydrolase** » et « **beta propeller** ».

Le site actif de l'enzyme représenté notamment par les résidus Ser630, Asp708 et His740, appartient, en fait, au domaine « alpha/beta hydrolase ». Il se situe, plus précisément, au niveau d'une grande cavité formé par un pli très proche de l'extrémité C-terminal de l'enzyme [60,61]. Les résidus Gly628, Trp629, Tyr631, Gly632 sont disposé autour du résidu Ser630 en formant une poche appelée **S1** [62].

Quant à l'autre domaine, d'après une étude réalisée par Engel et *al*, il participe aux interactions protéine-protéine indispensables pour bien accrocher le substrat dans le site actif de l'enzyme [60]. À ce niveau là, on distingue la présence d'une très courte hélice contenant 2

résidus Glu (Glu 205 et 206) qui font partie avec d'autres résidus comme Arg125 de la poche S2 jouant un rôle très remarquable dans la stabilité du complexe (voir figure N°6 et 7) [62].

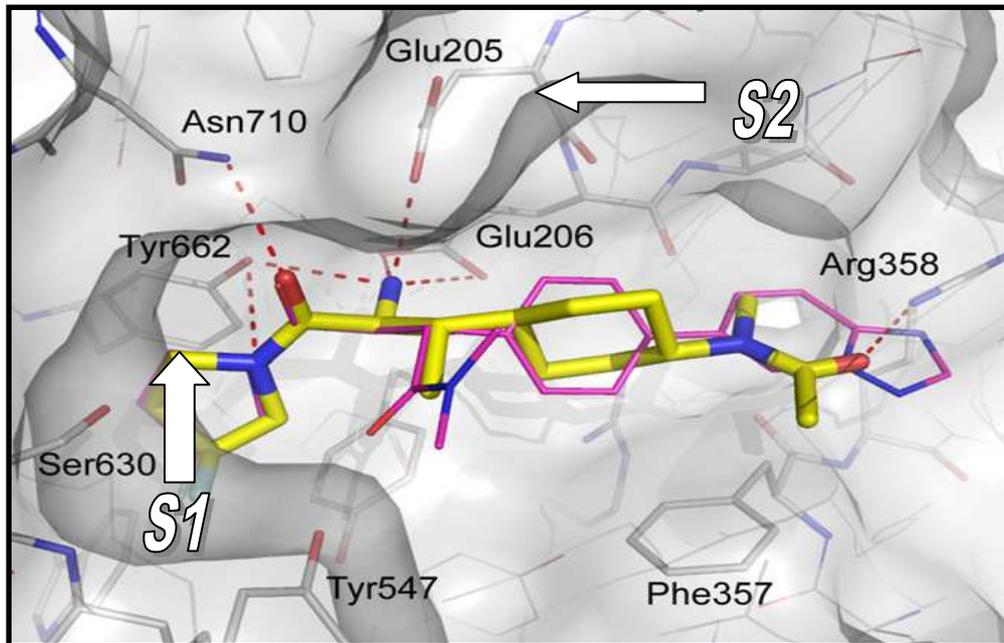


Figure N° 6 : Représentation schématique des poches S1 et S2 du site actif de la DPP4.

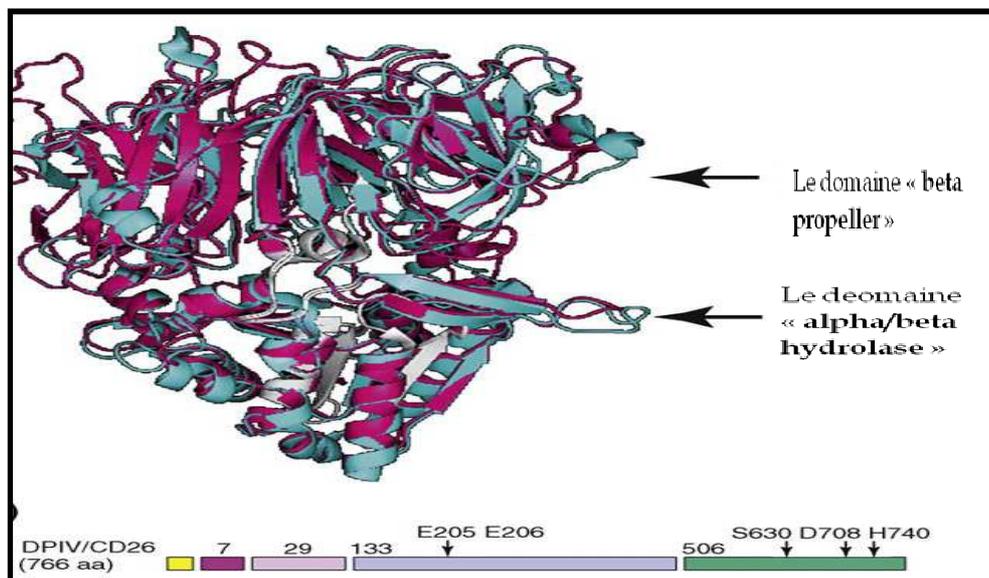


Figure N°7 : Démonstrations des différents domaines de la DPP4 [48].

- L'extrémité N-terminal
- Le domaine transmembranaire
- La région N-terminal du domaine alpha/beta hydrolase
- Domaine beta propeller
- L'extrémité C-terminal

2. Les inhibiteurs de la DPP4

Les inhibiteurs de la DPP4 sont de petites molécules de synthèse appartenant à trois familles chimiques différentes. Ils inhibent sélectivement la DPP4, enzyme responsable de la dégradation du GLP-1, et prolongent ainsi la demi-vie du GLP-1 endogène, ce qui contribue significativement à normaliser la glycémie chez les diabétiques de type 2 (figure N°8) [5].

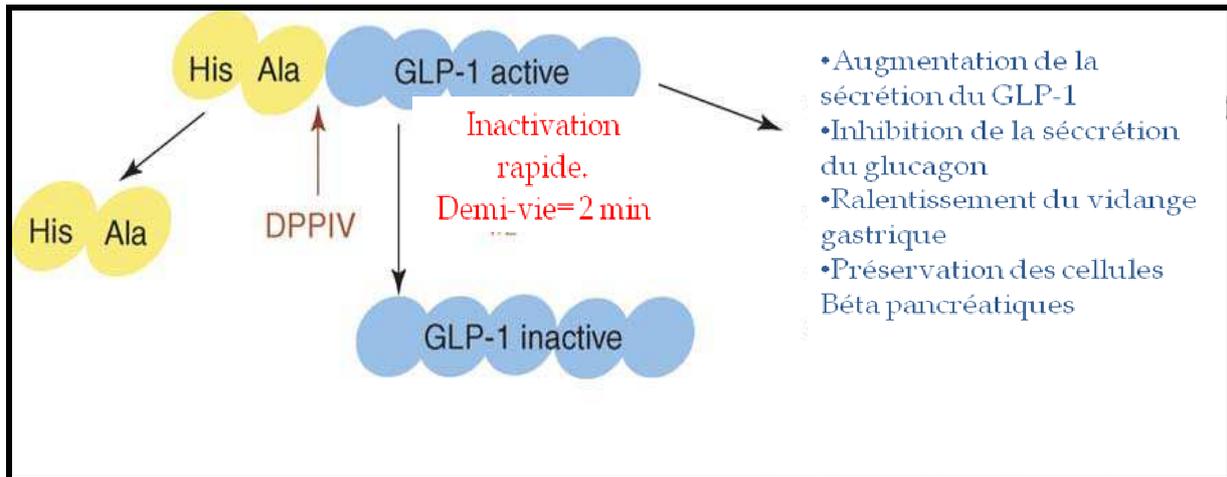


Figure N°8 : Effet de la DPP4 sur la GLP-1.

La synthèse des inhibiteurs de la DPP4 a débuté dès 1977. A cette époque, ces molécules étaient destinées aux traitements de maladies autres que le diabète. Citons à titre d'exemple les travaux de Doreen et *al* (1996) concernant la synthèse du 4-cyanothiazolidide pour répondre à quelques problèmes inflammatoires et immunitaires [63].

Ce n'est que récemment, après la validation du concept des incrétines, que les recherches sur les traitements du diabète de type 2 se sont orientées vers l'inhibition de la DPP4. Actuellement, plus de 30 compagnies pharmaceutiques et biotechnologiques participent au développement de ces molécules.

Afin de rationaliser au mieux la conception de nouveaux inhibiteurs de la DPP4 biologiquement plus actifs, les produits naturels de l'enzyme (dipeptides qui se terminent par alanine ou proline) ont été modifiés chimiquement pour obtenir deux classes d'inhibiteurs : les inhibiteurs réversibles et les inhibiteurs irréversibles. Plus récemment, grâce aux techniques de criblage, la panoplie des inhibiteurs de la DPP4 s'est enrichie avec la mise à disposition d'une 3^{ème} classe de molécules non peptidiques [64]. Une connaissance plus approfondie de la structure tridimensionnelle de l'enzyme, publiée en 2003, a rendu possible la conception d'inhibiteurs non peptidiques plus puissants, comme c'est le cas des xanthines

et des aminopyrimidines qui présentent une activité inhibitrice 5 fois plus forte que celle des deux premiers classes [65,66].

En plus de ces 3 classes d'inhibiteurs, beaucoup d'autres molécules sont en cours de développement, ce qui témoigne de l'engouement de l'industrie pharmaceutique pour cette nouvelle approche thérapeutique.

2.1 Première classe: les analogues de produits compétitifs

Il s'agit de la classe la plus importante car la quasi-majorité des inhibiteurs connus sont des inhibiteurs compétitifs. Ce sont des dérivés d'acides aminés ressemblant aux dipeptides libérés lors de l'hydrolyse par la DPP4. Autrement dit, ce sont des analogues des dipeptides X-Ala ou bien X-Pro qui se lient de manière réversible au niveau de la poche hydrophobe S1 du site actif de l'enzyme, en bloquant l'accès au substrat. Dans ce cadre, on distingue : les pyrrolidines et les thiazolidines (figure N° 9) [67].

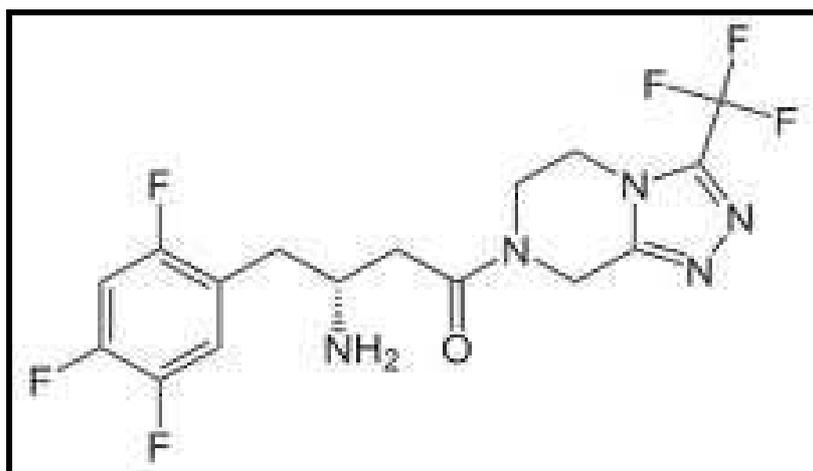


Figure N°9 : Structure de la Sitagliptine.

A titre d'exemple, la sitagliptine est le premier inhibiteur de DPP4 disponible sur le marché. Il bloque la voie de dégradation du GLP-1 par la DPP4. Á l'échelle moléculaire, la sitagliptine est un inhibiteur compétitif formant des liaisons non covalentes avec l'enzyme. Son groupement phényle occupe la poche hydrophobe **S1** du site actif où réside la sérine 630 [68]. Ceci se traduit par une augmentation prolongée des taux de GLP-1 stimulant ainsi la production d'insuline en présence de glucose tout en inhibant la sécrétion de glucagon.

2.2 Deuxième classe : les analogues de produit irréversible.

Parmi les inhibiteurs les plus puissants de la DPP4, sont ceux appartenant à la classe des cyanopyrrolidines. Ils se lient de manière covalente par leur groupement nitrite au résidu Ser630 du site actif de l'enzyme, ce qui confère à ces molécules une demi-vie considérablement élevée par rapport aux autres classes [69].

Parmi la panoplie d'inhibiteurs à base cyanopyrrolidine on retrouve la vildagliptine (figure N°10). C'est le 2^{ème} inhibiteur mis sur le marché pour le traitement du diabète de type 2. Contrairement aux autres inhibiteurs, il se caractérise par une longue durée d'action.

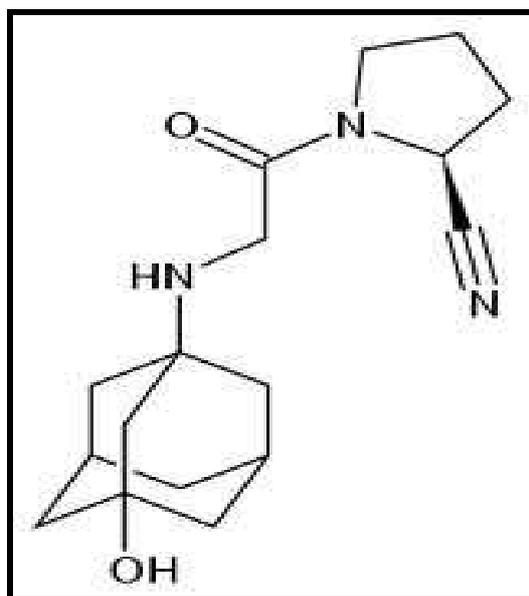


Figure N°10 : Structure de la vildagliptine.

2.3 Troisième classe : les inhibiteurs réversibles non peptidiques

Contrairement aux inhibiteurs décrits précédemment, cette classe comprend des molécules autres que le produit naturel de l'enzyme. Leur synthèse a été inspirée suite à des études menées sur la structure tridimensionnelle de la DPP4 et en particulier son site actif. Il s'agit de molécules hétérocycliques incluant, en plus des xanthines faisant l'objet de notre étude (figure N°11), d'autres molécules à base purine, uracile, imidazole, pyrimidine et pyridines [6].

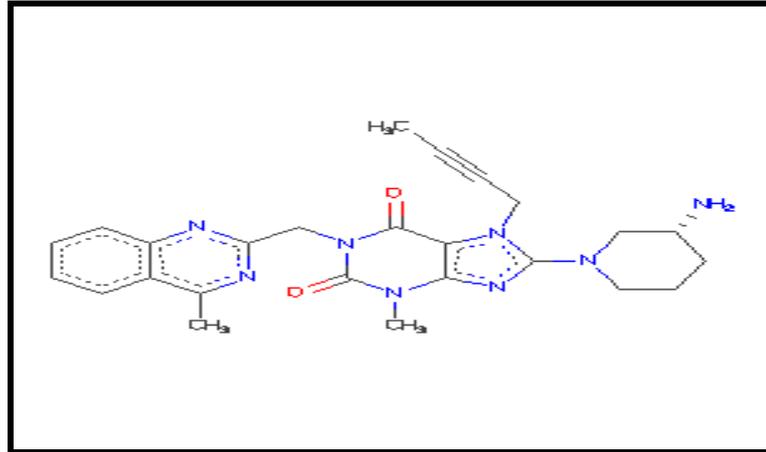


Figure N°11 : Structure de linagliptine (classe des xanthines).

Les xanthines constituent la plus récente classe d'inhibiteurs de la DPP4. Avec les plus basses valeurs de l' IC_{50} , ces molécules se présentent comme les meilleurs inhibiteurs de la DPP4 connus jusque là. Leur fort pouvoir inhibiteur est dû à leur carbonyle qui établit une liaison hydrogène avec la Ser630 du site actif de la DPP4 [6].

Dans notre travail, nous nous sommes servis des xanthines, en tant que meilleurs inhibiteurs de la DPP4, comme point de départ pour développer de nouveaux inhibiteurs encore plus puissants, en faisant appel aux approches de modélisation par docking moléculaire.

Chapitre 3: Le docking moléculaire

1. Introduction

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, allant de l'identification d'une cible biologique d'intérêt thérapeutique jusqu'au patient, dans lequel les essais cliniques succèdent au développement pré-clinique [70]. Entre 12 et 15 ans et près d'un milliard de dollars sont nécessaires à la mise sur le marché d'un médicament [71].

Dans le passé, la méthode expérimentale établie pour la recherche des ligands interagissant avec une protéine donnée est le criblage à haut débit (« HTS » en anglais). L'activité (ou plutôt l'affinité) d'un très grand nombre de composés est systématiquement testée (figure N°12) [72]. L'obtention de résultats positifs et leur confirmation conduisent à l'identification de touches (ou "*hits*") ou encore composés promoteurs. Il s'agit de composés interagissant significativement plus que la moyenne des autres composés testés sur la cible visée. Ces composés promoteurs sont par la suite optimisés en vue d'obtenir des candidat-médicaments, ayant des caractéristiques proches de celles d'un médicament (« drug-like », en anglais) [73].



Figure N°12 : Aperçu d'une plateforme de criblage haut-débit robotisé et d'une plaque à 96 puits.

Les difficultés intrinsèques aux techniques à haut débit ainsi que celles rencontrées lors des étapes d'optimisation des molécules chimiques, ont encouragé le développement de nouvelles approches, telles que les techniques de criblage virtuel par docking moléculaire, aux quelles font recours actuellement les compagnies pharmaceutiques. En effet, avec le développement de la cristallographie par rayons X et l'outil informatique, les méthodes de modélisation par docking moléculaire sont devenues des étapes cruciales dans de nombreux

programmes de découverte de médicaments. L'introduction du criblage virtuel a offert une nouvelle voie d'identification de ligands. Le criblage virtuel basé sur la structure 3D de la protéine consiste à amarrer et à prédire l'affinité d'un grand nombre de molécules (collectées en chimiothèques) pour le site actif ciblé. Les molécules les plus prometteuses sont sélectionnées, achetées ou synthétisées puis testées expérimentalement [72].

Le criblage virtuel permet d'accéder à un espace de molécules beaucoup plus grand que celui qui serait exploré par l'utilisation de techniques expérimentales (en raison du coût, du temps et de l'infrastructure nécessaire à ces dernières (figure N°12)). Il permet une pré-sélection qui augmente la probabilité d'identifier un ligand (par exemple : 34.8% contre 0.021% de molécules actives pour le criblage virtuel et HTS respectivement). De plus, les informations sur le mode d'amarrage d'un ligand permettent de comprendre structurellement son mode d'action et d'envisager son amélioration par dérivation [74].

Le criblage virtuel a été appliqué avec succès sur un certain nombre de cibles thérapeutiques (protéines) dont la structure 3D en complexe avec le ligand a été parallèlement déterminée. Actuellement, un bon nombre de médicaments mis sur le marché proviennent d'une conception rationnelle basée sur des stratégies de criblage virtuel comme par exemple :

- Des inhibiteurs de l'adose réductase: par recherche dans des bases de données de composés
- Un inhibiteur d'un élément de réponse de la trans-activation de la HIV-1 RNA: par docking rigide et recherche dans des bases de données de composés
- Un inhibiteur de la thrombine et celui de la glyceraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase : par docking sur des chimiothèques combinatoires [71].

2. Les outils du docking moléculaire

Docking (ancrage, amarrage ou arrimage moléculaire en français) est le nom donné aux simulations moléculaires dans lesquelles différentes approches sont combinées pour étudier les modes d'interaction entre deux molécules. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un récepteur macromoléculaire le plus souvent une protéine (cible) et d'une petite molécule (ligand). Le terme docking seul est couramment employé pour désigner un « docking protéine-ligand ». [75].

2.1 Le récepteur

Les structures 3D que nous utilisons proviennent de la PDB (« Protein Data Bank », en anglais), la plus grande archive de données structurales de macromolécules biologiques, comme les protéines et les acides nucléiques (ARN et ADN). Cette banque de données a été établie en 1971 et contenait à l'époque sept structures [72]. En avril 2011, plus de 72300 structures 3D, dont environ 67000 structures de protéines sont disponibles et accessibles gratuitement. Elles ont été résolues pour la grande majorité par cristallographie aux rayons X (un peu plus de 63000 structures) du fait que cette technique présente de nombreux avantages, notamment celui de ne pas être limitée par la taille de la protéine. L'étape limitant de cette méthode se situe principalement au niveau de l'obtention de monocristaux diffractant à une résolution suffisante. La RMN fournit, quant à elle, plus de 8800 structures contre seulement 360 dans le cas de la microscopie électronique [76].

De nombreuses informations associées à chaque structure sont accessibles à l'ensemble de la communauté scientifique via la PDB par un serveur internet (<http://www.rcsb.org/pdb/>). On peut y trouver la séquence correspondante, ses coordonnées atomiques, les conditions expérimentales (par exemple, la résolution), des images 3D...etc. Cette base de données est fiable car elle est vérifiée et maintenue par différents centres (RCSB, PDBj, MSD-EBI).

Les coordonnées atomiques des structures se trouvent dans un format de référence, appelé *pdb*, lu par différents logiciels de visualisation, de modélisation, de criblage virtuel...etc. Donc il suffit de consulter la PDB et d'inscrire le nom de la structure pour télécharger le fichier du récepteur au format *pdb* indispensable à l'opération de docking moléculaire.

Le fichier *pdb* contient diverses informations sur la macromolécule telle que le nom du récepteur, l'équipe qui a résolu la structure, la méthode expérimentale, ...etc. On y retrouve aussi des informations sur la structure primaire, les hétéro-atomes (ligand, métaux, résidus modifiés, ...etc.), la structure secondaire et les coordonnées atomiques X, Y et Z qui déterminent la position exacte de chaque atome dans une conformation donnée. Enfin, la dernière section du fichier fournit des informations sur les connections chimiques entre les atomes (voir annexe N°1) [72].

Il est important de signaler que certaines protéines ne sont pas encore disponibles dans cette banque de données et si cette dernière contient une protéine avec des séquences similaires, il devient alors possible de construire la structure 3D de la cible souhaitée, en utilisant la modélisation par homologie [74].

2.2 Le(s) ligand(s)

En docking moléculaire, le choix du ligand est une étape très importante. Ce choix doit être pertinent en raison de la spécificité du site actif de la cible évitant de tester inutilement des molécules [77].

À présent, il existe deux moyens pour obtenir la structure chimique d'un ligand donné : La première souvent d'aspect commercial, est constituée de bases de données de structures chimiques appelées chimiothèques ou espaces chimiques [78]. Le second moyen consiste à utiliser des ligands de la PDB ou de la littérature qu'on peut dessiner, optimiser et enregistrer dans différents formats (*pdb*, *mol*, *mol2*...etc.) grâce à des logiciels de construction moléculaire tels que chemDraw, Arguslab, Titan ou Sybyl pour ne citer que ces exemples.

2.3 Un programme de docking moléculaire

Le docking moléculaire a pour objectif essentielle de prédire la conformation (position et orientation relative) la plus favorable du ligand au sein de son récepteur. Initié au début des années 1980, ce domaine s'est développé pour devenir, de nos jours, un outil incontournable dans la recherche de produits biologiquement actifs [79.80].

À l'heure actuelle, plus de 30 programmes de docking moléculaires (commerciaux ou non) sont disponibles [70]. Les plus fréquemment cités sont respectivement: AutoDock [81], GOLD [82], FlexX [83], DOCK [84] et ICM [85] (voir figure N°13).

