

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعيدة ، الدكتور مولاي الطاهر

Université Dr. Moulay Tahar, Saida



N° d'ordre

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم البيولوجيا

Département de biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

Analyse du potentiel anti-inflammatoire de composés flavonoïdes par docking moléculaire :

Identification des interactions avec les cibles biologiques

Présenté par :

Fellah Kada et Mankour Abdelkader

Soutenu le : 18/06/2025

Devant le juré composé de :

Président : Pr. ADLI.D.E.H

Examinatrice : Dr. ARABI.W

Examinatrice : SIDI IKLEF.A

Rapporteur : Pr. SLIMANI.M

Année universitaire 2024-2025

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Dieu, le Tout-Puissant et Miséricordieux, pour la force, la persévérance et le courage qu'il m