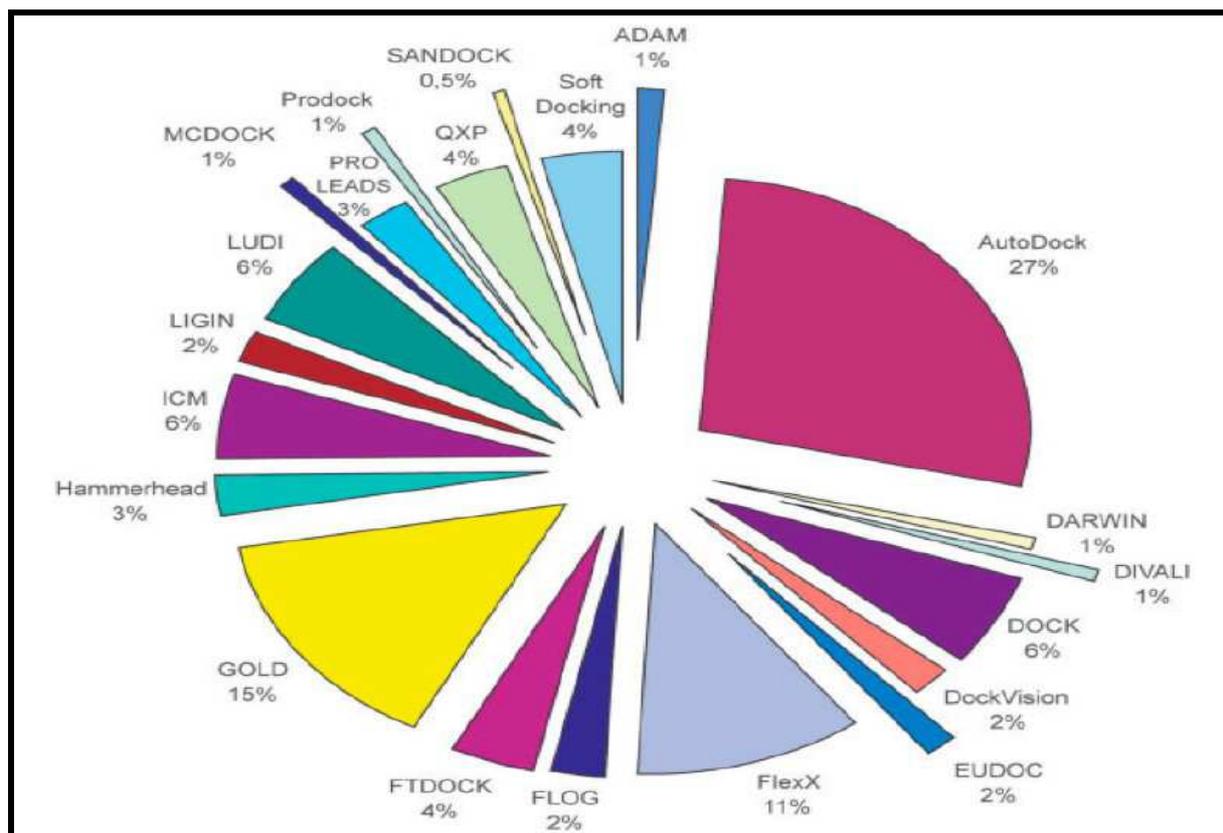


Figure N°13 : Comparaison des programmes de docking les plus cités [86].

Bien que ces programmes reposent le plus souvent sur des algorithmes spécifiques, leur protocole est composé de 2 étapes essentielles : La première, dite de « docking », permet aux petites molécules testées d'explorer l'espace conformationnel autour de la protéine. La molécule adopte plusieurs conformations et plusieurs positions au niveau de son récepteur. La deuxième étape, dite de « scoring », permet d'évaluer les poses obtenues lors de la première étape pour ne retenir que la meilleure. Cette étape donne lieu à un score [87].

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

Les premiers logiciels de docking développés au début des années 80 considéraient le récepteur et le ligand rigides en se basant sur le modèle « clé-serrure ». C'est sans aucun doute la catégorie la plus simple et rapide de docking. Mis en marche plus tard, le docking semi-flexible a permis d'obtenir des résultats plus précis. Le récepteur est considéré comme corps rigide mais tient compte de la flexibilité du ligand [88]. Aujourd'hui, la puissance de calcul des ordinateurs permet, pour certains logiciels de docking, de traiter la flexibilité du ligand et de façon partielle le récepteur.

La quasi-totalité des programmes de docking utilisés actuellement proposent une approche qui prend en compte la flexibilité du ligand, tout en considérant le récepteur rigide. L'utilisation de tels programmes mènent à de bon résultats, principalement quand la protéine a une flexibilité limitée. En effet, dans de tels cas, la structure cristallographique peut être considérée comme plus représentative de l'état de la protéine dans son environnement naturel, ce qui augmente les chances de simuler correctement le mode d'interaction protéine-ligand [75].

3.1 Le choix de l'algorithme de recherches

Bien entendu, les algorithmes de docking ont été conçus pour rechercher de façon objective, rapide et efficace les modes d'association récepteur-ligand les plus favorables [75]. Ce pendant, la recherche de la « pose optimale » du ligand au niveau de son récepteur est une des difficultés majeures en simulation *in silico* étant donné que le nombre de possibilités croît de manière exponentielle en fonction de la taille des composants. A titre d'exemple, pour reproduire la structure expérimentale d'un complexe protéine-ligand composés respectivement de 1562 et 449 atomes, en considérant ces derniers rigides, il faut un nombre d'essais de l'ordre de 10^7 . En intégrant la flexibilité des molécules, le problème devient encore plus important [78].

L'utilisation des programmes de docking a conduit à de nombreux succès dans le domaine de la découverte de nouvelles molécules bioactives [89]; néanmoins, leurs algorithmes sont toujours en maturation. Actuellement, il existe une panoplie d'algorithmes de docking qu'on peut répartir en deux grandes catégories selon la méthode utilisée :

- L'ajustement de fragments.
- Simulation par trajectoire.

3.1.1 L'ajustement de fragments (matching)

Cette méthode commence par construire un modèle «en négatif» du site actif dit *protomol* dans le cas du programme Surflex. Ce modèle est constitué par le volume accessible du site et les points d'interaction tels que les sites de liaison hydrogène, les charges ou les sites lipophiles.

Ces algorithmes sont dits aussi de fragmentation / reconstruction car, dans un premier temps, la molécule est découpée en parties rigides et en liaisons flexibles. Par la suite, les

parties rigides sont positionnées en premier et le ligand est reconstruit de proche en proche, explorant diverses conformations lors de la mise en place des liaisons flexibles [87]. Des logiciels tels que DOCK [84], Surflex [90] et FlexX [91] utilisent cette approche qui permet notamment un criblage rapide de vastes bibliothèques de composés (voir figure N°14) [92].

3.1.1 Simulation par trajectoire

La seconde approche, par trajectoire, est plus précise : à partir d'une position initiale aléatoire, à l'extérieur du site actif, le ligand considéré dans son entier explore le site étudié par la répétition successive de mouvements et d'évaluations de l'interaction ligand-récepteur. Les mouvements sont effectués par des opérations de translation, de rotation et de changement de conformation et bien entendu, l'algorithme s'arrête lorsqu'il trouve la position idéale du ligand dans le récepteur [92]. Ces techniques sont plus lentes que celles par *matching* mais prennent mieux en compte la flexibilité du ligand et permettent l'exploration de régions plus vastes. Dans cette catégorie nous pouvons citer GLIDE, GOLD [82] et AutoDock [81] (voir figure N°14). Dans notre travail, nous avons utilisé AutoDock qui est un algorithme génétique, dont le principe de fonctionnement sera détaillé plus bas.

La contrepartie de ces techniques est généralement une hausse des temps de calcul. Par conséquent, il est nécessaire de se focaliser sur l'objectif du projet. Si le but est de cribler une chimiothèque d'une dizaine de composés, l'utilisation de ces méthodes lentes et précises est recommandée. A l'inverse, un projet impliquant le criblage virtuel de millions de produits ne pourra pas être accompli avec ce type d'algorithme mais plutôt des codes plus simples, dans lesquels les approximations engendrent un gain de temps de calcul [71].

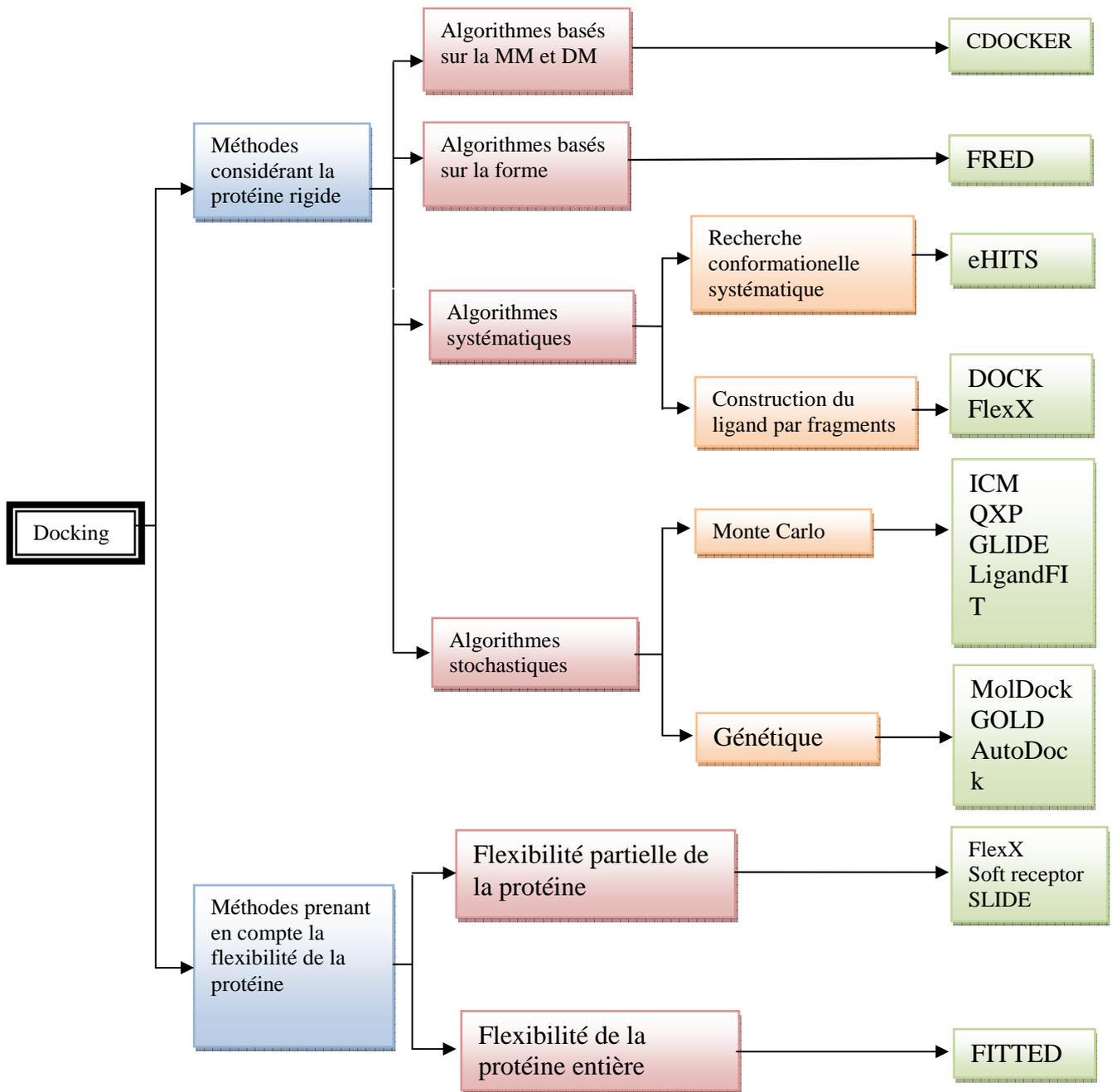


Figure N°14 : Méthodes automatisées de docking les plus connues et exemples d’algorithmes (en vert) fréquemment cités dans la littérature [75].

3.2 Algorithme Génétique Lamarkien (AGL)

Les algorithmes génétiques (AG) reprennent des mécanismes et la terminologie de la génétique naturelle et de l’évolution biologique. L’organisation d’un ligand en complexe avec un récepteur peut être définie par un jeu de paramètres décrivant la position, l’orientation et la

conformation du ligand par rapport au récepteur. Ces paramètres sont les «variables d'état» et dans un AG, chaque variable d'état correspond à un gène. La valeur de ces variables correspond au génotype et les coordonnées atomiques associées correspondent au phénotype. Chaque état défini du ligand correspond à un individu [92].

Pour l'implémentation de l'AG dans AutoDock, le chromosome est composé d'une chaîne de valeur-gènes réel qui décrit :

-l'emplacement ligand (trois coordonnées).

-l'orientation : trois coordonnées pour définir l'axe principal de la rotation, et une valeur pour l'angle de rotation du ligand autour de l'axe principal. Ces 4 coordonnées constituent le « quatérion » d'orientation.

-la conformation (une valeur pour chaque torsion).

L'algorithme génétique commence par créer une population aléatoire d'individus, dont la taille c'est à dire le nombre d'individus, est définie par l'utilisateur. Les différents gènes de chaque individu reçoivent des valeurs aléatoires comprises dans les limites de l'espace à explorer (lui même défini par l'utilisateur): les coordonnées de position sont localisées à l'intérieur de ce volume, les coordonnées du quatérion permettent toute orientation du ligand dans ce volume et les pivots peuvent prendre n'importe quelle valeur d'angle entre -180° et $+180^\circ$. Après la création aléatoire de la première population, le cycle de génération est répété jusqu'à ce que soit atteint le nombre maximum de générations ou le nombre maximum d'évaluations de l'énergie. Le cycle de génération se décompose en cinq étapes : transcription du génotype en phénotype (*mapping*) avec évaluation de l'énergie d'interaction ligand – récepteur, sélection, croisement, mutation et sélection élitiste. Chaque étape s'applique à l'ensemble des individus de la population [92].

La plupart des algorithmes génétiques reproduisent le comportement de l'évolution darwinienne en appliquant le principe de la génétique de Mendel c'est-à-dire le transfert à sens unique des informations du génotype vers le phénotype. Ce comportement est illustré par la partie droite de la figure N°15. Par contre, dans le cas où il existe un mécanisme de transcription inverse, un génotype peut être induit par un phénotype. Il est alors possible, pour un individu, d'acquérir de nouveaux caractères génétiques en fonction de son environnement,

et c'est dans ce sens que les algorithmes génétiques de Lamarckian (AGL) ont été développés [81.92].

Dans le cadre de l'interaction ligand-récepteur, on peut ainsi effectuer une optimisation locale du ligand par rapport au récepteur et remonter les informations du phénotype optimisé vers le génotype de l'individu. C'est ce qui est illustré par la partie gauche de la figure N°15. L'AGL implanté dans la version 4.2.3 d'AutoDock, utilisé dans notre travail, est une méthode hybride basée sur un algorithme génétique couplé à une méthode de recherche locale reposant sur un algorithme optimisé par Solis et Wets [93]. L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'ajouter à l'algorithme génétique, la possibilité de modifier le phénotype suivant la fonction de score qui a son tour modifie le génotype [94].

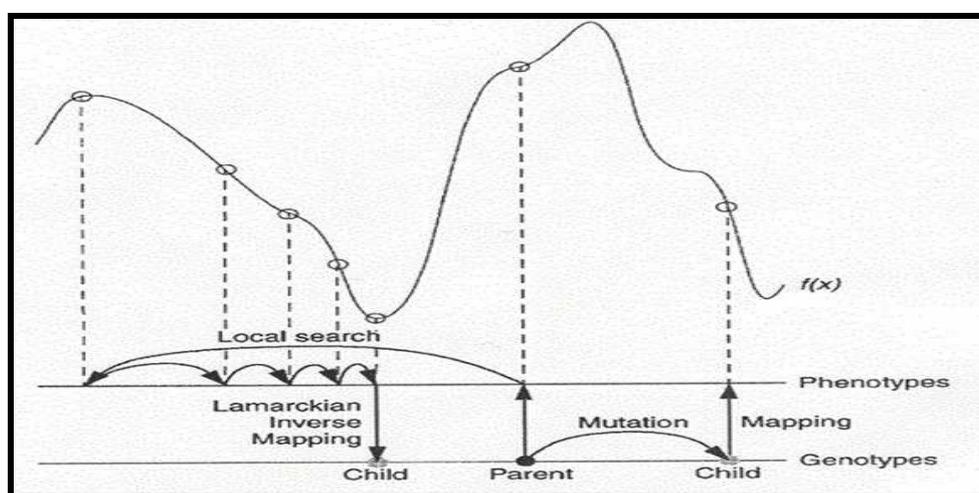


Figure N°15 : Principe de l'algorithme génétique de Lamarckian [94].

4. Scoring

La procédure de docking permet de générer une liste de complexes représentant les modes d'association favorables entre le ligand et le récepteur macromoléculaire. Les méthodes de "scoring" permettent, par la suite, d'évaluer l'énergie de liaison du complexe formé et de donner un score aux poses obtenues lors de la phase de docking, afin de trouver celui ou ceux les plus susceptibles de reproduire aux mieux le mode d'association réel [75].

L'association non covalente et réversible d'un récepteur (R) et d'un ligand (L) pour former un complexe récepteur-ligand (RL), dans un milieu aqueux contenant des électrolytes peut être décrite par l'Équation 1



À l'équilibre, cette réaction est déterminée par un constant d'équilibre K_{eq} (équation 2) et aussi par l'énergie libre de liaison $\Delta G'^{\circ}$ (équation 3).

$$K_{eq} = [RL] / [R] \times [L] \dots (2)$$

$$\Delta G'^{\circ} = - R T \ln K_{eq} \dots (3)$$

Où R est la constante des gaz parfaits et T est la température (en kelvin) [70.88].

Théoriquement, le complexe est favorable si la variation d'énergie libre globale de complexation est négative ($\Delta G'^{\circ}$ de complexation < 0). En pratique, l'évaluation de l'énergie libre des complexes est une tâche souvent coûteuse ce qui limite son utilisation en routine. De ce fait, des méthodes approximatives ont été développées pour distinguer (évaluer et classer) les meilleurs complexes parmi ceux générés par une procédure de docking : **les fonctions de score**. Dans les programmes de docking, on trouve différents types de fonction de score : celles utilisant un champ de force de mécanique moléculaire (CHARMM, AMBER, GAFF, GROMOS, OPLS, MMFF, ...etc.), celles reposant sur les connaissances actuelles (*Knowledge-based*) et les méthodes empiriques (Bohm's Score, ChemScore, Fresno, F-Score, SCORE, X-Score, ...etc.). Les fonctions de score les plus couramment utilisées sont présentées schématiquement dans la figure N°16 [75].

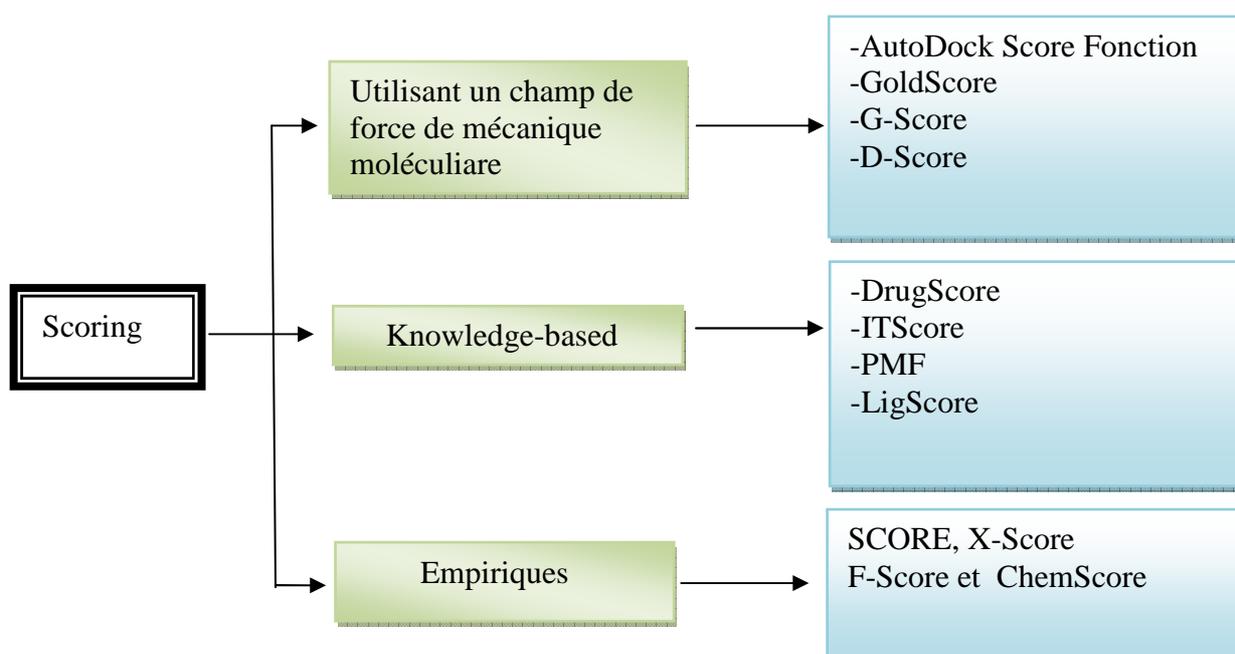


Figure N°16: Différents types de fonctions de score les plus connues (en vert) et les exemples (en bleu) les plus fréquemment cités dans la littérature [75].

Suivant la structure du ligand et son emplacement vis-à-vis du récepteur, AutoDock évalue leur affinité en utilisant une fonction de score basée sur une forme empirique de l'énergie libre d'interaction entre le ligand et le récepteur [94]. L'énergie est donnée par l'équation 4 :

$$\text{Équation 4: } \Delta G'^o = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{bond} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{tor} + \Delta G_{sol}$$

Les trois premiers termes sont des termes classiques de mécanique moléculaire ; il s'agit respectivement des énergies : dispersion / répulsion des atomes, liaisons hydrogène et interactions électrostatiques. ΔG_{tor} est un terme qui traduit l'augmentation d'énergie du système due à la restriction des rotors libres du ligand et à la restriction des rotations et translations du ligand lors de la complexation au récepteur. Cette perte de degrés de liberté est une perte d'entropie. ΔG_{sol} est un autre terme lié à l'entropie qui décrit les variations d'énergie du système lors de la désolvatation du ligand au moment de la complexation au récepteur. C'est une modélisation partielle de ce que l'on appelle l'effet hydrophobe dû aux variations de l'entropie du solvant aux interfaces solvant – soluté [92].

Chapitre 4: Materiels et methodes

Dans cette étude, nous avons utilisé le programme AutoDock 4.2.3 dans sa version la plus récente. Il est installé sous environnement linux : Ubuntu 10.10 dans un ordinateur puissant ayant une mémoire vive de 4 Go et un processeur 2.13 GHZ Intel core 2 duo. AutoDock est un ensemble de trois sous-programmes destinés pour prédire la conformation la plus favorable d'un ligand au sein de son récepteur. Le contrôle des paramètres définissant les propriétés du ligand est réalisé avec le sous-programme AutoTors. Le sous-programme AutoGrid effectue, de son côté, le calcul des différentes grilles de potentiel. Enfin, le sous-programme AutoDock réalise les calculs d'amarrage moléculaire proprement dits. Nous avons également utilisé l'interface graphique "ADT" (AutoDock Tools) version 1.5.4 pour visualiser la localisation précise de l'espace à l'intérieur duquel vont se faire les calculs [81].

La procédure de simulation par le programme AutoDock 4.2.3 se décompose en 5 étapes :

1. Préparation du récepteur

Le fichier du récepteur utilisé par AutoDock doit être sous format *mol2* ou *pdb*. En consultant la banque PDB, il est possible de télécharger le fichier du récepteur, l'enzyme DPP4 dans notre cas, dans le format *pdb*. Parmi les nombreux complexes proposés par la PDB, nous avons choisi le code **2RGU**, car il s'agit d'une structure correctement définie avec une résolution de 2.60 Å [95].

Avant son utilisation par AutoDock, le complexe 2RGU est séparé de son ligand afin d'obtenir un récepteur avec un site actif libre. Le récepteur est ensuite préparé en définissant les charges partielles de ses atomes par l'intermédiaire du sous-programme AutoTors qui attribue des charges de type "Kollman" calculées avec le champ de forces empirique Amber [96]. Il est aussi nécessaire de rajouter à ce récepteur les hydrogènes dits polaires c'est à dire « essentiels ». Le fichier de la protéine ainsi préparée est converti par AutoDock au format *pdbq* qui correspond aux données des charges. Enfin, on intègre dans ce fichier les paramètres de solvation des atomes avant de l'enregistrer dans le format *pdbqt* (format propre à AutoDock).

2. Préparation des ligands

Les ligands utilisés dans ce travail sont dessinés avec le logiciel Titan, en tenant compte de l'état d'hybridation de chaque atome et du type de liaison simple, double ou triple. Une étape d'optimisation de la géométrie devient alors nécessaire. Pour cela, nous avons appliqué la méthode semi-empirique Austin Model 1 (AM1) [97]. Les molécules ainsi obtenues sont enregistrées au format *pdb* ou *mol2*.

La phase finale de préparation du ligand est réalisée par le sous-programme AutoTors4. Ce dernier a pour rôle de contrôler les mouvements du ligand, en définissant les atomes aromatiques, les liaisons flexibles et les angles de torsion. La molécule finale est enregistrée dans le format *pdbqt* avant son utilisation par AutoDock 4.2.3.

3. Calcul des grilles de potentiel

Pour augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, le récepteur DPP4 (2RGU) est plongé dans une grille tridimensionnelle englobant largement le site actif de la protéine étudiée et permettant la libre rotation du ligand dans ce site. Le centre de cette boîte est déterminé par les coordonnées $X = 51.301$, $Y = 49.151$ et $Z = 36.186$ avec les dimensions $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}^3$ (voir figure N°17). L'espacement ou la maille de la grille est fixé par défaut à 0.375 \AA (correspondant au quart de la longueur d'une simple liaison C-C). La boîte est alors centrée sur le ligand et ses dimensions sont proportionnelles à la taille de tous les ligands étudiés. L'ensemble de ces instructions sont sauvegardées dans un fichier texte de paramétrage avec l'extension *gpf* (Grid Parameters File) (Annexe N°2).

L'étape suivante du programme AutoDock 4.2.3 consiste à exécuter les instructions contenues dans le fichier *gpf* grâce au sous-programme AutoGrid4. Il s'agit de calculer l'affinité entre les différents types d'atomes de la protéine (C, H, O, N et S) et le ligand. Les résultats sont générés dans un fichier texte avec l'extension *glg*.

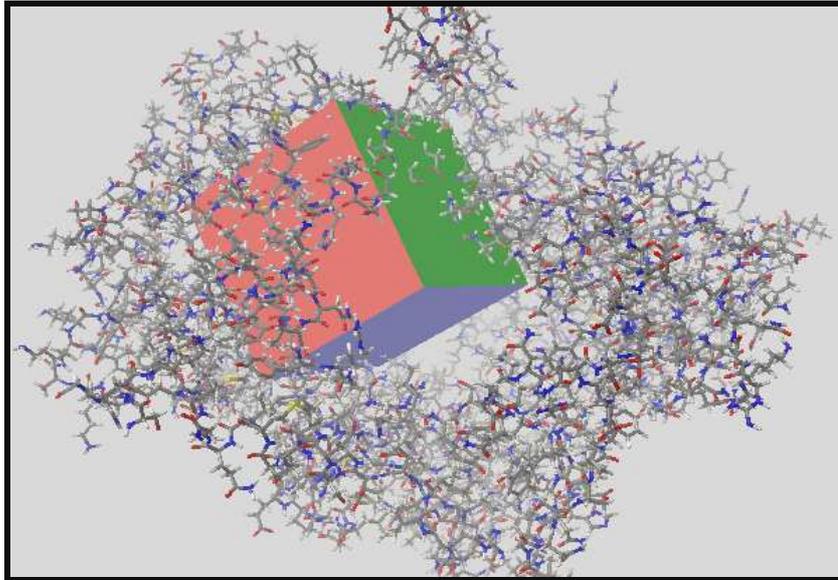


Figure N°17: Position de la boîte d’amarrage dans le site actif de la DPP4.

4. La recherche des solutions d’amarrage

Le mode de fonctionnement d’Autodock4 consiste à faire varier les différentes positions du ligand (axes de translation, de rotation et angles dièdres) à l’intérieur de la boîte. Il utilise les grilles de potentiels pour calculer l’énergie d’interaction entre le ligand en une position donnée et la macromolécule. Cette méthode permet de calculer très rapidement l’énergie d’interaction ligand - récepteur car les potentiels sont pré-calculés, bien entendu, par le sous programme AutoGrid4.

L’étape de docking moléculaire est réalisée grâce au sous-programme AutoDock4. Il recherche les solutions d’amarrage en fonction des paramètres suivants qu’il retrouve dans le fichier *dpf* (Dock Parameters File) : (voir annexe N°3).

- les noms des fichiers contenant le ligand et les grilles de potentiels à utiliser.
- l’état initial du ligand (position, orientation et conformation aléatoire ou précisée).
- La méthode de recherche à utiliser avec les paramètres associés.

Dans notre étude, nous avons utilisé l’AGL avec les paramètres suivants :

- La taille de la population (150).
- Le nombre maximum d’évaluations d’énergie (2500000).
- Le nombre maximum de générations (27000).

- Le niveau de sélection élitiste: le nombre des meilleurs individus qui survivent automatiquement à la génération suivante. La valeur standard est 1.
- Le taux de croisement (0.8).
- Le taux de mutation (0.02).
- Le nombre de cycles à exécuter, c'est-à-dire le nombre de solutions souhaitées (10).

5. Analyse des résultats

Les résultats de docking effectués par le sous-programme AutoDock4 sont générés dans un fichier texte avec l'extension *dlg* (format propre à AutoDock). Ce fichier fournit les coordonnées atomiques des 10 meilleurs positions du ligand dans le site actif de l'enzyme étudié, leur énergie d'interaction ainsi que les K_i correspondants et enfin les différentes valeurs de l'écart quadratique moyen (*Root Mean Square Deviation* ou le RMSD).

Chapitre 5: Résultats et discussions

2. Tests de fiabilité du programme de docking

Pour vérifier si le protocole que nous venons de développer est correct, nous avons jugé utile d'évaluer d'abord la performance du programme AutoDock par trois tests différents :

- Le coefficient de corrélation (r).
- l'écart quadratique moyen ou le RMSD (root mean square deviation).
- L'analyse visuelle.

1.1 Le coefficient de corrélation (r)

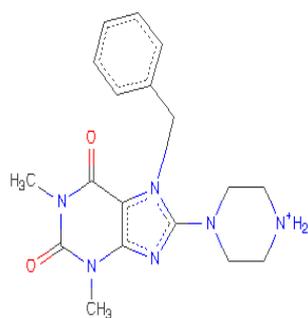
Ce test consiste à évaluer le degré de corrélation qui existe entre les énergies d'interaction de 31 inhibiteurs simulés par docking moléculaire avec AutoDock et les valeurs de leurs IC₅₀ déterminées expérimentalement dans la littérature par des essais *in vitro*.

Parmi les 31 inhibiteurs de la DPP4 retenus dans cette étude, 21 proviennent de la PDB (de 1 à 21) et 10 sont fournis par la littérature (de 22 à 31) (voir figure N°18). Les résultats des énergies d'interaction des inhibiteurs étudiés ainsi que leur IC₅₀ sont représentés dans le tableau N°2.

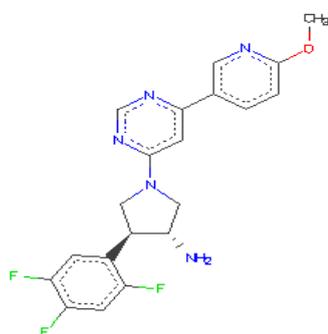
Tableau N°2: Corrélation entre les énergies d'interaction des 31 inhibiteurs de la DPP4 et leur activité biologique (Log IC₅₀).

Composé	Code PDB	IC ₅₀ (nM)	Log IC ₅₀	Score AutoDock (Kcal/mol)
1	2AJ8	2800	3.14	-6.98
2	2QJR	6.4	0.8	-9.55
3	2RGU	1	0	-11.16
4	3G0B	4	0.6	-9.39
5	3G0D	2	0.3	-10.8
6	3HAB	4	0.6	-9.43
7	3KWF	6.4	0.8	-10.21
8	3HAC	8	0.9	-9.05
9	2P8S	2	0.3	-9.42
10	3F8S	12.9	1.11	-10.09
11	2ONC	13	1.11	-8.69
12	1N1M	3000	3.47	-7.82
13	1X70	18	1.25	-8.6
14	2BUC	23	1.36	-9.21
15	2FJP	4.3	0.63	-9.71
16	2IIV	6.6	0.81	-9.39
17	2OLE	70	1.84	-8.43
18	2QOE	25	1.39	-8.79
19	2QTB	4.8	0.68	-9.69

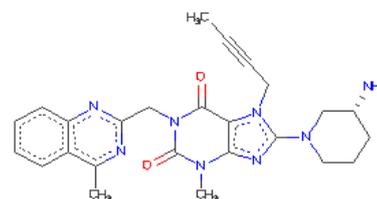
20	3C43	19	1.27	-9.01
21	3D4L	32	1.5	-9.9
22	-----	100	2	-7.41
23	-----	340	2.53	-7.87
24	-----	350	2.54	-7.11
25	-----	1400	3.14	-8.2
26	-----	2500	3.39	-7.28
27	-----	500	2.69	-7.81
28	-----	230	2.36	-8.11
29	-----	7.2	0.85	-9.16
30	-----	27	1.43	-9.01
31	-----	21	1.32	-9.31



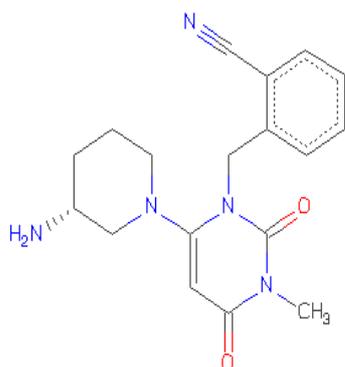
Composé 1



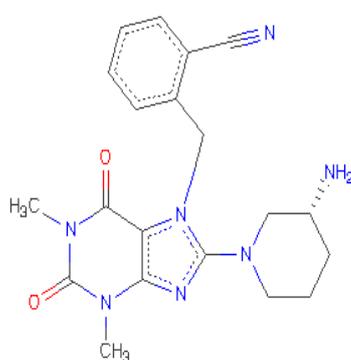
Composé 2



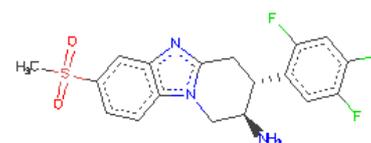
Composé 3



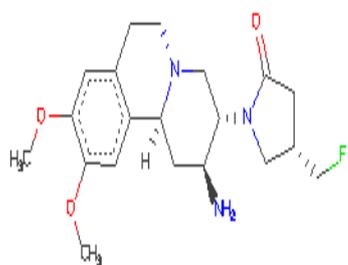
Composé 4



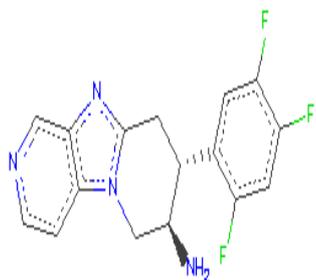
Composé 5



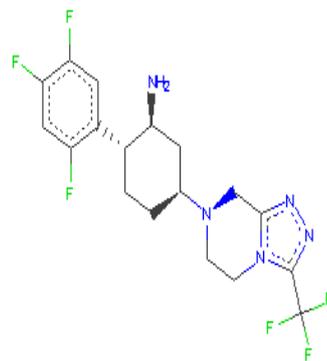
composé 6



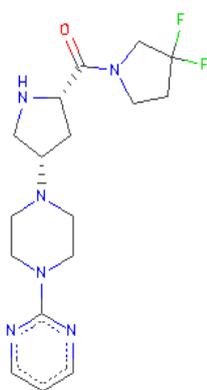
Composé 7



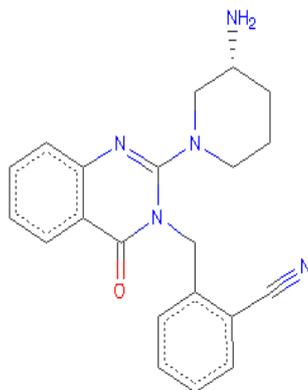
Composé 8



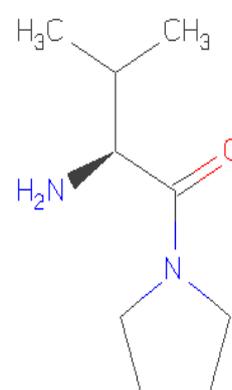
Composé 9



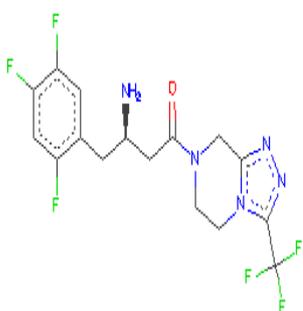
Composé 10



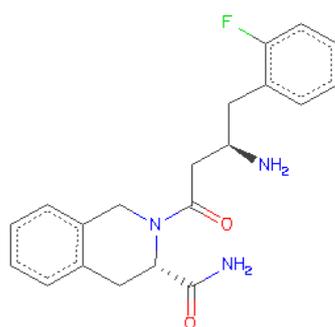
Composé 11



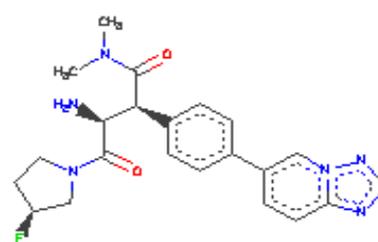
Composé 12



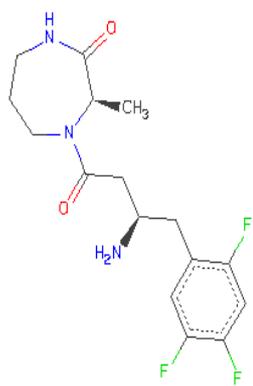
Composé 13



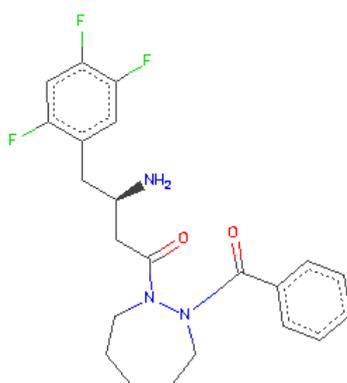
Composé 14



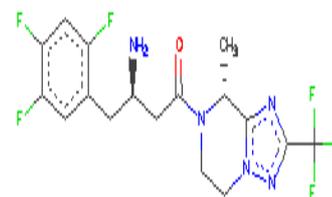
Composé 15



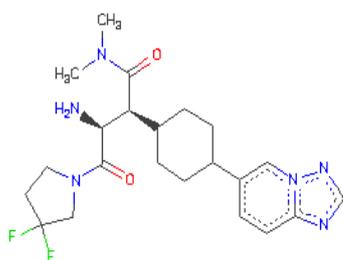
Composé 16



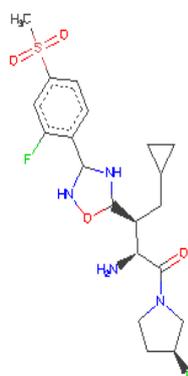
Composé 17



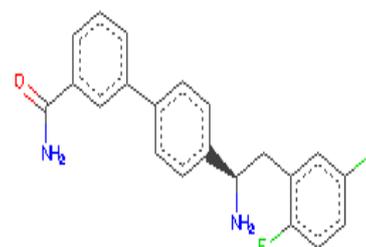
Composé 18



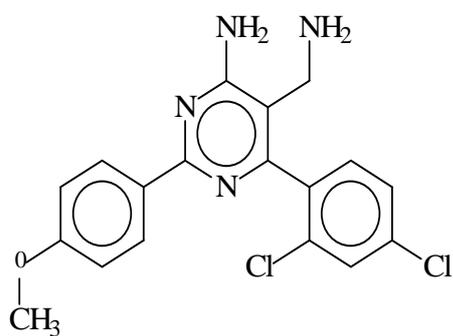
Composé 19



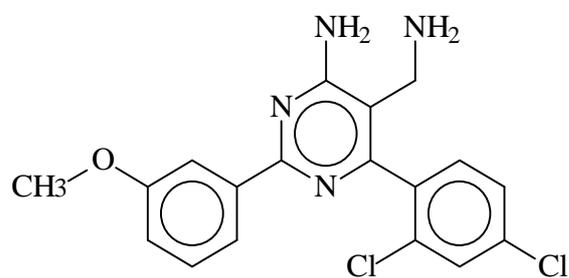
Composé 20



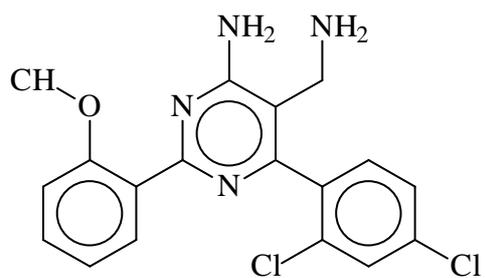
Composé 21



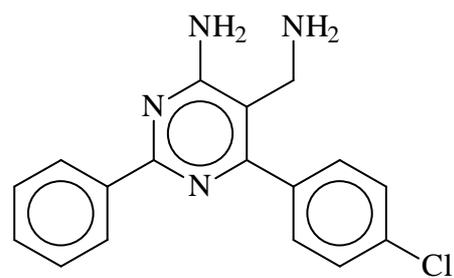
Composé 22



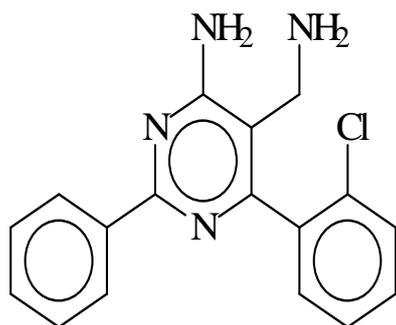
Composé 23



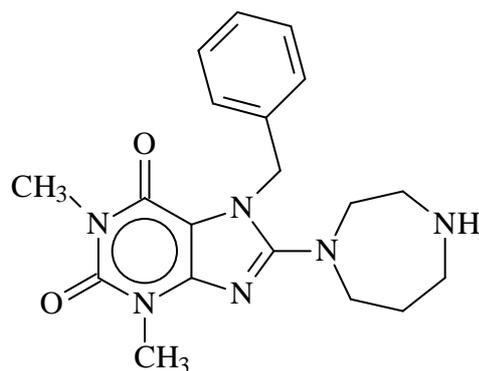
Composé 24



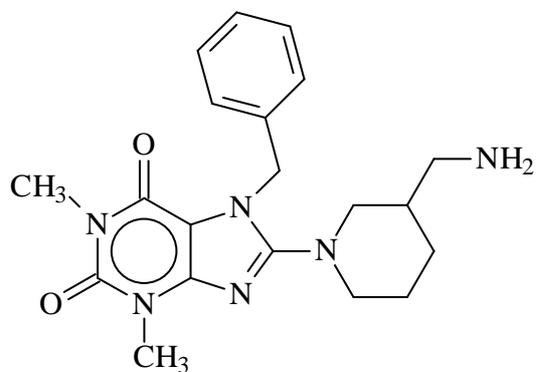
Composé 25



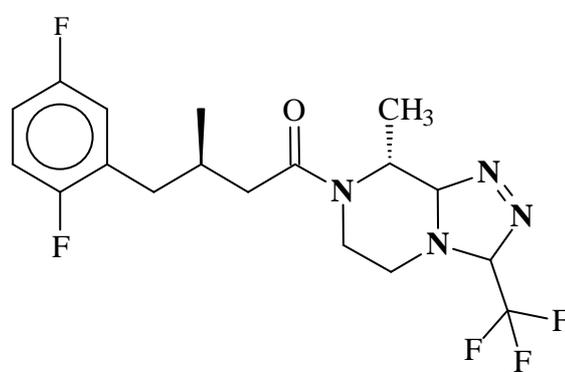
Composé 26



Composé 27



Composé 28



Composé 29

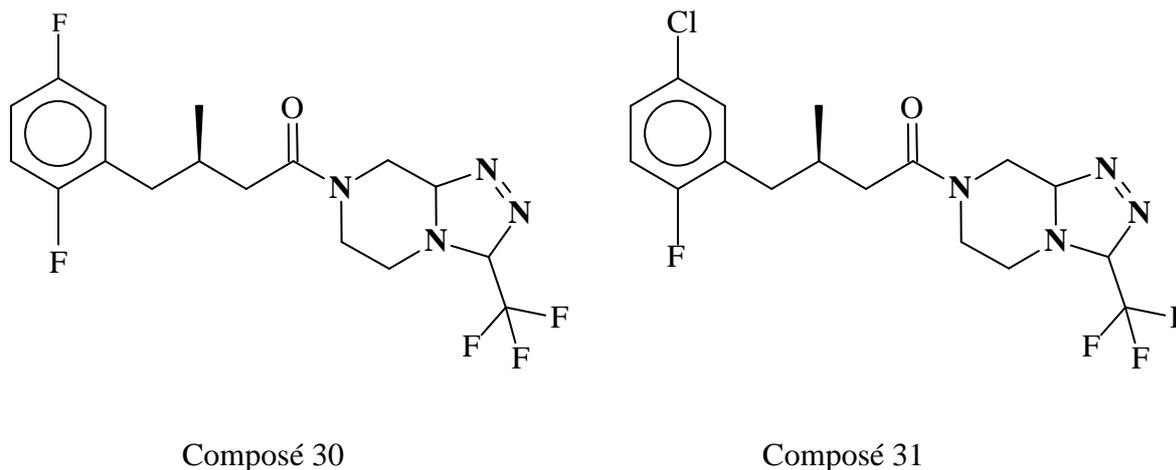


Figure N°18: Structures des inhibiteurs de la DPP4 utilisés dans l'étude de la régression linéaire [6, 95, 98-114].

L'analyse par régression linéaire réalisée entre les énergies d'interaction et les IC_{50} ($\text{Log } IC_{50}$) donne un nuage de points (voir figure N°19) avec un coefficient de corrélation égal à **0.86**. Une telle valeur indique que les 2 variables sont fortement corrélées et témoigne ainsi de la haute performance du programme AutoDock [115,116].

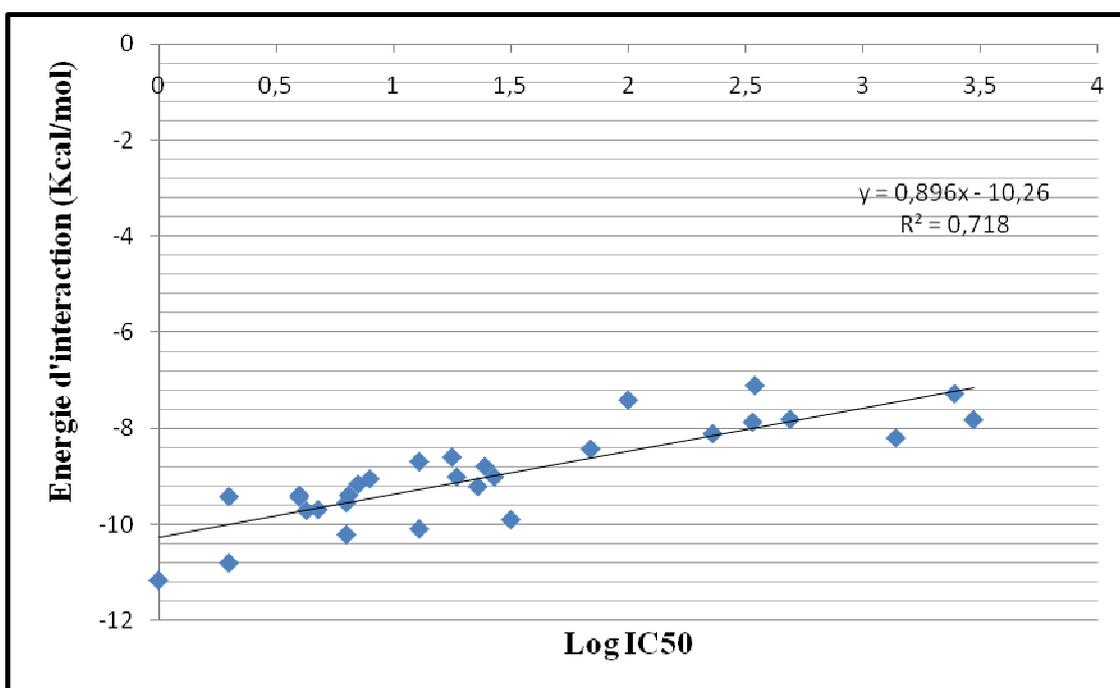


Figure N° 19: Corrélation entre l'activité biologique ($\text{Log } IC_{50}$) de 31 ligands et leur énergie d'interaction avec la DPP4.

1.2 Le RMSD

Souvent, les performances d'un programme de docking moléculaire sont évaluées en termes de capacité à reproduire le mieux possible des complexes expérimentaux. Autrement dit, il faut que l'évaluation quantitative de la déformation spatiale entre la pose du ligand calculée par AutoDock et la conformation dans le complexe expérimental soit la plus petite possible. Pour cela, on utilise une grandeur scalaire : l'écart quadratique moyen ou RMSD qui représente la moyenne des différences de positions des atomes appartenant à 2 conformations différentes.

Le test RMSD a été réalisé sur sept complexes de la DPP4 disponibles dans la PDB [6, 95, 99, 104]. Il s'agit plus précisément, de complexes formés entre l'enzyme DPP4 et différents inhibiteurs de la famille des xanthines qui nous intéresse ici. Les codes PDB des complexes et de leurs inhibiteurs ainsi que les valeurs de leurs RMSD obtenus avec AutoDock sont mentionnés dans le tableau N°3.

Tableau N°3: Valeurs de RMSD des sept complexes DPP4-xanthines étudiés.

Code PDB	Code des ligands	RMSD (Å)
2RGU	356	0.51
2I3Z	LIR	0.44
3G0B	T22	0.53
3G0C	RUF	0.73
3G0D	XIH	0.67
3G0G	RUM	0.70
2ONC	SY1	0.68

Le tableau montre que les différentes valeurs du RMSD sont conformes aux résultats de Chikhi et Bensegueni (2008), et Gabb J et *al* (1997) [117, 118] qui démontrent que tout programme de docking n'est performant que lorsque le RMSD est inférieur ou égale à 2 Å.

2.3 L'analyse visuelle

L'analyse visuelle faisant suite au test RMSD est aussi une étape essentielle pour juger la performance du programme AutoDock. La visualisation des résultats du docking moléculaire réalisée avec les sept inhibiteurs du tableau N°3 montre que les modèles des ligands simulés par AutoDock sont correctement placés dans le site actif de la DPP4. Ils présentent des conformations spatiales parfaitement superposables à celles déterminées expérimentalement par cristallographie qu'on retrouve dans la PDB (voir figures N° 20-26).

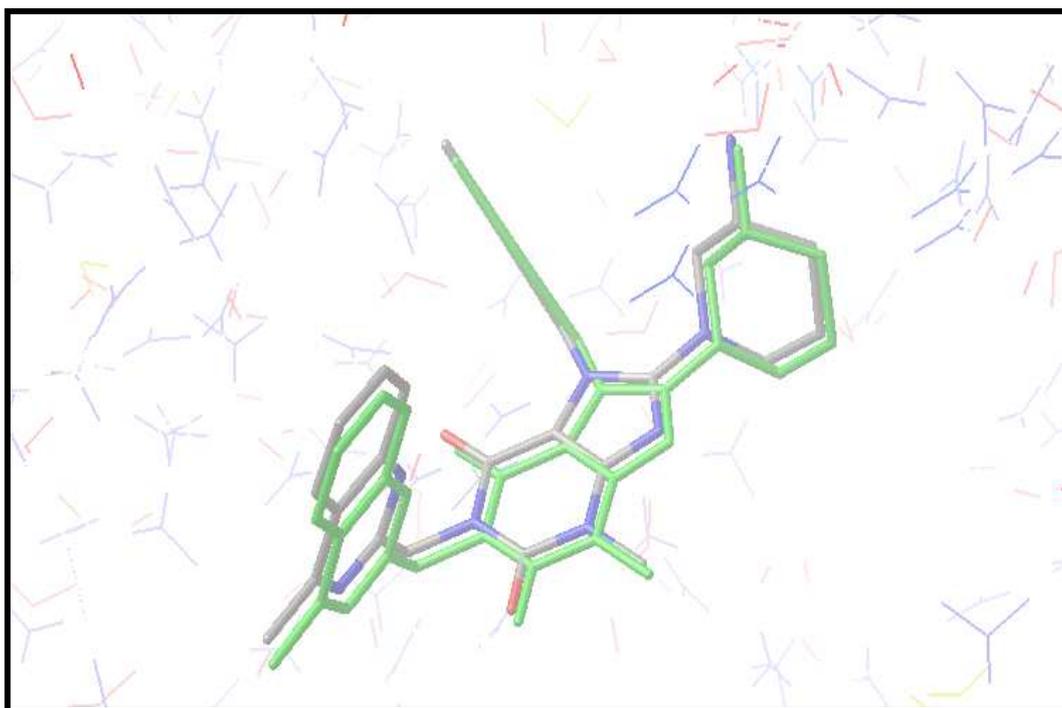


Figure N° 20: Ancre du ligand 356 dans le site actif de la DPP4 : Comparaison des conformations obtenues par cristallographie (coloré par type d'atomes) et par docking avec AutoDock (coloré en vert).

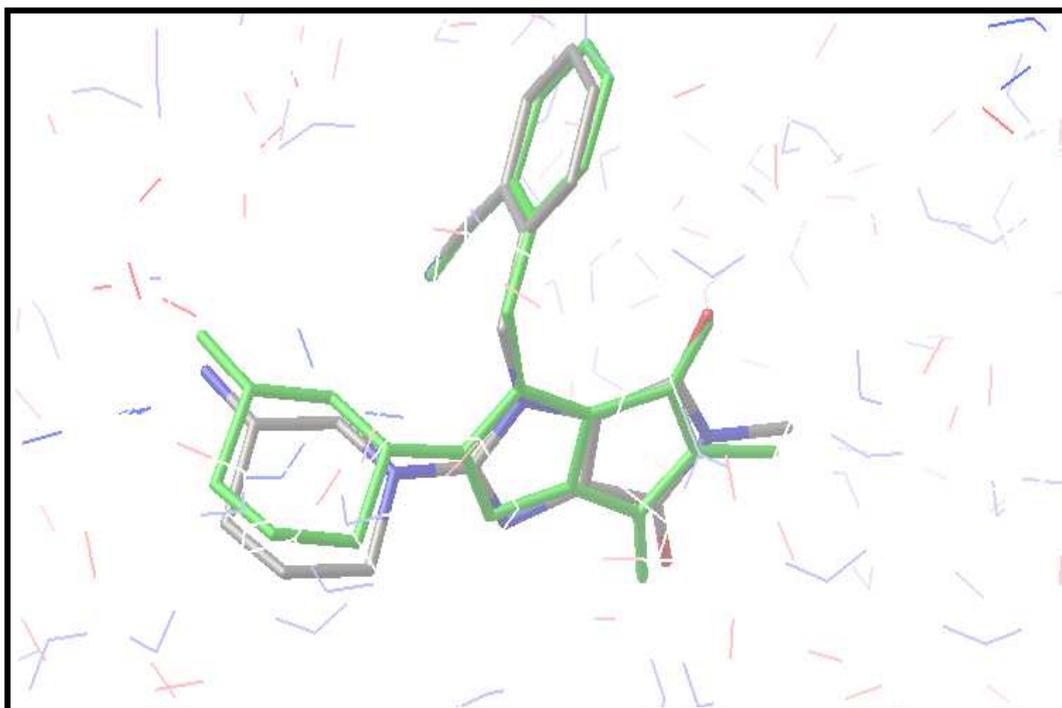


Figure N°21: Superposition des géométries de l'inhibiteur LIR donnée par rayons X (coloré par type d'atomes) et par docking avec AutoDock (coloré en vert).

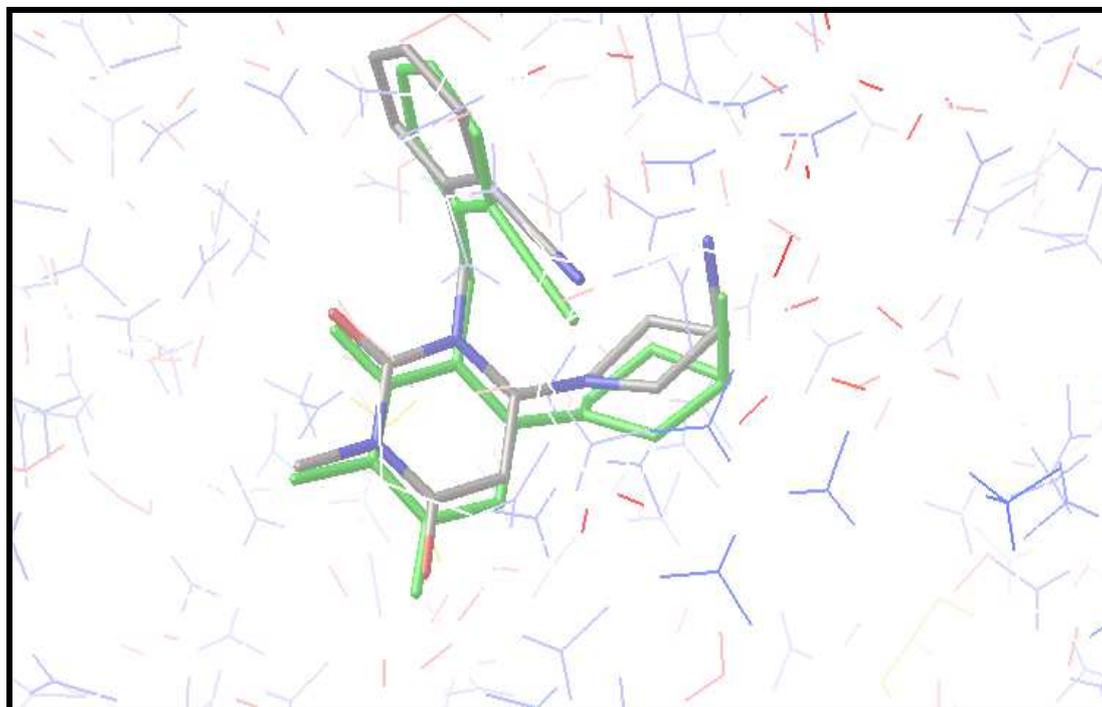


Figure N°22: Comparaison entre la conformation du ligand T22 issue de la diffraction par rayons X (colorées par type d'atomes) et celle conçue par AutoDock.

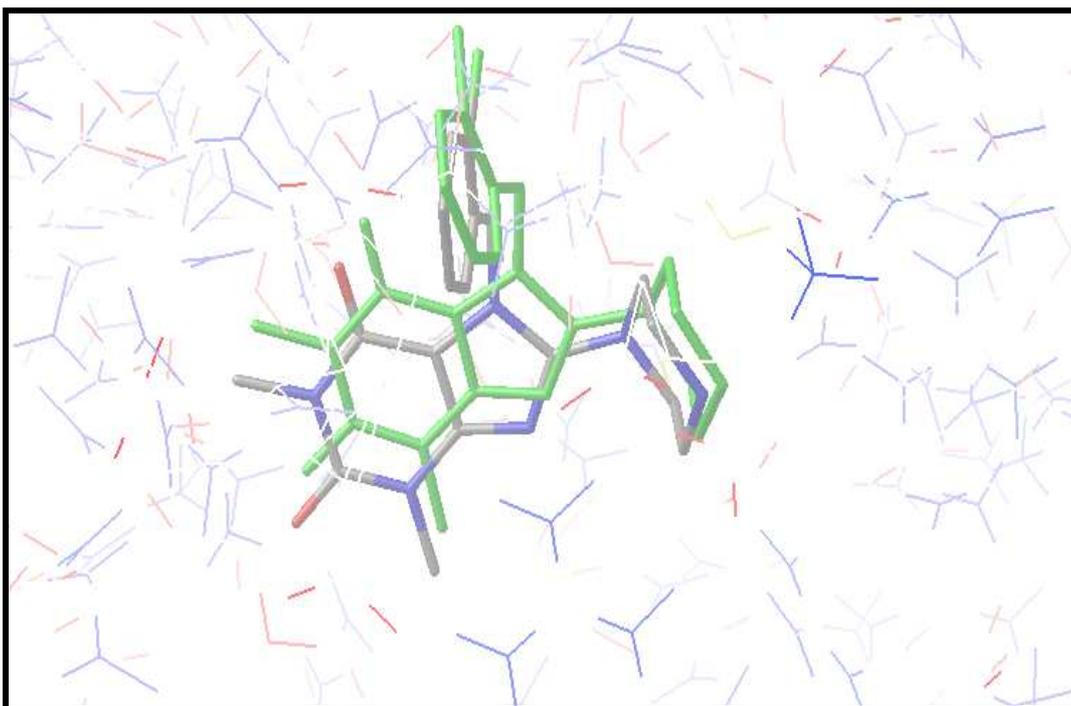


Figure N°23: Superposition spatiale entre la pose du ligand RUF calculée par AutoDock (coloré en vert) et la conformation dans le complexe expérimentale 3G0C (coloré par type d'atome).

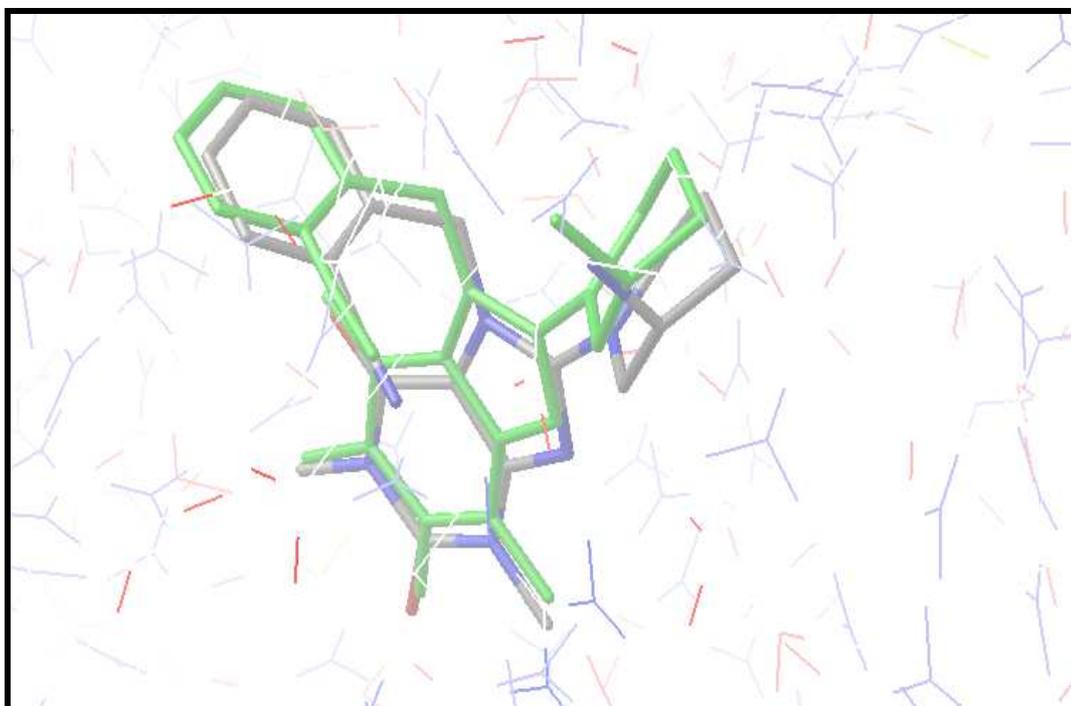


Figure N°24: Superposition du modèle du ligand XIH simulé par AutoDock (coloré en vert) vis-à-vis de la conformation déterminée expérimentalement (coloré par type d'atome).

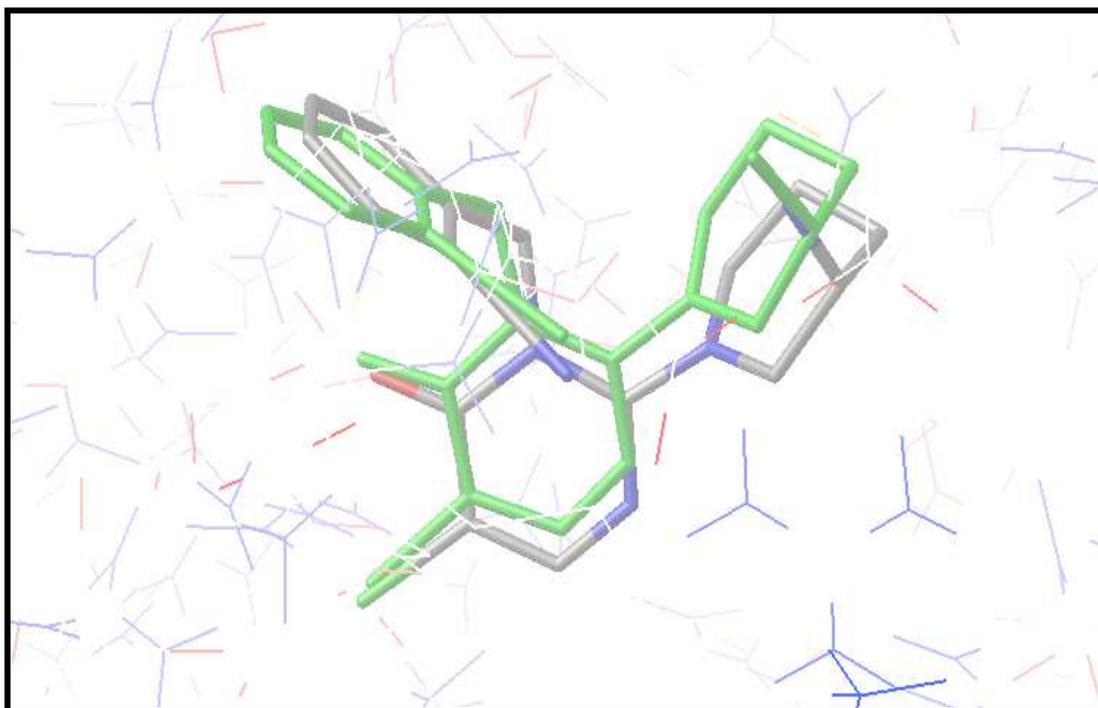


Figure N°25: Alignement des conformations expérimentale (colorées par type d'atome) et calculée par AutoDock (colorée en vert) de l'inhibiteur RUM.

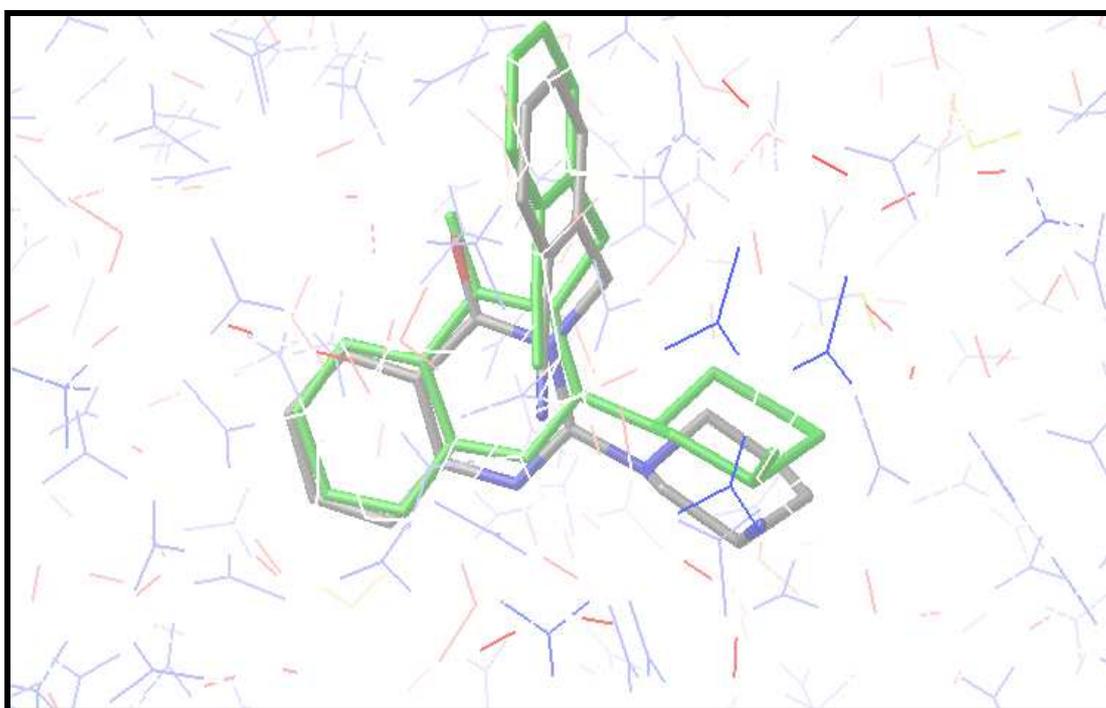


Figure N°26: Comparaison de la conformation expérimentale de l'inhibiteur SY1 (colorée par type d'atome) et sa conformation optimale simulée par AutoDock (colorée en vert).

1.4 Conclusion

A la lumière des résultats obtenus avec le coefficient de corrélation linéaire, le RMSD et l'analyse visuelle, nous pouvons conclure que le programme AutoDock est hautement performant qu'on peut l'utiliser sans trop risque d'erreurs, pour générer par simulation *in silico*, d'autres inhibiteurs dérivés des xanthines présentant une meilleure activité inhibitrice vis-à-vis de la DPP4.

2. Etude des interactions Xanthines-DPP4

Les xanthines constituent la plus récente classe d'inhibiteurs de la DPP4. Ce sont des inhibiteurs compétitifs très puissants dont la synthèse a été réalisée grâce à une bonne connaissance de la structure 3D de la DPP4. Il s'agit de composés hétérocycliques dont la structure de base est représentée dans la figure N°27 [6].

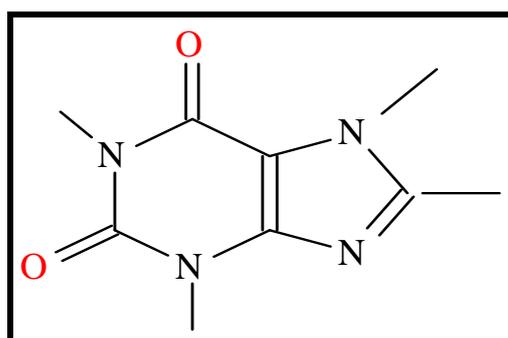


Figure N°27: Structure de base du noyau xanthine.

Dans le but de contribuer au développement de nouveaux inhibiteurs dérivés des xanthines, il nous a semblé judicieux d'étudier, en premier lieu, le mécanisme d'inhibition mis en place par les inhibiteurs xanthiniques qu'on retrouve sous forme de complexes avec la DPP4 au niveau de la PDB. Il s'agit des mêmes complexes utilisés précédemment dans les tests de performance par RMSD et l'analyse visuelle. Rappelons que ces complexes, au nombre de sept, portent les codes suivants : 2RGU, 2I3Z, 3G0B, 3G0C, 3G0D, 3G0G et 2ONC (voir figure N° 28) [6, 95, 99, 104].

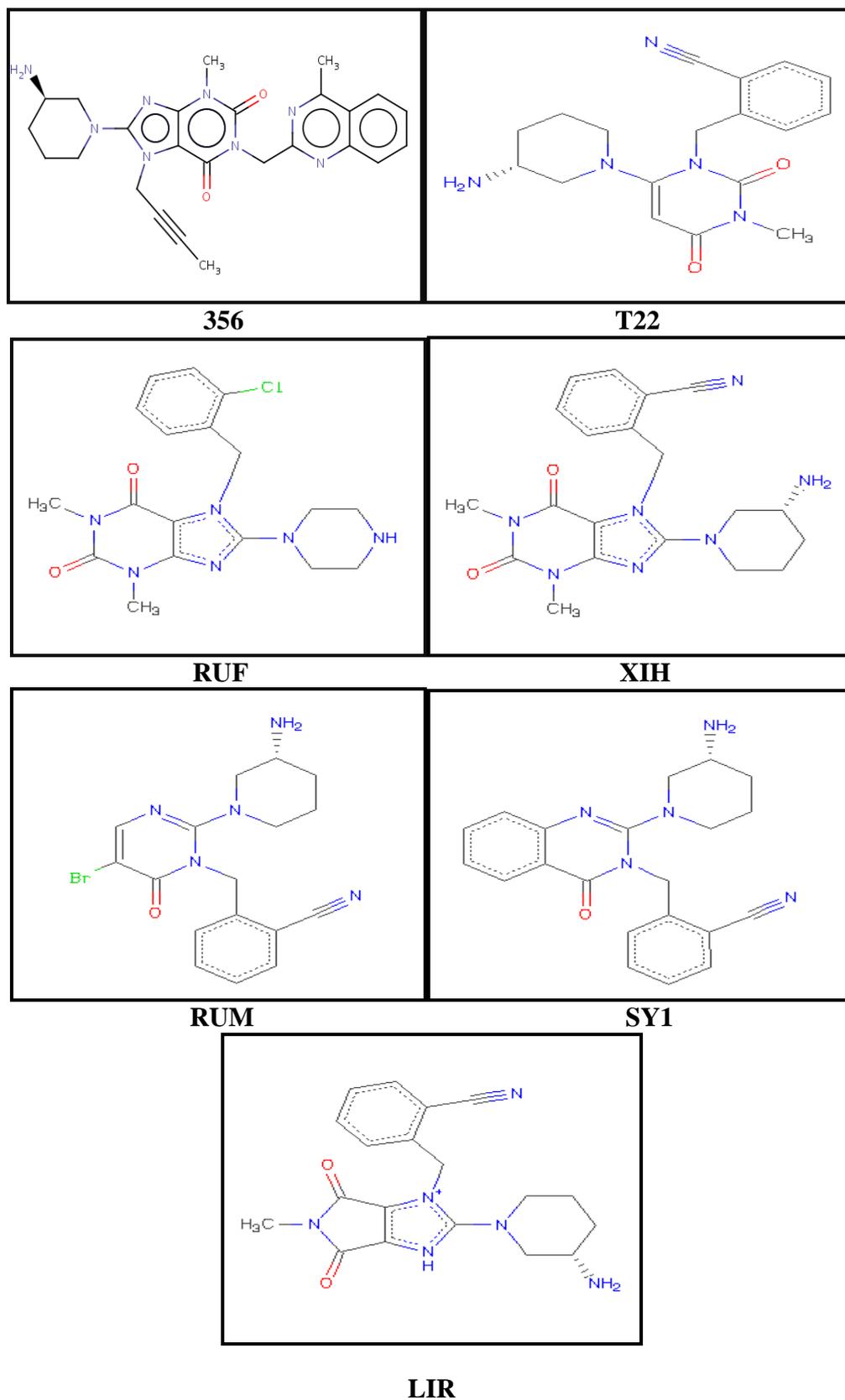


Figure N°28 : Structure des inhibiteurs xanthiniques étudiés.

A l'aide du programme AutoDock [81], nous avons pu simuler la formation de ces complexes et évaluer leurs énergies d'interaction. L'interface graphique AutoDock Tools 1.5.4 (ADT) nous a aidé à visualiser le nombre et le type de liaisons mises en jeu lors de ces interactions.

2.1 Complexe 2I3Z

La modélisation de l'énergie d'interaction entre le composé LIR et le site actif de la DPP4 donne lieu à un score de l'ordre de -9.26 Kcal/Mol. La détermination théorique de l'IC₅₀ (13.06 nM) et du Ki (162.76 nM) nous indique que l'activité inhibitrice de ce composé est relativement faible. Comme le montre la figure N°29, ce composé est bien placé dans la cavité hydrophobique où il est entouré par les résidus Tyr547, Trp629, Tyr631, Val656, Tyr662 et Val711. De plus, ce composé forme une liaison hydrogène distante de 1.787 Å entre la fonction carbonyle de son noyau xanthine et la fonction amine du résidu Ser630 (XIH-C=O....HN-Ser630).

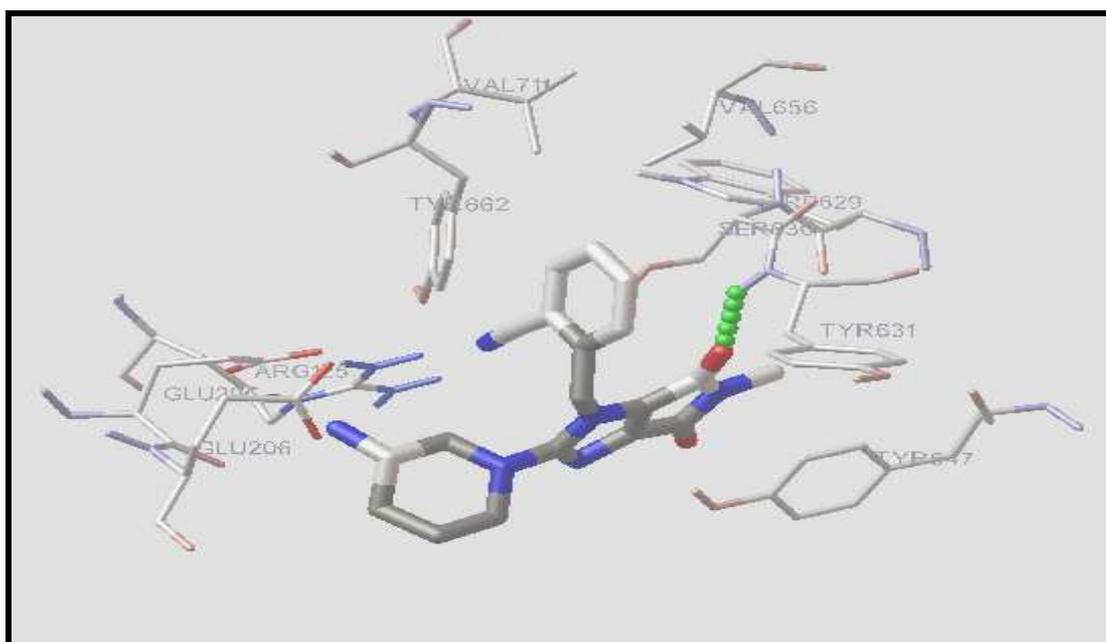


Figure N°29: Interactions entre l'inhibiteur LIR et le site actif de la DPP4.

2.2 Le complexe 3G0B

Le composé T22, appelé aussi alogliptine, est un inhibiteur puissant en cours de développement clinique (phase 3) [6]. Avec très peu de données publiées dans ce contexte, il

nous a semblé intéressant de déterminer théoriquement, certains paramètres décrivant son activité inhibitrice, le K_i et l'énergie d'interaction notamment.

La simulation réalisée par AutoDock nous a permis d'évaluer l'énergie d'interaction entre l'inhibiteur T22 et la DPP4. Cette énergie s'évalue à -9.39 Kcal/Mole est significativement corrélée à l'activité inhibitrice de T22 dont l' IC_{50} est égale à $4nM$. L'analyse visuelle (voir figure N°30) montre que la fonction amine du noyau pipéridine du composé T22 forme deux liaisons hydrogène avec les fonctions carboxyles des chaînes latérales des résidus Glu205 (T22-NH...OOC-Glu205 ; $d=1.904$ Å) et Glu206 (T22-NH...OOC-Glu206 ; $d=2.068$ Å). Ce complexe est également stabilisé par des interactions hydrophobiques entre le T22 et les résidus Tyr631, Val656, Tyr662, Tyr666, Asn710 et Val711.

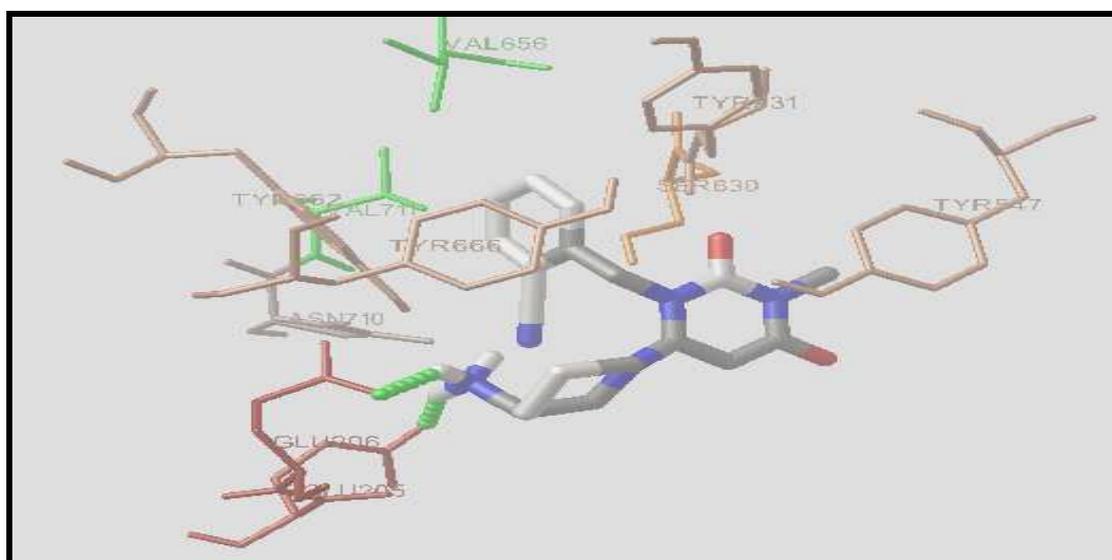


Figure N°30: Interactions de l'inhibiteur T22 avec le site actif de la DPP4.

2.3 Complexe 3G0C

Le composé RUF est l'un des inhibiteurs de la DPP4 très récemment mis au point [99]. À l'heure actuelle, aucune référence bibliographique ne fait état sur son mode d'interaction avec la DPP4, ni de son IC_{50} . Le programme AutoDock nous a permis de prédire son énergie d'interaction avec la DPP4 qui s'évalue à -9.54 Kcal/Mole. Cette énergie se caractérise par la présence d'une liaison hydrogène entre l'atome d'azote du noyau pipérazine du composé RUF et la fonction carboxyle du résidu Glu206 situé dans la poche S2 de la DPP4 ($d=2.638$ Å) (voir figure N°31). Le composé RUF établit également des interactions hydrophobiques avec les résidus Tyr547, 631, 662, 666, Val711, Ser630, Asn710 et His740. Il est important de souligner que ces 3 derniers résidus constituent la triade catalytique de la DPP4.

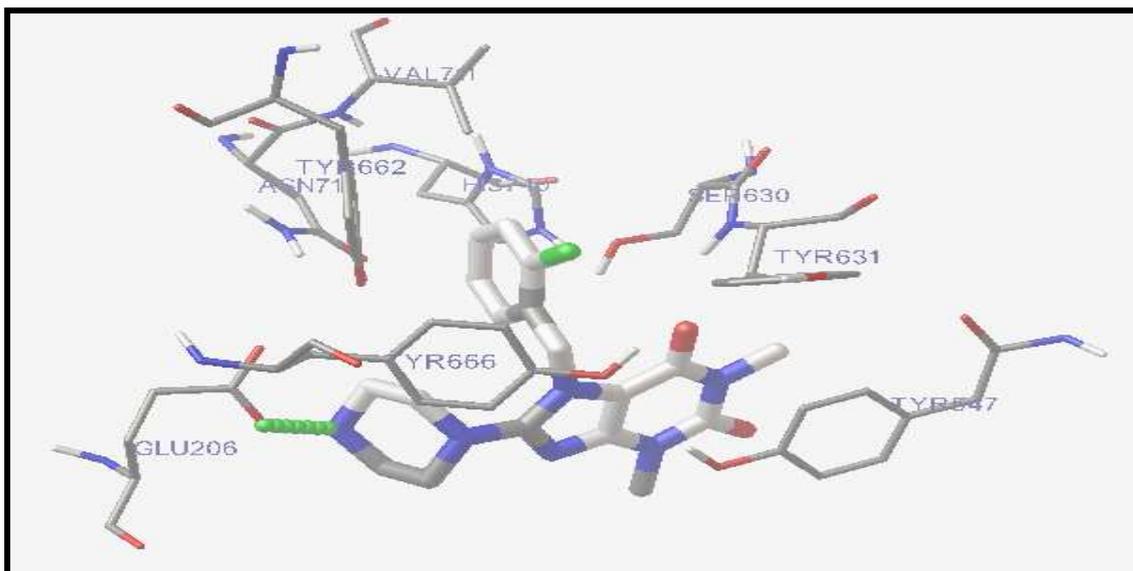


Figure N°31: Représentation des interactions RUF- DPP4.

A cette énergie d'interaction correspond une constante d'inhibition théorique (K_i) de l'ordre de 101 nM. Quant à la valeur de l' IC_{50} , celle-ci est déterminée théoriquement à partir de la courbe de régression linéaire représentée dans la figure N°32. Par simple projection de la valeur de l'énergie d'interaction obtenue plus haut. Sur cette droite, nous obtenons, par correspondance, une valeur théorique de l' IC_{50} de l'ordre de 6.4 nM.

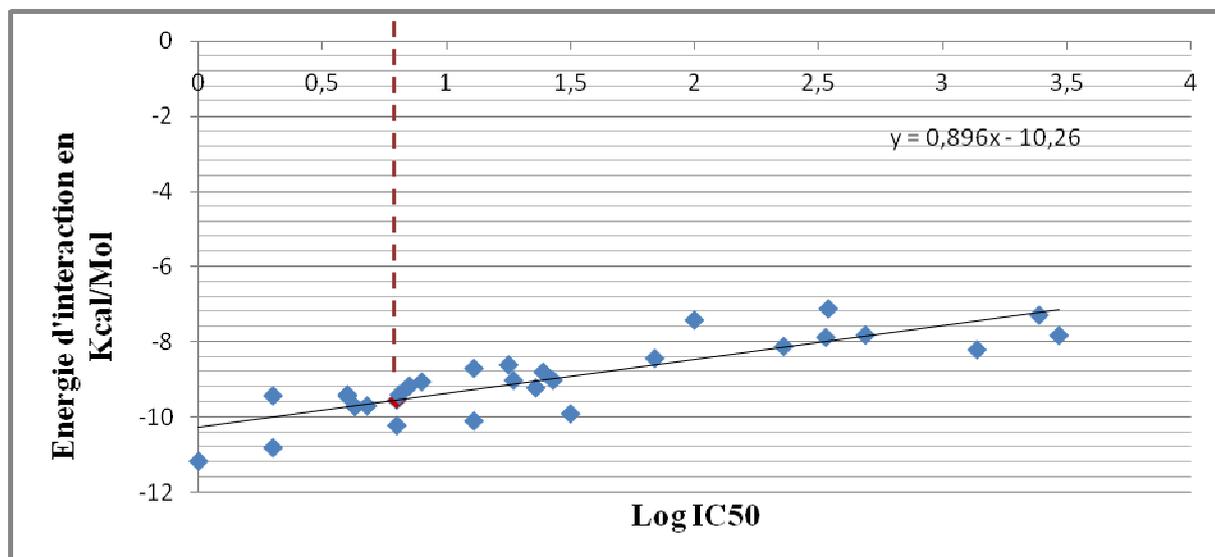


Figure N°32: Régression linéaire entre IC_{50} et les valeurs du docking : le complexe 3G0C est présenté en rouge.

2.4 Le complexe 3G0D

Avec de très faibles valeurs de l' IC_{50} (2nM) et du K_i (2nM), le composé XIH présente un meilleur effet inhibiteur que les composés LIR, T22 et RUF [99]. Le docking du composé XIH dans le site actif de la DPP4 donne l'une des meilleures énergies d'interaction obtenue jusque là soit -10.80 Kcal/Mole. Le complexe formé est stabilisé par deux liaisons hydrogène. La première est formée entre la fonction amine du noyau pipéridine de l'inhibiteur XIH et la fonction carboxyle du résidu Glu206 (XIH-NH.....OOC-Glu206), séparées par une distance de 2.037 Å. La deuxième existe entre l'un des oxygènes du noyau xanthine et la fonction amine du résidu Ser630, séparés par une distance de 2.039 Å (XIH=O....HN-Ser630). Enfin, le noyau benzonitrile du composé XIH est stabilisé au sein de la poche S1 de la DPP4 par des interactions hydrophobiques par les résidus Trp629, Ser630, Tyr631, Val658, Tyr662, Asn710 et Val711 (voir figure N°33).

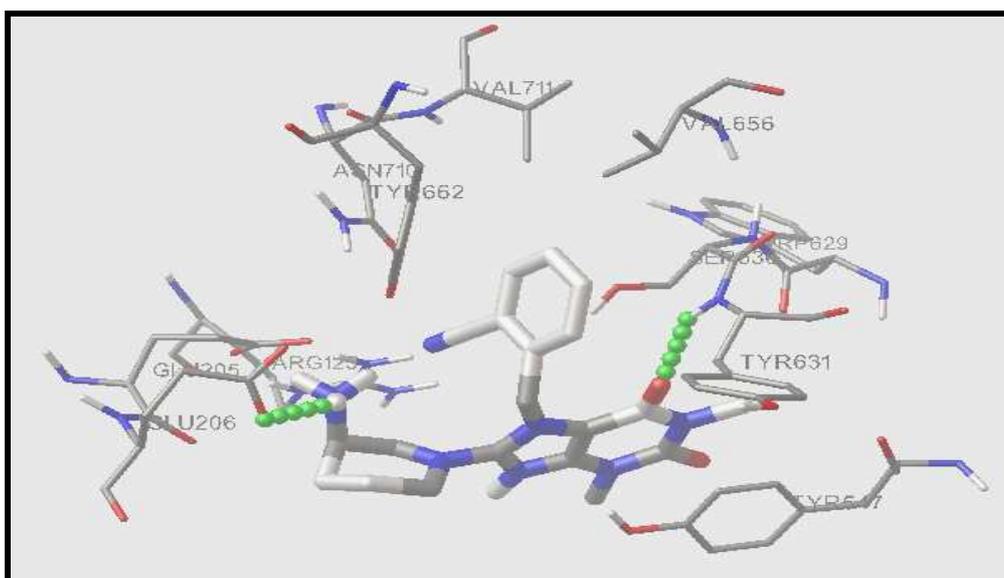


Figure N°33: Interactions du composé XIH avec le site actif de la DPP4.

2.5 Le complexe 3G0G

Le composé RUM est le dernier inhibiteur mis au point dans la classe des xanthines [99]. Comme pour le composé RUF (complexe 3G0C), la littérature ne donne aucun résultat sur son mode d'action avec la DPP4, ni sur son IC_{50} , ni encore sur sa constance d'inhibition K_i . Grâce à AutoDock, ces trois aspects ont été déterminés de la même manière que précédemment.

La modélisation de l'interaction RUM-DPP4 simulé par docking moléculaire avec AutoDock nous a permis d'obtenir l'un des complexes les plus stables avec une énergie d'interaction égale à -9.87 Kcal/Mole. Cette énergie résulte de la mise en place d'une liaison hydrogène entre la fonction amine du noyau pipéridine de RUM et la fonction carboxyle du résidu Glu205 ($d=2.886 \text{ \AA}$) d'une part et de nombreuses interactions hydrophobiques avec les résidus Tyr547, Ser630, Tyr631, Val656, Tyr662, Tyr666, Asn710 et Val711, d'autre part (voir figure N°34).

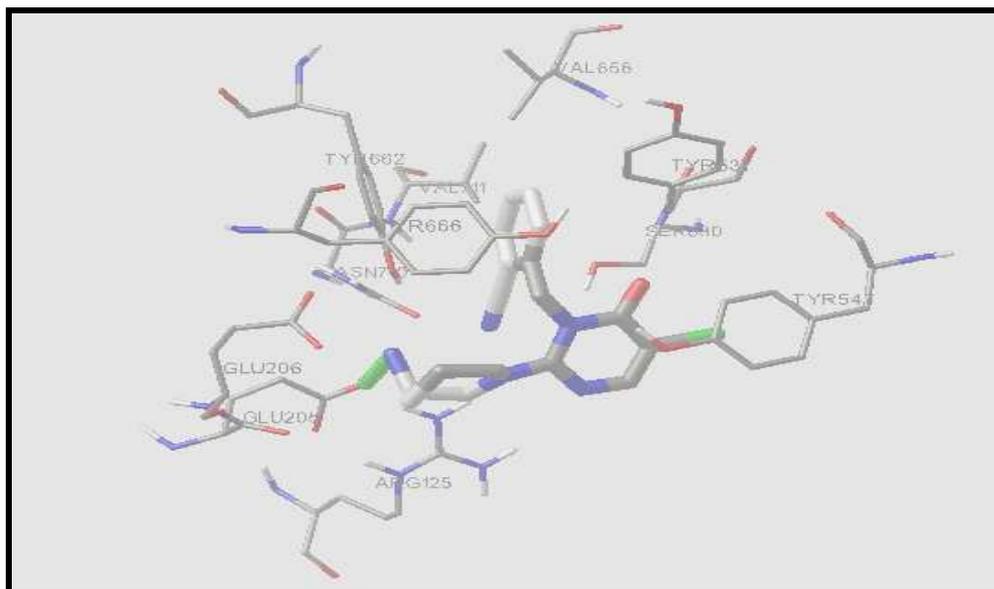


Figure N°34: Représentation des interactions entre le composé RUM et le site actif de la DPP4.

Les valeurs théoriques de l' IC_{50} et du K_i correspondent respectivement à 2.72 nM et 57.94 nM. De tels résultats sont significatifs d'un composé biologiquement très actif pouvant inhiber très fortement la DPP4.

2.6 Le complexe 2ONC

Le composé SY1 est l'un des premiers inhibiteurs de la DPP4 de type xanthine mis au point [104]. Comme le montre le tableau N°2, le composé SY1 se caractérise par la plus faible activité biologique ($IC_{50} = 13\text{nM}$). Le programme AutoDock confirme parfaitement ce résultat en fournissant une énergie d'interaction égale à -8.69 Kcal/Mole soit la valeur la plus élevée de la classe des xanthines (voir figure N°35).

La visualisation des résultats du docking montre que le composé SY1 forme avec le site actif de la DPP4 plusieurs interactions hydrophobes avec les résidus Val656, Val711, Tyr631, Tyr662, Tyr666, Glu205, Glu206 et Tyr647 (π - π). Le complexe est stabilisé par une liaison hydrogène entre l'oxygène du ligand et la fonction amine du résidu Ser630, séparés par une distance de 2.14 Å (voir figure N°35).

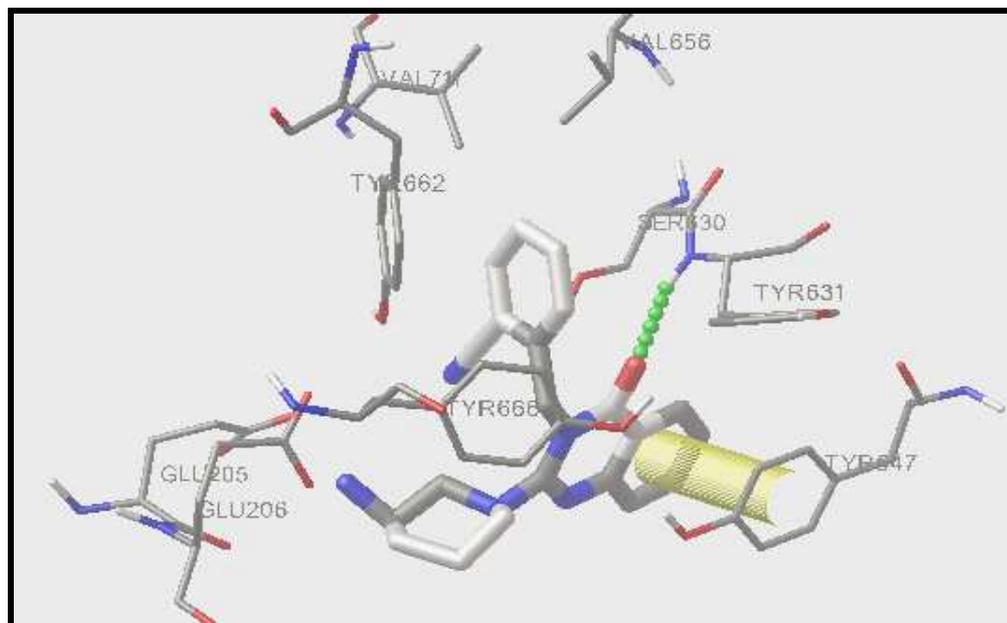


Figure N°35: Représentation des interactions SY1-DPP4.

2.7 Le complexe 2RGU

Le composé 356 ou linagliptine, avec la plus faible valeur de l' IC_{50} (1nM), est considéré comme le meilleur inhibiteur xanthinique de la DPP4 [95]. Une bonne corrélation existe entre cette valeur expérimentale et les résultats du docking moléculaire qui donnent le meilleur score d'énergie soit -11.13 Kcal/Mole. En effet, le complexe linagliptine-DPP4 est considéré comme celui le plus stable obtenu dans ce travail.

En faisant appel au programme AutoDock Tools nous avons pu visualiser les interactions formés entre la linagliptine et le site actif de la DPP4. Le complexe est stabilisé par plusieurs interactions hydrophobiques avec les résidus Trp629 (π - π), His740, Ser630, Val711, Tyr631, Val656, Tyr547, Tyr662 et Tyr666 de la poche S1, et les résidus Glu205, Glu206 et Phe357 de la poche S2 du site actif de la DPP4. Une seule liaison hydrogène apparaît entre l'un des oxygènes du noyau xanthine et la fonction amine du résidu Ser630 (356=O.....HN-Ser630), séparés par une distance de 1.861 Å (voir figure N°36).

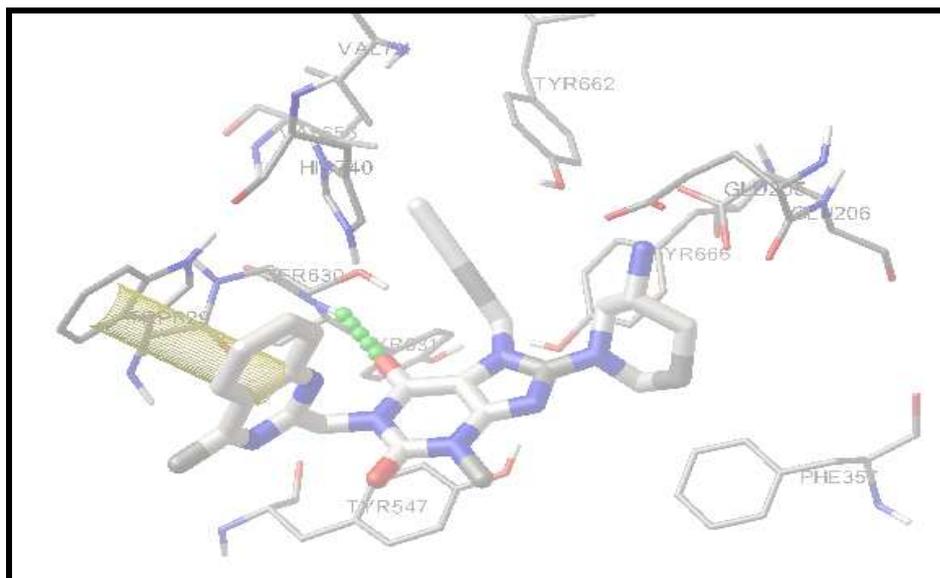


Figure N°36: Représentation des interactions linagliptine-DPP4.

2.8 Conclusion

L'étude par docking moléculaire avec AutoDock nous a permis de vérifier et de compléter les données expérimentales des inhibiteurs xanthiniques de la DPP4 présents dans la PDB. Parmi les sept molécules étudiées, le composé 356 (linagliptine), avec la plus basse valeur de son IC_{50} (1 nM) et d'énergie d'interaction la plus faible (-11.13 Kcal/Mole), se présente comme l'inhibiteur xanthinique le plus puissant de la DPP4 connu jusque là. Une étude *in silico* plus approfondie de ces résultats pourrait conduire à la conception théorique de nouveaux inhibiteurs encore plus affins de la DPP4.

3. proposition de nouveaux inhibiteurs de la DPP4

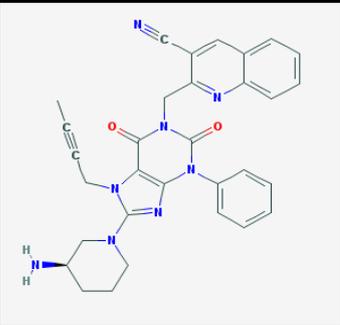
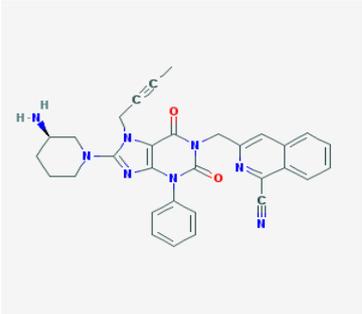
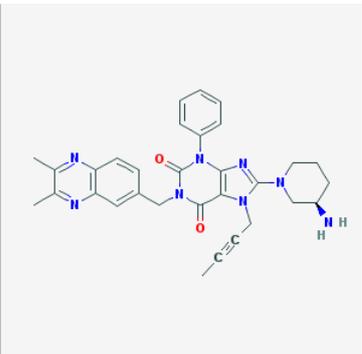
En faisant appel aux approches par criblage virtuel et par modification de la structure de départ du ligand, nous avons pu améliorer l'activité inhibitrice de la linagliptine.

3.1 Criblage virtuel d'une collection de similaires de la linagliptine

Afin d'améliorer l'activité inhibitrice de la linagliptine, nous avons utilisé, dans un premier temps, la méthode du criblage virtuel d'une collection de molécules chimiques. La banque de donnée PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) nous propose 187 similaires de la linagliptine avec un taux de similarité allant jusqu'à 90%. Par docking moléculaire avec AutoDock de cette collection chimique, seuls, trois similaires présentant une énergie d'interaction inférieure à celle de la linagliptine (-11.13 Kcal/Mole) ont été observés.

La structure et les résultats de la simulation par AutoDock de ces similaires sont représentés dans le tableau N°4.

Tableau N°4: Structure et énergie d'interaction vis-à-vis la DPP4 des meilleurs similaires de la linagliptine.

Structure	N° de la molécule dans la collection	Numéro d'accèsion	Score (Kcal/Mole)
	70	11432733	-11.58
	138	11364775	-11.31
	139	11353340	-11.49

Etant donné la marge d'erreur de 2 Kcal/Mole tolérée par le programme AutoDock [81], les résultats du criblage virtuel réalisé s'avèrent non satisfaisants car aucune amélioration significative de l'énergie d'interaction n'a été observée. C'est la raison pour laquelle nous avons fait recours à une deuxième approche basée sur la modification de la structure moléculaire du composé de départ.

3.2 Modification structurale de la linagliptine

3.2.1 Topologie du site actif de la DPP4 en interaction avec la linagliptine

La linagliptine présentée dans la figure N°37 ne contient qu'un seul groupement donneur de liaison hydrogène et deux groupements accepteurs de liaisons hydrogène, ce qui explique en partie la formation d'une seule liaison hydrogène lors de son interaction avec le site actif de la DPP 4 (voir page 63).

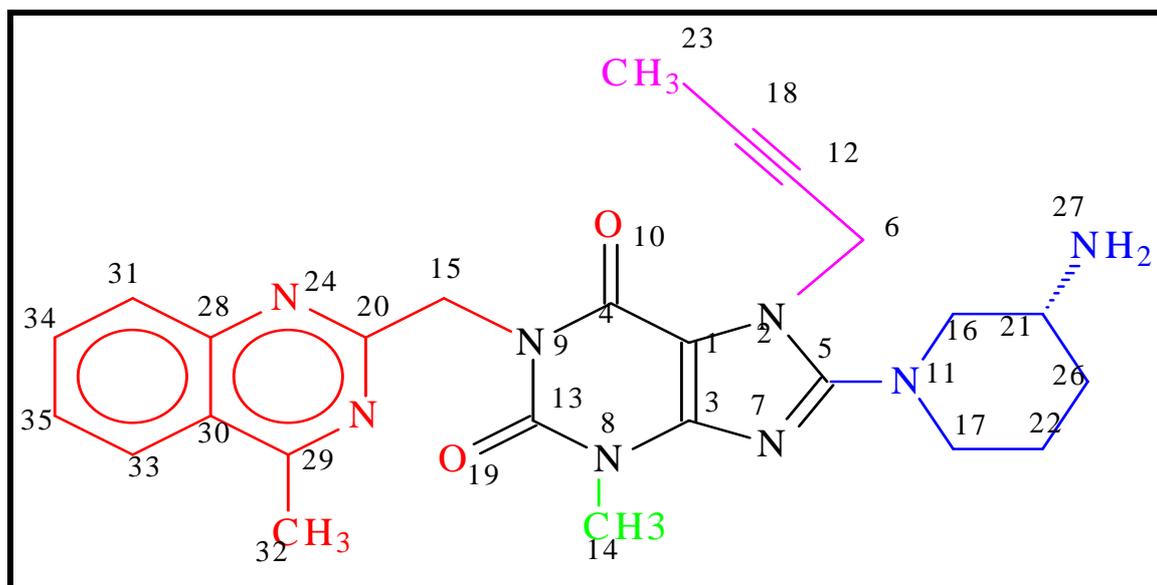


Figure N°37: Numérotation des atomes constituant la linagliptine: le radical R1 est représenté en bleu, R2 en rouge, R3 en vert et R4 en rose [119].

Afin de rationaliser au mieux le développement de nouveaux inhibiteurs de la DPP4, une étude plus approfondie fut menée sur le mode d'interaction de la linagliptine avec le site actif de la DPP4 (voir figure N°38). Cette étude nous a permis de cibler les radicaux de la linagliptine qu'il faut modifier dans le but de créer de nouvelles liaisons hydrogène avec les résidus Tyr547, Tyr662 (poche S1), Glu205 et Glu206 (poche S2) bien que très proches de l'inhibiteur, n'ont établi aucune liaison jusque là.

Au niveau de la poche S1 de la DPP4, l'hydroxyle du résidu Tyr547 est séparé du radical méthyle de l'inhibiteur par une distance de 4.7 Å. Afin de réduire cette distance, nous proposons de remplacer le groupement méthyle de l'inhibiteur par un groupement accepteur d'hydrogène tel que C=O, NH₂, -F....etc. (voir tableau N°5).

Concernant la poche S2, pour faciliter la formation de liaisons hydrogène avec les résidus Glu205, Glu206 et Tyr662, nous proposons de rajouter une fonction amine supplémentaire sur le radical R1 de la linagliptine.

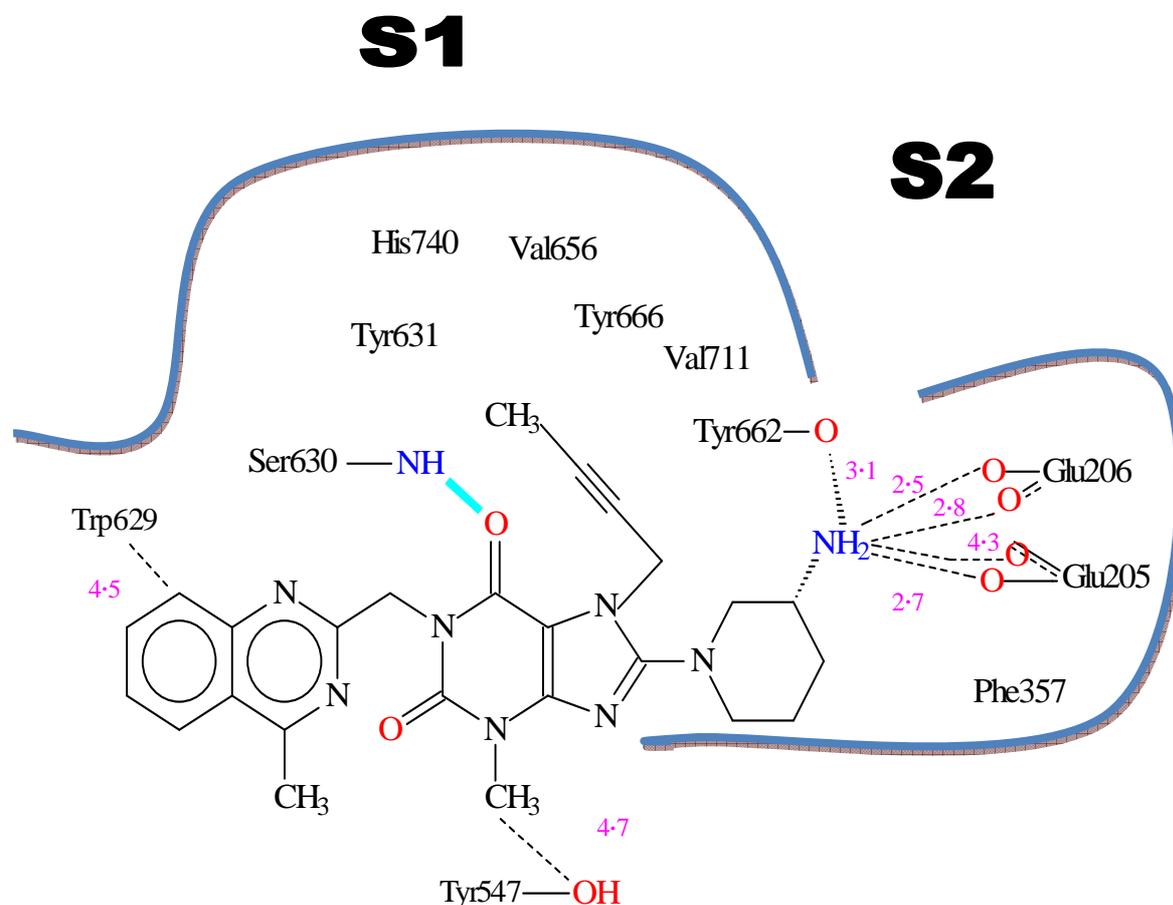


Figure N°38: Représentation de la topologie du site actif de la DPP4 en interaction avec la linagliptine: la seule liaison hydrogène est représenté en ligne vert, les distances entre les atomes susceptibles d'établir des liaisons hydrogènes sont représentés en lignes pointillées.

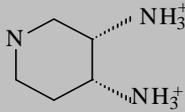
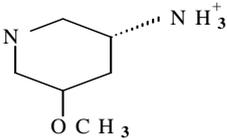
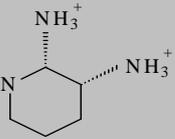
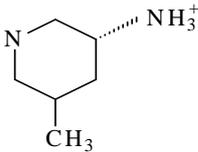
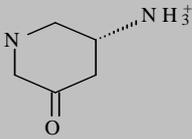
3.2.2 Mono-substitution

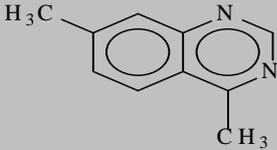
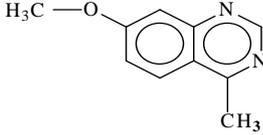
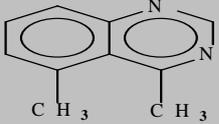
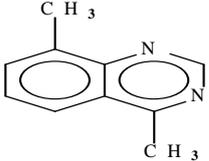
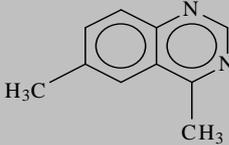
Le changement de structure de la linagliptine consiste, dans un premier temps, à introduire de nouvelles substitutions sur les quatre radicaux R1, R2, R3 et R4 liés au noyau xanthine de la linagliptine (voir figure N°37). Ensuite, le composé monosubstitué présentant le meilleur score subira une bi, voire même une tri-substitution afin d'améliorer davantage son score d'énergie.

En se basant sur les observations décrites précédemment sur le site actif, nous avons réalisé différents substitutions de type amine, méthoxy, méthyle carbonyle...etc sur les radicaux R1, R2, R3 et R4 de la structure de départ de la linagliptine. Les résultats de la

simulation par AutoDock des ligands monosubstitués au nombre de dix-neuf sont représentés dans le tableau N°5.

Tableau N°5: Structure et résultats des interactions de la linagliptine modifiée sur les radicaux R1, R2, R3 et R4.

Ref	R 1	Score (Kcal/Mole)	Nombre de liaisons H	IC ₅₀ théorique (pM)	Ki théorique (pM)
A1		-14.37	6	0.02	29.22
A2		-12.72	4	1.79	472.26
A3		-14.13	4	0.04	43.65
A4		-12.77	4	1.58	436.74
A5		-12.64	4	2.20	547.36
R2					

B1		-13.03	4	0.76	281.69
B2		-12.79	2	1.5	423.69
B3		-12.75	4	1.66	449.13
B4		-12.69	2	1.94	502.84
B5		-12.87	4	1.22	368.88
R 3					
C1	CH_2NH_3^+	-12.75	5	1.66	447.31
C2	CO-NH_3^+	-12.73	4	1.75	464.28
C3	$\text{CH}_2\text{CO-NH}_3^+$	-12.64	2	2.2	544.86
C4	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	-12.74	4	1.7	442.58
C5	CH_2PH_3	-12.74	4	1.7	459.63

R 4

D1	<chem>CH-C#C-CF3</chem>	-11.65	4	20	2900
D2	<chem>CH-C#C-C#N</chem>	-12.21	4	6.6	1130
D3	<chem>CH-C#C-CH=O</chem>	-12.04	4	10.3	1500
D4	<chem>CH-C#C-CH-CHO</chem>	-11.93	2	13.6	1810

Tenant compte de la marge d'erreurs de 2 Kcal/Mole toléré par AutoDock, il ressort de ce tableau que seule, l'introduction d'une nouvelle fonction amine a entraîné une diminution significative de l'énergie d'interaction. Dans le cas des composés A1 et A3, elle passe de -11.13 Kcal/mole à -14.37 et -14.12 Kcal/Mole respectivement. Il faut également souligner une baisse des valeurs de leurs IC₅₀ et Ki qui étaient de 1 nM et 6.94 nM respectivement, dans la molécule de départ, témoignant ainsi d'une amélioration de leur activité inhibitrice vis-à-vis de la DPP4.

Pour ne prendre que l'exemple du composé A1, l'analyse visuelle montre que la nouvelle fonction amine liée au C26 établit 2 liaisons hydrogène dont l'une avec le carbonyle de Glu206 et l'autre avec le carbonyle de Glu205 avec des distances respectives de 1.97 Å et 1.69 Å (voir figure N°39). Le groupement amine porté par le carbone 21 du composé A1 établit, quant à lui, trois liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène des résidus Tyr662 (d=2.19 Å), Glu205 (d=2 Å) et Glu206 (d=1.71 Å) respectivement. Enfin, l'un des oxygènes du noyau xanthine établit une sixième liaison hydrogène avec la fonction alpha-aminée du résidu Ser630 (d=2.03 Å).

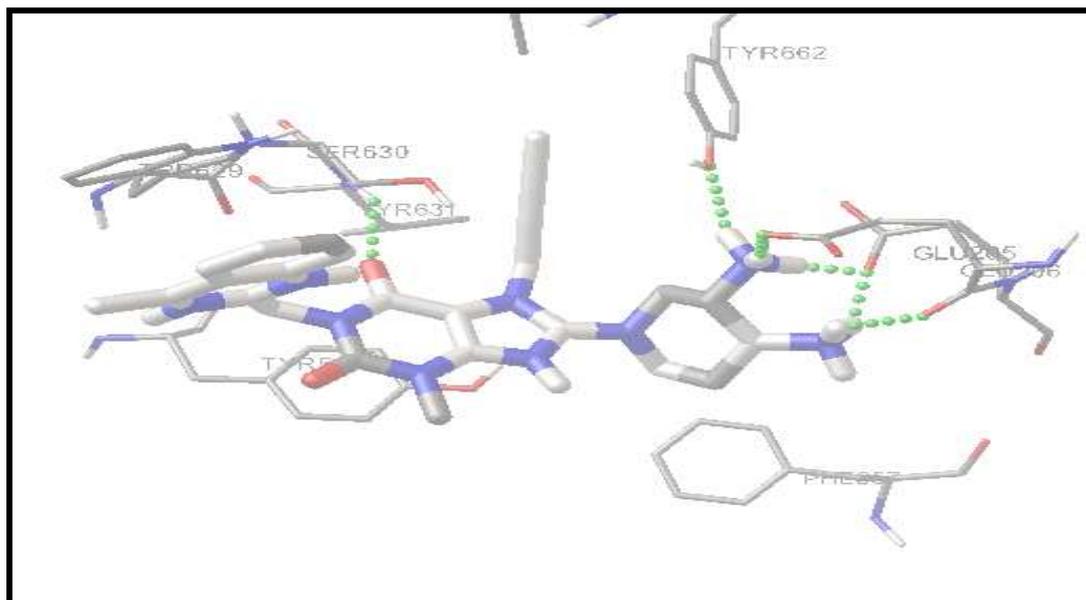
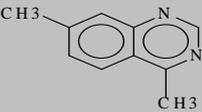
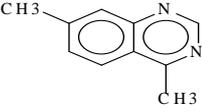


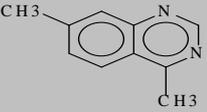
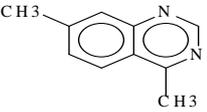
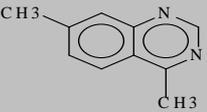
Figure N°39: illustrations des interactions A1-DPP4.

3.2.3 Poly-substitution

Dans un deuxième temps, nous avons procédé à une polysubstitution de la linagliptine en tenant compte les résultats de la monosubstitution obtenus précédemment. Nous avons combiné le radical R1 du composé A1 et le radical R2 du composé B1 et les différents radicaux R3 utilisés dans les composés C1 à C5 (voir tableau N°6).

Tableau N°6: Structure et énergie d'interaction des ligands proposés : poly-substitution.

Ref	R2	R3	Score (Kcal/Mole)	Nombre de liaisons H	IC ₅₀ théorique (pM)	Ki théorique (pM)
E1		CH ₂ NH ₃ ⁺	-14.40	4	0.2	27.03
E2		CO-NH ₃ ⁺	-14.70	4	0.01	16.69

E3		$\text{CH}_2\text{CO-NH}_3^+$	-14.60	4	0.01	20.9
E4		$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	-15.13	5	0.003	8.13
E5		CH_2PH_3	-14.75	4	0.009	15.44

Les résultats du tableau N°6 montrent que les composés E4 et E5, avec des énergies d'interaction respectives égales à -15.13 Kcal/Mole et -14.75 Kcal/Mole, constituent les inhibiteurs les plus sélectifs et le plus puissants de la DPP4. Le mode d'interaction de ces composés avec la DPP4 a été étudié avec AutoDock. Pour ne prendre que l'exemple du composé E4, l'analyse visuelle montre qu'il est bien placé dans le site actif de la DPP4 (voir figure N°40). Il établit, grâce au radical $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ une liaison hydrogène avec la fonction hydroxyle du résidu Tyr547 ($d=2.01 \text{ \AA}$) (voir figure N°41). Trois autres ponts hydrogène sont obtenus entre les fonctions amines liées aux carbones 21 et 26 et les fonctions carboxyles des résidus Glu205 et Glu 206 séparés par des distances respectives de 1.94 \AA , 1.68 \AA et 1.84 \AA . Une cinquième liaison hydrogène est formée entre l'un des oxygènes du noyau xanthine de l'inhibiteur et la fonction amine du résidu Ser630 avec une distance égale à 1.78 \AA .

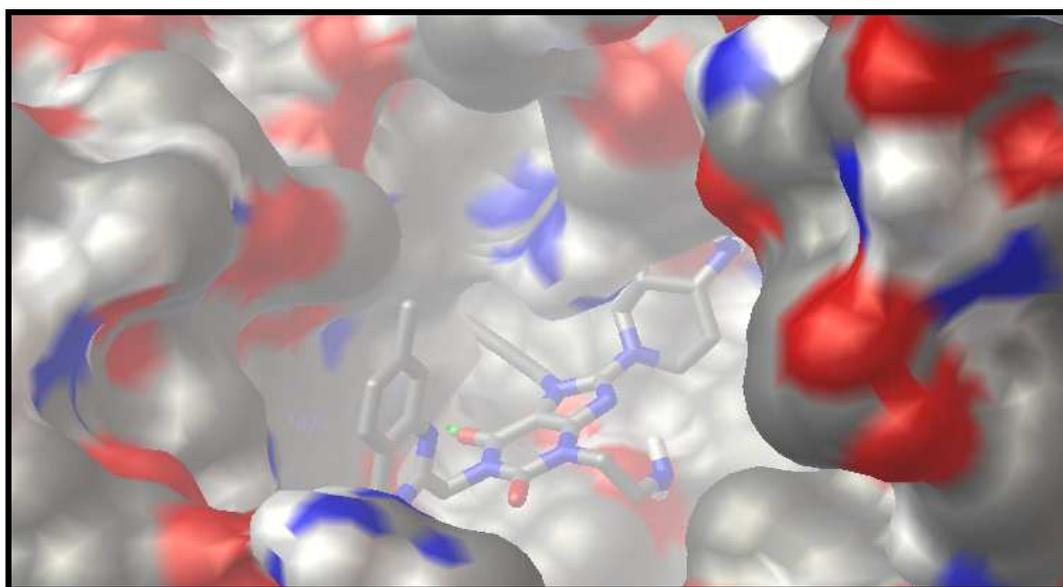


Figure N°40: Illustration du positionnement de l'inhibiteur E4 dans le site actif de la DPP4.

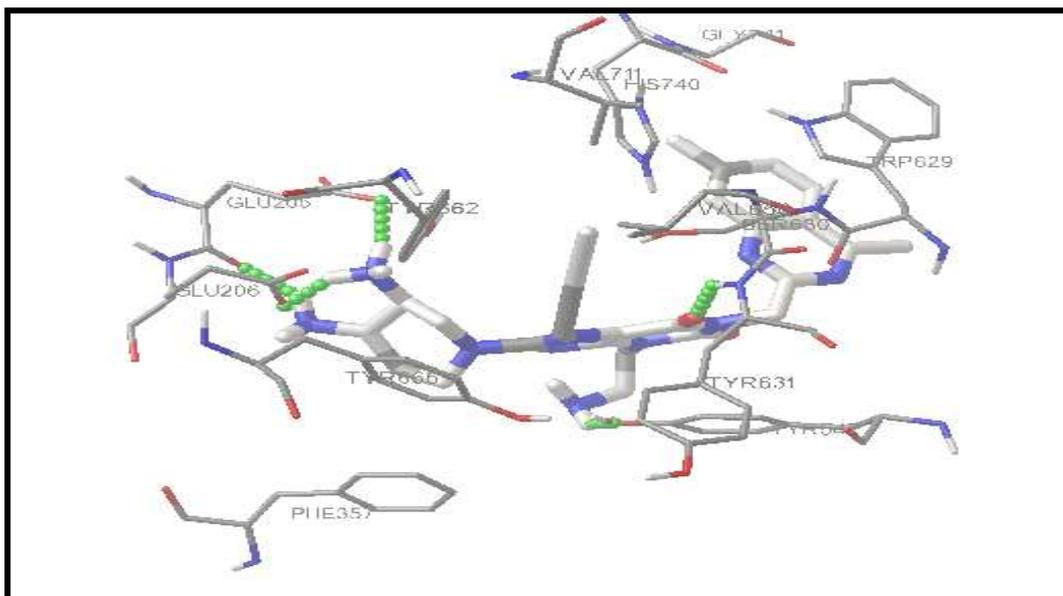


Figure N° 41: Mode d'interaction du composé E4 dans le site actif de la DPP4.

En utilisant la courbe de régression linéaire tracée précédemment (voir figure N°19), nous avons pu dégager la valeur théorique de l'IC₅₀ du composé E4 qui est de l'ordre de 0.003 pM. Sa constante d'inhibition K_i calculée théoriquement par le logiciel est de l'ordre de 8.13 pM soit la meilleure valeur obtenue jusque là. De tels résultats sont significatifs d'un composé biologiquement très actif pouvant inhiber très fortement la DPP4.

4. Le filtrage ADME/tox

Il était indispensable de compléter notre travail par l'application de la méthode de « filtre ADME/tox » qui est basée sur la règle de 5 formulée par Christopher Lipinski [120]. Cette règle décrit un ensemble de critères, au nombre de 5, permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Les cinq critères sont :

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 daltons (Da).
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 5.
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène doit être inférieur à 10.
- Le nombre de liaisons rotatives inférieur à 15.
- Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1-octanol, noté LogP, doit être compris entre -2 et 5. Cette valeur permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. S'il est positif et très élevé, cela exprime le

fait que la molécule considérée est bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, ce qui reflète son caractère lipophile, et inversement.

Ces paramètres ont été calculés en utilisant le serveur RPBS jussieu [121]. Les résultats sont montrés dans le tableau N°7.

Tableau N°7: Propriétés moléculaires des inhibiteurs de la DPP4 proposés.

	E4	E5
PM	530.4	533.3
DH	3	2
AH	5	4
LF	5	6
Log P	-1.92	-1.70

PM = Poids Moléculaire, DH = Donneur d'Hydrogène (OH et NH), AH = Accepteur d'Hydrogène (O et N), LF = Liaison Flexible, LogP = coefficient de partition Eau/octanol.

Selon Lipinski, tous les composés ne validant pas au moins trois de ces conditions sont susceptibles de poser des problèmes d'absorption par voie orale [71]. A l'exception de leurs poids moléculaire un peu plus élevé, les composés E4 et E5 répondent parfaitement aux autres critères de la règle de Lipinski. En se référant particulièrement à leur coefficient de partition eau / octanol, parfaitement dans les normes, il apparait que ces inhibiteurs peuvent se dissoudre très facilement dans les phases aqueuses de l'organisme et traverser les membranes lipidiques pour parvenir jusqu'à leur lieu d'action.

Conclusion et perspectives

Notre travail de recherche avait pour but essentiel d'acquérir des compétences en simulation informatique, en particulier le docking moléculaire par AutoDock afin de contribuer au développement *in silico* de nouveaux inhibiteurs de la DPP4, cible enzymatique récente jouant un rôle prometteur dans le traitement du diabète de type 2.

Au préalable, nous avons testé la performance du programme AutoDock utilisé dans cette étude, en déterminant le coefficient de corrélation linéaire qui existe entre les valeurs expérimentales de l'IC₅₀ des molécules étudiées et leur énergie d'interaction simulée par docking moléculaire. Un deuxième test par calcul du RMSD (Root mean Square deviation) nous a permis de juger la déviation de la géométrie du ligand simulée par AutoDock avec celle déterminée expérimentalement qu'on retrouve dans la PDB. À ce titre, nous avons utilisé les ligands de sept complexes de la PDB portant les codes suivants : 2I3Z, 3G0B, 3G0C, 3G0D, 3G0G, 2ONC et 2RGU. Enfin, un troisième test nous a permis de vérifier visuellement les résultats du RMSD. Avec un coefficient de corrélation égal à 0.86, des valeurs de RMSD inférieures à 1Å et une bonne superposition des ligands simulés et expérimentaux, ces tests nous apportent la preuve que le programme AutoDock est hautement performant et peut être utilisé en toute fiabilité pour simuler les interactions d'autres inhibiteurs comme les xanthines, objet de notre présent travail.

Dans la perspective de développer de nouveaux inhibiteurs plus affins et plus sélectifs de la DPP4, nous nous sommes servis des sept complexes DPP4-xanthine de la PDB cités plus haut. La reconstruction de ces complexes avec AutoDock nous a permis de calculer leur énergie d'interaction et de faire ressortir la linagliptine (composé 356), présente dans le complexe 2RGU, comme meilleur inhibiteur de la DPP4. Son énergie d'interaction égale à -11.13 Kcal/Mole correspond à la plus basse valeur du groupe étudié.

Dans une troisième partie, nous avons tenté de développer de nouveaux inhibiteurs en prenant comme structure de départ la linagliptine. L'activité inhibitrice de cette dernière a pu être améliorée grâce à deux approches très utilisées dans le domaine de la conception rationnelle des médicaments : le criblage virtuel d'une collection de similaires chimiques et la modification structurale par polysubstitution.

Le criblage virtuel n'a donné aucun résultat probant, contrairement à la polysubstitution. En effet, le composé E4 résultant de la polysubstitution de la linagliptine par l'introduction d'un groupement méthyle sur le radical R2 (carbone 34) et d'un groupement

amine sur le radical R1 (carbone 26) ainsi que le remplacement du groupement méthyle en position 14 par un groupement éthylamine $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ présente une nette amélioration de son énergie d'interaction qui passe de -11.13 Kcal/Mole à -15.13 Kcal/Mole. La valeur théorique de son IC_{50} diminue également de 1 nM à 0.003 pM.

Enfin, l'application de la règle de 5 de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME du composé E4 qui se présente comme l'inhibiteur le plus actif vis-à-vis la DPP4.

Comme perspectives d'avenir, des tests *in vitro* et/ou *in vivo* de l'activité biologique de l'inhibiteur E4 sont recommandés pour compléter les résultats théoriques et vérifier l'efficacité de l'approche *in silico*.

Références bibliographiques

- [1] Couic-Marinier F. Du nouveau dans le traitement du diabète non insulino-dépendant avant le passage à l'insuline. *Actualités pharmaceutiques*. 2009; **48**: 34-37.
- [2] Boudiba A., Mimouni-Zerguini S. Améliorer la prévention et les soins du diabète en Algérie. *Diabetes Voice*. 2008; **53**: 19-21.
- [3] Haffner S. M., Stern M. P., Hazuda H. P., Mitchell B. D., Patterson J. K. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for the coronary heart disease start ticking before the onset clinical deterioration?. *Journal of American Medical Association*. 1990; **263**: 2893-2898.
- [4] Halimi S., Debaty I., Villaret L., Muller M. Les nouveaux traitements du diabète type 2. Quelle place pour les incrétines et le rimonabant par rapport aux précédents ?. *La Revue de médecine interne*. 2008; **29**: 881–890.
- [5] Gautier J. F., Choukem S. P. Les incrétines. *Nutrition clinique et métabolisme*. 2008; **22**: 59-65.
- [6] Kurukulasuriya R., Rohde J. J., Szczepankiewicz B.G., Basha F., Lai C., Jae H.S. et al. Xanthine mimetics as potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2006; **16**: 6226–6230.
- [7] Blické J. F., Robillart I., Brogard J. M. Etiopathogénie du diabète non insulino-dépendant. *La Revue de Médecine Interne*. 1995; **16**: 20-30.
- [8] Mering J. V., Minkowski O. Diabetes mellitus nach Pankreasexstirpation. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1890; **26**: 371–387.
- [9] Houssay B. A. The Discovery of Pancreatic Diabetes: The Role of Oscar Minkowski. *Diabetes*. 1952; **1**: 112–116.
- [10] SevenMice SARL. Anatomie du pancréas [en ligne] <http://www.medecine-et-sante.com/anatomie/pancreas.html>. Consulté le: [20-01-2011].
- [11] Broydell M., Mazuca D. M., Kudo P. A., Lo T. C. The role of the GLUT4 transporter in regulating rat myoblast glucose transport processes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; **1371**: 295–308.

- [12] Agence pour l'enseignement Français à l'étranger. L'homéostasie glycémique [En ligne] http://pg-lfc.com/IMG/pdf/Chapitre_11_L_homeostasie_glycemique.pdf. Consulté le : [21-01-2011].
- [13] Marguerite C., Provost D., Compère V., Jean J., Dureuil B. Fausse hyperglycémie capillaire et vraie hypoglycémie iatrogène postopératoire. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*. 2009; **28**: 704-705.
- [14] Scheen A. J., Luyckx F. H. L'hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO) revisitée: 1^{re} partie: Tolérance au glucose, diabète gestationnel et hypoglycémie réactive. *Médecine des Maladies Métaboliques*. 2010; **4**: 569-574.
- [15] Grimaldi A. Le diabète de type 2. France : Elsevier. 2004. 504p.
- [16] Urgent : En Tunisie, un million de diabétiques en 2010 ! [En ligne] <http://www.tuniscope.com/index.php/article/5913/mode-vie/sante/diabetiques-393617>. Consulté le : [02-02-2010].
- [17] Lounes S. Diabète en Algérie, 1 malade sur 2 ignore en être atteint [En ligne] <http://www.djazairiess.com/fr/infosoir/120502>. Consulté le : [05-2-02-2011].
- [18] Mouraux T., Dorchy H. Le poids de l'obésité dans le (pré)diabète de type 2 chez les enfants et adolescents : quand et comment le rechercher ?. *Archives de pédiatrie*. 2005; **12**: 1779–1784.
- [19] Fève B., Bastard J. F., Vidal H. Les relations entre obésité, inflammation et insulino-résistance : Acquisitions récentes. *Comptes Rendus Biologies*. 2006; **329**: 587–597.
- [20] Les facteurs de risques du diabète de type 2 [En ligne] <http://www.gsk.fr/gsk/votresante/diabete/risques.html>. Consulté le: [20-02-2011].
- [21] Fiche d'information sur le diabète [En ligne] http://www.diabete.qc.ca/pdf/recherche/FICHE_DICE.pdf. Consulté le: [25-02-2011].
- [22] Ichai C. Recommandations francophones pour le contrôle glycémique en réanimation. *Médecine des maladies Métaboliques*. 2010; **4**: 478-489.

- [23] Société Scientifique de Médecine Générale. Diabète sucré de type 2 [En ligne] www.ssmg.be/new/files/RBP_Diabete2.pdf. Consulté le: [26-02-2011].
- [24] Golden S. H. The Cardiovascular Consequences of Type 2 Diabetes Mellitus. Allemagne: Edition: J. G. Regensteiner et al. 2009. 110-130.
- [25] Le diabète de type 2 [En ligne] [http://www.gsk.fr/gsk/votresante/diabete de type 2.pdf](http://www.gsk.fr/gsk/votresante/diabete%20de%20type%202.pdf). Consulté le: [28-02-2011].
- [26] La prise en charge du diabète de type 2 [En ligne] http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/ald8_guidemedecin_diabetetype2_revunp_vucd.pdf. Consulté le: [28-02-2008].
- [27] Kirpichnikov D., McFarlane S. I., Sowers J. R. Metformine: An Update. *Annals of Internal Medicine*. 2002; **137**: 25-33.
- [28] Halimi S. Metformin: 50 years old, fit as a fiddle, and indispensable for its pivotal role in type 2 diabetes management. *Diabetes and Metabolism*. 2006; **32**: 555–561.
- [29] Bolen S., Feldman L., Vassy J., Wilson L., Yeh H. C, Marinopoulos S., et al. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of Internal Medicine*. 2007; **147**: 86–99.
- [30] Halimi S., Le Berre M. A., Grange V. Efficacy and safety of acarbose add-on therapy in the treatment of overweight patients with Type 2 diabetes inadequately controlled with metformin: a double-blind, placebo-controlled study. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2000; **50**:49–56.
- [31] Halimi S. Les glitazones. *Revue de Médecine Interne*. 2005; **26**: 54–7.
- [32] Tielmans A., Laloi-Michelin M., Coupaye M., Virally M., Meas T., Guillausseau J. P. Traitement médicamenteux du diabète de type 2. *Diabétologie*. 2007; **36**: 269-78.
- [33] Drucker D., Buse J. Traitement hebdomadaire pour le diabète de type 2. *Revue francophone des laboratoires*. 2009; **39**: 21-27.
- [34] Scheen A. J. Le Glucagon like peptide-1 (GLP-1), Nouvelle cible dans le traitement du diabète de type 2. *Revue Médicale de Liège*. 2007; **62**: 216-219.

- [35] Nauck M. A., Wollschlager D., Werner J. Effects of subcutaneous glucagon-like peptide-1 (GLP-1 [7-36 amide]) in patients with NIDDM. *Diabetologia*. 1996; **39**: 1546-53.
- [36] Fehmann H. C., Goke R., Goke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrinology Review*. 1995; **16**: 390–410.
- [37] McIntosh C. H., Demuth H. U., Kim S. J., Pospisilik J. A., Pederson R. A. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2006; **38**: 860–72.
- [38] Drucker D. Enhancing incretin action for the treatment of type-2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003; **26**: 2929–40.
- [39] Virally M., Bliclé J. F., Girard J., Halimi S., Simon D., Guillausseau P. J. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes and Metabolism*. 2007; **33**: 231–44.
- [40] Nauck M., Heimesaat M., Orskov C., Holst J., Ebert R., Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*. 1993; **91**: 301–308.
- [41] Zander M., Madsbad S., Madsen J. L., Holst J. J. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet journal*. 2002; **359**: 824–854.
- [42] Deacon C. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. *Diabetes*. 2004; **53**: 2181–2190.
- [43] Keating G. M. Exenatide. *Drugs*. 2005; **65**: 1681-1692.
- [44] Vilsbell T. Liraglutide: a once-daily GLP-1 analogue for the treatment of Type 2 diabetes mellitus. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2007; **16**: 231-237.
- [45] Allain P. Les gliptines, sitagliptine et vildagliptine, antidiabétiques [En ligne] <http://www.pharmacorama.com/ezine/gliptines-sitagliptine-vildagliptineantidiabetiques.php>. Consulté le : [10-3-2011].

- [46] Lyseng-Williamson K. A. Sitagliptin. *Drugs*. 2007; **67**: 587-597.
- [47] Augustynsl K. J. L., Lambeir A. M., Borlo M., De Meester I., Vedernikoval I., Vanhoof., et al. Pyrrolidides: synthesis and structure-activity relationship as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1997; **32**: 301-309.
- [48] Yazbeck R., Howarth G. S., Abbott C. A. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease?. *Trends in Pharmacological Science*. 2009; **30**: 600-607.
- [49] Sentandreu M. A., Toldra F. Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties. *Food Chemistry*. 2001; **75**: 159-168.
- [50] McIntosh C. H., Demuth H. U., Kim S. J., Pospisilik J. A., Pederson R. A. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2006; **38**: 860-72.
- [51] Stulc T., Sedo A. Inhibition of multifunctional dipeptidyl peptidase-IV: Is there a risk of oncological and immunological adverse effects?. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010; **88**: 125- 131.
- [52] Sedo A., Stremenova J., Busek P., Duke-Cohan J. Dipeptidyl peptidase-IV and related molecules: markers of malignancy?. *Expert Opinion on Medical Diagnostics*. 2008; **2**: 677-689.
- [53] Hopsu-Havu V. K., Glenner G. G. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-b-naphthylamide. *Histochemie*. 1966; **7**: 197-201.
- [54] Hopsu-Havu V. K. A hog kidney aminopeptidase liberating N-terminal dipeptides. Partial purification and characteristics. *Acta Chemica Scandinavica*. 1968; **22**: 299-308.
- [55] Hopsu-Havu V. K., Sarimo S. R. Purification and charcterization of an aminopeptidase hydrolyzing glycyl-prolinenaphthylamide. *Physiological Chemistry*. 1967; **348**: 1540-1550.
- [56] EMBL-EBI. Dipeptidyl-peptidase 4 [En ligne] <http://www.uniprot.org/uniprot/P27487>. Consulté le: [14-03-2011].

- [57] Kiyama M., Hayakawa M., Shiroza T., Nakamura S., Takeuchi A., Masamoto Y., et al. Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase IV gene. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998; **1**: 39–46.
- [58] Marguet D., Bernard A. M., Vivier I., Darmoul D., Naquet P., Pierres M. cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. A multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases. *Journal of Biological Chemistry*. 1992; **267**: 2200–2208.
- [59] McIntosh C. H. S., Demuth H. U., Pospisilika J. A., Pederson R. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: How do they work as new antidiabetic agents?. *Regulatory Peptides*. 2005; **128**: 159– 165.
- [60] Engel M., Hoffmann T., Wagner L., Wermann M., Heiser U., Kiefersauer R., et al. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; **100**: 5063 – 5071.
- [61] Rasmussen H. B., Branner S., Wiberg F. C., Wagtmann N. Crystal structure of dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2003; **10**: 19 – 25.
- [62] Pissurlenkar R. R. S., Shaikh M. S., Coutinho E. C. 3D-QSAR studies of Dipeptidyl peptidase IV inhibitors using a docking based alignment. *The Journal of Molecular Modeling*. 2007; **13**: 1047–1071.
- [63] Doreen M. A., Butrus A., Baker G. R., Baxter A. J., Jenkins P. D., Jones D. M. et al. 4-Cyanothiazolidides as potent, stable inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 1996; **6**: 2745-2748.
- [64] Hans-Ulrich D., McIntosh C. H. S., Pederson R. A. Type 2 diabetes Therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; **1751**: 33 – 44.
- [65] Wiedeman P. E., Trevillyan J. M. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2003; **4**: 412– 420.

- [66] Peters J. U., Weber S., Kritter S., Weiss P., Wallier A., Boehringer M., et al. Aminomethylpyrimidines as novel DPP-IV inhibitors: a 10(5)-fold activity increase by optimization of aromatic substituents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2004; **14**: 1491–1493.
- [67] Augustynsl K. J. L., Lambeir A. M., Borlo M., De Meester I., Vedernikoval I., Vanhoof G., et al. Pyrrolidides: synthesis and structure-activity relationship as inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1997; **32**: 301-309.
- [68] Wallace M. B., Feng J., Zhang Z., Skene R. J., Shi L., Caster C. L., et al. Structure-based design and synthesis of benzimidazole derivatives as dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2008; **18**: 2362–2367.
- [69] Simpkins L. M., Bolton S., Pi Z., Sutton J. C., Kwon C., Zhao G., et al. Potent non-nitrile dipeptidic dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007; **18**: 6476–6480.
- [70] 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. 90 p.
- [71] Arrault A. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma. Thèse de doctorat d'université : Modélisation Moléculaire et Chemoinformatique. Orléans : Université d'Orléans. France. 2007. 176 p.
- [72] 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. 149 p.
- [73] Zhou H., Zhou Y. Fold recognition by combining sequence profiles derived from evolution and from depth-dependent structural alignment of fragments. *Proteins*. 2005; **58**: 321-328.
- [74] Douguet D. Etude des interactions protéine-protéine et protéine-ligand par bio- et chimie-informatique structurale : Identification de petites molécules bio-actives. Thèse

d'habilitation à diriger des recherches : pharmacologie. Valbonne : Université de Nice-Sophia Antipolis. France. 2007. 65 p.

[75] De Oliveira E. B. Simulation moléculaire appliquée à l'acétylation de flavonoïdes catalysés par des lipases : influence des structures de la lipase et des flavonoïdes sur la régiosélectivité de la bioconversion. Thèse de doctorat d'université : Procédés biotechnologiques et alimentaires. Nancy : Institut National Polytechnique de Lorraine. France. 2009. 187 p.

[76] RCSB PDB. RCSB PDB statistics. [En ligne] http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=general_information/pdb_statistics/index.html. Consulté le : [17-04-2011].

[77] 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. 154 p.

[78] Renvez G. Application des modes statiques à l'étude de la flexibilité des protéines : vers un processus de docking. Thèse de doctorat d'université: Nanophysique. Toulouse : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 2010. 163 p.

[79] Thiriot E. Modélisation de la reconnaissance et de la catalyse enzymatiques : développements méthodologiques et détermination du mécanisme des Méthionine Sulfoxyde Réductases de classe A. Thèse de doctorat d'université : Chimie informatique et théorique. Nancy : Université de Nancy. France. 2009. 291 p.

[80] Chikhi A. Calculs et modélisations des interactions peptide déformylase – Substances antibactériennes a l'aide de techniques de "docking" (arrimage) moléculaire. Thèse de doctorat d'université : Biochimie appliquée. Constantine : Université Mentouri de Constantine. Algérie. 2007. 90p.

[81] 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. *Journal of Computational Chemistry*. 1998; **19**: 1639-1662.

[82] Jones G., Willett P., Glen R. C., Leach A. R., Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*. 1997; **267**: 727-48.

- [83] Rarey M., Kramer B., Lengauer T., Klebe G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology*. 1996; **261**: 470-489.
- [84] Ewing T. J., Makino S., Skillman A. G., Kuntz I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. *Journal of Computer-Aided Molecular*. 2001; **15**: 411-428.
- [85] Abagyan R., Totrov M. Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1994; **235**: 983-1002.
- [86] Sousa S. F., Fernandes P. A., Ramos M. J. Protein-Ligand Docking: Current Status and Future Challenges. *Proteins*. 2006; **65**: 15-26.
- [87] Hazan C. Recherche d'inhibiteurs de haute affinité de l'ADN polymérase beta par criblage virtuel et RMN. Thèse de doctorat d'université : Biologie structurale. Toulouse : l'Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 2008. 258 p.
- [88] Brut M. Nouvelle approche méthodologique pour la prise en compte de la flexibilité dans les interactions entre molécules biologiques : Les Modes Statiques. Thèse de doctorat d'université: Nanophysique. Toulouse : Université Toulouse III - Paul Sabatier. France. 2009. 170 p.
- [89] Bravo J. Development and Validation of Target-Based Drug Design Tools: Virtual Screening of Monoamine Oxidase Inhibitors. Thèse de doctorat d'université: Sciences pharmaceutiques. Genève : Université de Genève. Suisse. 2009. 215 p.
- [90] Golbraikh A., Tropsha A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2002; **16**: 357-369.
- [91] Kramer B., Rarey M., Lengauer T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins*. 1999; **37**: 228-241.
- [92] Fortuné A. Techniques de Modélisation Moléculaire Appliquées à l'Etude et à l'Optimisation de Molécules Immunogènes et de Modulateurs de la Chimiorésistance. Thèse

de doctorat d'université : Sciences du médicament. Grenoble : université JOSEPH FOURIER - Grenoble I. France. 2006. 168 p.

[93] Solis F., Wets J. R. Minimization by random search techniques. *Mathematics of Operations Research*. 1981; **6**: 19-30.

[94] Gautier M. Etude structurale du domaine d'interaction du récepteur de l'élastine. Approches biochimiques, biophysiques et bioinformatiques. Thèse de doctorat d'université : Biomolécules et Dynamique Cellulaire. Reims Champagne-Ardenne : Université de Reims Champagne-Ardenne. France. 2005. 240 p.

[95] Eckhardt M., Langkopf E., Mark M., Tadayyon M., Thomas L., Nar H., et al. 8-(3-(R)-aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7 dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a highly potent, selective, long-acting, and orally bioavailable DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007; 50: 6450-6453.

[96] Weiner P. K., Kollman P. A. AMBER: Assisted Model Building with Energy Refinement. A General Program for Modeling Molecules and Their Interactions. *Journal of Computational Chemistry*. 1981; **2**: 287-303.

[97] Dewar M. J. S., Zoebisch E. G., Healy E. F., Stewart J. J. P. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Model. *Journal of the American Chemical Society*. 1985; **107**: 3902-3909.

[98] Engel M., Hoffmann T., Manhart S., Heiser U., Chambre S., Huber R., et al. Rigidity and flexibility of dipeptidyl peptidase IV: crystal structures of and docking experiments with DPIV. *Journal of Molecular Biology*. 2006; **355**: 768-783.

[99] Zhang Z., Wallace M.B., Feng J., Stafford J. A., Skene R. J., Shi L., et al. Design and synthesis of pyrimidinone and pyrimidinedione inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2011; **54**: 510-524.

[100] Edmondson S. D., Mastracchio A., Cox J. M., Eiermann G. J., He H., Lyons K. A. et al. Aminopiperidine-fused imidazoles as dipeptidyl peptidase-IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009; **19**: 4097-4101.

- [101] Mattei P., Boehringer M., Di Giorgio P., Fischer H., Hennig M., Huwyler J. et al. Discovery of carmegliptin: a potent and long-acting dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2010; **20**: 1109-1113.
- [102] Biftu T., Scapin G., Singh S., Feng D., Becker J. W., Eiermann G. et al. Rational design of a novel, potent, and orally bioavailable cyclohexylamine DPP-4 inhibitor by application of molecular modeling and X-ray crystallography of sitagliptin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007; **17**: 3384-3387.
- [103] Ammirati M. J., Andrews K. M., Boyer D. D., Brodeur A. M., Danley D. E., Doran S. D. et al. (3,3-Difluoro-pyrrolidin-1-yl)-[(2S,4S)-(4-(4-pyrimidin-2-yl-piperazin-1-yl)-pyrrolidin-2-yl)]-methanone: a potent, selective, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2009; **19**: 1991-1995.
- [104] Feng J., Zhang Z., Wallace M. B., Stafford J. A., Kaldor S. W., Kassel D. B. et al. Discovery of alogliptin: a potent, selective, bioavailable, and efficacious inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007; **50**: 2297-2300.
- [105] Rasmussen H. B., Branner S., Wiberg F. C., Wagtmann N. R. Crystal structure of human dipeptidyl peptidase IV/CD26 in complex with a substrate analog. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2003; **10**: 19-25.
- [106] Kim D., Wang L., Beconi M., Eiermann G. J., Fisher M. H., He H. et al. (2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005; **48**: 141-151.
- [107] Nordhoff S., Cerezo-Galvez S., Feurer A., Hill O., Matassa V. G., Metz G. et al. The reversed binding of beta-phenethylamine inhibitors of DPP-IV: X-ray structures and properties of novel fragment and elaborated inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2006; **16**: 174.
- [108] Biftu T., Feng D., Qian X., Liang G. B., Kieczkowski G., Eiermann G. et al. (3R)-4-[(3R)-3-Amino-4-(2,4,5-trifluorophenyl)butanoyl]-3-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,4-diazepan-2-

one, a selective dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007; **17**: 49-52.

[109] Ahn J. H., Shin M. S., Jun M. A., Jung S. H., Kang S. K., Kim K. R. et al. Synthesis, biological evaluation and structural determination of beta-aminoacyl-containing cyclic hydrazine derivatives as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007; **17**: 2622-262.

[110] Kowalchick J. E., Leiting B., Pryor K. D., Marsilio F., Wu J. K., He H. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of triazolopiperazine-based beta-amino amides as potent, orally active dipeptidyl peptidase IV (DPP-4) inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007; **17**: 5934-5939.

[111] Kaelin D. E., Smenton A. L., Eiermann G. J., He H., Leiting B., Lyons K. A. et al. 4-arylcyclohexylalanine analogs as potent, selective, and orally active inhibitors of dipeptidyl peptidase IV. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2007; **17**: 5806-5811.

[112] Edmondson S. D., Wei L., Xu J., Shang J., Xu S., Pang J. et al. Fluoroolefins as amide bond mimics in dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2008; **18**: 2409-2413.

[113] Liang G. B., Qian X., Biftu T., Singh S., Gao Y. D., Scapin G. et al. Discovery of new binding elements in DPP-4 inhibition and their applications in novel DPP-4 inhibitor design. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2008; **18**: 3706-3710.

[114] Peters J. U., Weber S., Kritter S., Weiss P., Wallier A., Boehringer M. et al. Aminomethylpyrimidines as novel DPP-IV inhibitors: a 10(5)-fold activity increase by optimization of aromatic substituents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2004; **14**: 1491-1493.

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

- [116] Chikhi A., Bensegueni A. Analyse *in silico* de l'inhibition sélective de Déformylases peptide bactérien par plusieurs médicaments. *Journal of Proteomics and Bioinformatics*. 2010; **3**: 061-065.
- [117] Chikhi A., Bensegueni A. Docking Efficiency Comparison of Surflex, a Commercial Package and Arguslab, a Licensable Freeware. *Journal of Computer Science and Systems Biology*. 2008; **1**: 081-086.
- [118] Gabb J., Jackson R. M., Sternberg M. J. E. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. *Journal of Molecular Biology*. 1997; **272**: 106-120.
- [119] EMBL-EBI. Ligands in PDB [En ligne]. <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/msdchem/cgi-bin/cgi.pl?FUNCTION=getByCode&CODE=356>. Consulté le: [25-8-2011].
- [120] Lipinski C. A., Lombardo F., Domini B. W., Feney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997; **23**: 3-25.
- [121] Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale. FAF-Drugs: Free ADME/tox Filtering. [En ligne] <http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/Help/FAFDrugs.html>. Consulté le [30-08-2010].

Annexes

Annexe 1 : Format *pdb* du complexe 2RGU.

```

HEADER      HYDROLASE                                05-OCT-07    2RGU
TITLE       CRYSTAL STRUCTURE OF COMPLEX OF HUMAN DPP4 AND INHIBITOR
COMPND      MOL_ID: 1;
COMPND      2 MOLECULE: DIPEPTIDYL PEPTIDASE 4;
COMPND      3 CHAIN: A, B;
COMPND      4 FRAGMENT: EXTRACELLULAR DOMAIN;
COMPND      5 SYNONYM: DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV, DPP IV, T-CELL
COMPND      6 ACTIVATION ANTIGEN CD26, TP103, ADENOSINE DEAMINASE
COMPND      7 COMPLEXING PROTEIN 2, ADABP (CONTAINS: DIPEPTIDYL
COMPND      8 PEPTIDASE 4 MEMBRANE FORM, DIPEPTIDYL PEPTIDASE 4 SOLUBLE
COMPND      9 FORM);
COMPND     10 EC: 3.4.14.5;
COMPND     11 ENGINEERED: YES
SOURCE      MOL_ID: 1;
SOURCE      2 ORGANISM_SCIENTIFIC: HOMO SAPIENS;
SOURCE      3 ORGANISM_COMMON: HUMAN;
SOURCE      4 ORGANISM_TAXID: 9606;
SOURCE      5 GENE: DPP4, ADCP2, CD26;
SOURCE      6 EXPRESSION_SYSTEM: PICHIA PASTORIS;
SOURCE      7 EXPRESSION_SYSTEM_TAXID: 4922;
SOURCE      8 EXPRESSION_SYSTEM_STRAIN: KM71H (MUTS)
KEYWDS      PEPTIDASE, INHIBITOR, AMINOPEPTIDASE, GLYCOPROTEIN,
KEYWDS      2 HYDROLASE, MEMBRANE, PROTEASE, SECRETED, SERINE PROTEASE,
KEYWDS      3 SIGNAL-ANCHOR, TRANSMEMBRANE
EXPDTA      X-RAY DIFFRACTION
AUTHOR      H.NAR,F.HIMMELSBACH,M.ECKHARDT
REVDAT      3   24-FEB-09 2RGU    1          VERSN
REVDAT      2   08-JAN-08 2RGU    1          JRNL
REVDAT      1   06-NOV-07 2RGU    0
JRNL        AUTH    M.ECKHARDT,E.LANGKOPF,M.MARK,M.TADAYYON,L.THOMAS,
JRNL        AUTH 2  H.NAR,W.PFRENGLE,B.GUTH,R.LOTZ,P.SIEGER,H.FUCHS,
JRNL        AUTH 3  F.HIMMELSBACH
JRNL        TITL    8-(3-(R)-AMINOPIPERIDIN-1-YL)-7-BUT-2-YNYL-3-
JRNL        TITL 2  METHYL-1-(4-METHYL-QUINAZOLIN-2-YLMETHYL)-3,7-
JRNL        TITL 3  DIHYDROPURINE-2,6-DIONE (BI 1356), A HIGHLY
JRNL        TITL 4  POTENT, SELECTIVE, LONG-ACTING, AND ORALLY
JRNL        TITL 5  BIOAVAILABLE DPP-4 INHIBITOR FOR THE TREATMENT OF
JRNL        TITL 6  TYPE 2 DIABETES.
JRNL        REF    J.MED.CHEM.                                V.   50  6450 2007
JRNL        REFN                                ISSN 0022-2623
JRNL        PMID   18052023
JRNL        DOI    10.1021/JM701280Z
REMARK      1
REMARK      2
REMARK      2 RESOLUTION.      2.60 ANGSTROMS.
REMARK      3
REMARK      3 REFINEMENT.
REMARK      3 PROGRAM      : CNS
REMARK      3 AUTHORS      : BRUNGER,ADAMS,CLORE,DELANO,GROS,GROSSE-
REMARK      3              : KUNSTLEVE,JIANG,KUSZEWSKI,NILGES, PANNU,
REMARK      3              : READ,RICE,SIMONSON,WARREN
REMARK      3
REMARK      3 REFINEMENT TARGET : ENGH & HUBER
DBREF      2RGU A   39   766 UNP    P27487    DPP4_HUMAN      39   766
DBREF      2RGU B   39   766 UNP    P27487    DPP4_HUMAN      39   766
SEQADV     2RGU HIS A   767 UNP    P27487                                EXPRESSION TAG
SEQADV     2RGU HIS A   768 UNP    P27487                                EXPRESSION TAG
SEQADV     2RGU HIS A   769 UNP    P27487                                EXPRESSION TAG
SEQADV     2RGU HIS A   770 UNP    P27487                                EXPRESSION TAG
SEQADV     2RGU HIS A   771 UNP    P27487                                EXPRESSION TAG

```


HETATM12014	C26	356	A	901	44.776	50.918	33.543	1.00	42.83
C									
HETATM12015	N27	356	A	901	45.264	52.100	35.695	1.00	42.77
N									
HETATM12016	C28	356	A	901	54.625	49.551	35.788	1.00	42.05
C									
HETATM12017	C29	356	A	901	56.393	47.839	35.483	1.00	41.65
C									
HETATM12018	C30	356	A	901	56.037	49.236	35.561	1.00	42.88
C									
HETATM12019	C31	356	A	901	54.213	50.903	35.879	1.00	43.21
C									
HETATM12020	C32	356	A	901	57.826	47.398	35.261	1.00	40.39
C									
HETATM12021	C33	356	A	901	56.982	50.303	35.433	1.00	43.21
C									
HETATM12022	C34	356	A	901	55.158	51.918	35.752	1.00	45.76
C									
HETATM12023	C35	356	A	901	56.537	51.618	35.528	1.00	45.58
C									
CONNECT	2422	2514							
CONNECT	2514	2422							
CONNECT	2893	2973							
CONNECT	2973	2893							
CONNECT	3377	3397							
CONNECT	3397	3377							
CONNECT	3455	3614							
CONNECT	3614	3455							
CONNECT	5013	5931							
CONNECT	5931	5013							
CONNECT	8386	8478							
CONNECT	8478	8386							
CONNECT	8857	8937							
CONNECT	8937	8857							
CONNECT	9341	9361							
CONNECT	9361	9341							
CONNECT	9419	9578							
CONNECT	9578	9419							
CONNECT	10977	11895							
CONNECT	11895	10977							
CONNECT	11929	11930	11938	11941					
CONNECT	11930	11929	11931	11937					
CONNECT	11931	11930	11932	11939					
CONNECT	11932	11931	11933	11940					
CONNECT	11933	11932	11934	11941					
CONNECT	11934	11933	11942						
CONNECT	11935	11936	11937	11943					
CONNECT	11936	11935							
CONNECT	11937	11930	11935						
CONNECT	11938	11929							
CONNECT	11939	11931							
CONNECT	11940	11932							
CONNECT	11941	11929	11933						
CONNECT	11942	11934							
CONNECT	11943	11935							
CONNECT	11944	11945	11953	11956					
CONNECT	11945	11944	11946	11952					
CONNECT	11946	11945	11947	11954					
CONNECT	11947	11946	11948	11955					
CONNECT	11948	11947	11949	11956					
CONNECT	11949	11948	11957						

Annexe 2 : Format *gpf*.

```

npts 60 60 60 # num.grid points in xyz
gridfld 2RGUprot.maps.fld # grid_data_file
spacing 0.375 # spacing(A)
receptor_types A C HD N OA SA # receptor atom types
ligand_types A NA C OA N # ligand atom types
receptor 2RGUprot.pdbqt # macromolecule
gridcenter 51.301 49.151 36.186 # xyz-coordinates or auto
smooth 0.5 # store minimum energy w/in rad(A)
map 2RGUprot.A.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.NA.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.C.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.OA.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.N.map # atom-specific affinity map
elecmap 2RGUprot.e.map # electrostatic potential map
dsolvmap 2RGUprot.d.map # desolvation potential map
dielectric -0.1465 # <0, AD4 distance-dep.diel;>0,
constant

```

Annexe 3 : Format *dpf*.

```

autodock_parameter_version 4.2 # used by autodock to validate
parameter set
outlev 1 # diagnostic output level
intelec # calculate internal electrostatics
seed pid time # seeds for random generator
ligand_types A NA C OA N # atoms types in ligand
fld 2RGUprot.maps.fld # grid_data_file
map 2RGUprot.A.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.NA.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.C.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.OA.map # atom-specific affinity map
map 2RGUprot.N.map # atom-specific affinity map
elecmap 2RGUprot.e.map # electrostatics map
desolvmap 2RGUprot.d.map # desolvation map
move 2RGUlig.pdbqt # small molecule
about 50.7487 48.6345 35.377 # small molecule center
tran0 random # initial coordinates/A or random
axisangle0 random # initial orientation
dihe0 random # initial dihedrals (relative) or
random
tstep 2.0 # translation step/A
qstep 50.0 # quaternion step/deg
dstep 50.0 # torsion step/deg
torsdof 4 # torsional degrees of freedom
rmstol 2.0 # cluster_tolerance/A
extnrg 1000.0 # external grid energy
e0max 0.0 10000 # max initial energy; max number of
retries
ga_pop_size 150 # number of individuals in population
ga_num_evals 2500000 # maximum number of energy evaluations
ga_num_generations 27000 # maximum number of generations
ga_elitism 1 # number of top individuals to survive
to next generation
ga_mutation_rate 0.02 # rate of gene mutation
ga_crossover_rate 0.8 # rate of crossover
ga_window_size 10 #
ga_cauchy_alpha 0.0 # Alpha parameter of Cauchy
distribution
ga_cauchy_beta 1.0 # Beta parameter Cauchy distribution

```

```
set_ga # set the above parameters for GA or
LGA
sw_max_its 300 # iterations of Solis & Wets local
search
sw_max_succ 4 # consecutive successes before
changing rho
sw_max_fail 4 # consecutive failures before changing
rho
sw_rho 1.0 # size of local search space to sample
sw_lb_rho 0.01 # lower bound on rho
ls_search_freq 0.06 # probability of performing local
search on individual
set_pswl # set the above pseudo-Solis & Wets
parameters
unbound_model bound # state of unbound ligand
ga_run 10 # do this many hybrid GA-LS runs
analysis # perform a ranked cluster analysis
```

Résumés

Résumé

Le diabète de type 2 est une maladie très répandue dans le monde dont le nombre de personnes atteintes est en progression constante. Cette maladie demeure un problème de santé publique mondial engendrant, chaque année, près de quatre millions de décès dans le monde.

Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur le traitement du diabète de type 2 basé sur l'inhibition de la dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4). Cet enzyme sert à dégrader les hormones incrétines qui aident l'organisme à normaliser la glycémie en cas d'hyperglycémie. Dans ce travail, le programme AutoDock a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs potentiellement plus affins et plus sélectifs de la DPP4.

Par polysubstitution de l'inhibiteur 356, appelé linagliptine, en complexe avec la DPP4 sous le code PDB 2RGU, l'énergie d'interaction a pu être améliorée de -11.13 Kcal/Mole à -15.13 Kcal/Mole par l'introduction d'un groupement amine sur le carbone 26, d'un groupement méthyle sur le carbone 34 et le remplacement du méthyle 14 par le groupement éthylamine $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME du composé E4 issu de la polysubstitution qui se présente comme un inhibiteur théorique plus affin et plus sélectif de la DPP4.

L'approche *in silico* par AutoDock s'avère donc une méthode fiable pouvant contribuer de manière efficace au développement de nouveaux inhibiteurs d'une enzyme donnée.

Mots clés : AutoDock, Dipeptidyl-peptidase 4, Docking moléculaire, Inhibiteur, Energie d'interaction.

Abstract

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a severe and increasingly prevalent disease that is considered as a major global public health. It engenders about four millions death in the world.

In our research, we focus on type 2 diabetes treatments based on inhibition of Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4). This enzyme cleaves the incretin hormones which help organism to regulate glycemia only in the case of hyperglycemia. The molecular modeling program: AutoDock, is used to develop *in silico* new potent DPP4 inhibitors.

By poly-substitution of the inhibitor 356 in complex with DPP4 (PDB accession code: 2RGU), the binding energy was increased from -11.13Kcal/Mol to -15.13 Kcal/Mol, by the introduction of NH₂ on carbon 26, methyl on carbon 34 and finally, the replacement of methyl 14 by CH₂CH₂NH₃⁺. The application of Lipinski rule informs us in a positive way about ADME/Tox properties of this compound that is considered as a potent DPP4 inhibitor.

Key words: AutoDock, Binding energy, Dipeptidyl-peptidase 4, Molecular docking, inhibitor.

الملخص

يعتبر مرض السكري نوع 2 من أخطر الأمراض و أكثرها شيوعا مخلفا سنويا ما يقارب أربع ملايين ضحية في العالم. في عملنا هذا نركز على علاج هذا المرض عن طريق تثبيط إنزيم 4 PEPTIDASE DIPEPTIDYL. هذا الأخير يعمل على تهديم هرمونات الانكريتين التي تساعد الجسم على تنظيم مستوى السكر في الدم في حالة ارتفاعه.

استعملنا في هذا العمل برنامج AUTODOCK الذي ساعدنا على تطوير نماذج نظرية و أكثر فعالية لمثبطات إنزيم 4 DIPEPTIDYL PEPTIDASE.

بواسطة تغيير بعض جذور المثبط 356 المرتبط بالإنزيم DDP4 والمستخرج من البنك المعلوماتي للبروتين (PDB) تحت رمز RGU2، استطعنا تحسين طاقة الارتباط من -11.13 ك كال/مول إلى -15.13 ك كال/مول و هذا بإدخال وظيفة أمينية على الكربون 26، جذر ميثيل على الكربون 34 و تغيير جذر ميثيل 14 بالجذر $CH_2CH_2NH_3^+$. إن تطبيق قاعدة LIPINSKI على هذا المثبط يؤكد تميزه بخصائص ADME التي تمكنه من ممارسة نشاطه البيولوجي بصفة عادية .

طريقة DOCKING تعتبر من أفضل التقنيات المستعملة حاليا لتطوير و عرض مثبطات أكثر فعالية لأنزيم معين.

الكلمات المفتاحية:

AUTODOCK، أنزيم DDP4، طاقة الارتباط، مثبط

Nom : MOKRANI
Prénom : El-Hassen

Date de soutenance : 25/01/2012

Thème : Contribution à l'amélioration de l'activité biologique des inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase 4 dans le diabète de type 2 par simulation informatique.

Résumé :

Le diabète de type 2 est une maladie très répandue dans le monde dont le nombre de personnes atteintes est en progression constante. Cette maladie demeure un problème de santé publique mondial engendrant, chaque année, près de quatre millions de décès dans le monde. Dans notre travail, nous nous sommes focalisés sur le traitement du diabète de type 2 basé sur l'inhibition de la dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4). Cet enzyme sert à dégrader les hormones incrétines qui aident l'organisme à normaliser la glycémie en cas d'hyperglycémie. Dans ce travail, le programme AutoDock a été utilisé pour développer *in silico* de nouveaux inhibiteurs potentiellement plus affins et plus sélectifs de la DPP4. Par polysubstitution de l'inhibiteur 356, appelé linagliptine, en complexe avec la DPP4 sous le code PDB 2RGU, l'énergie d'interaction a pu être améliorée de -11.13 Kcal/Mole à -15.13 Kcal/Mole par l'introduction d'un groupement amine sur le carbone 26, d'un groupement méthyle sur le carbone 34 et le remplacement du méthyle 14 par le groupement éthylamine $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$. Enfin, l'application de la règle de Lipinski nous renseigne de manière positive sur les propriétés ADME du composé E4 issu de la polysubstitution qui se présente comme un inhibiteur théorique plus affiné et plus sélectif de la DPP4. L'approche *in silico* par AutoDock s'avère donc une méthode fiable pouvant contribuer de manière efficace au développement de nouveaux inhibiteurs d'une enzyme donnée.

Mots clés: AutoDock, Dipeptidyl-peptidase 4, Docking moléculaire, Inhibiteur, Energie d'interaction.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie appliquée et Santé.

Président :	Mr. HAMIDECHI M A.	M.C.A. Université Mentouri Constantine.
Rapporteur :	Mr. BENSEGUENI A.	M.C.A. Université Mentouri Constantine.
Examineurs :	Mr. CHIKHI A.	M.C.A. Université Mentouri Constantine.
	Mr. BOUDAH A.	M.C.A. Université Mentouri Constantine.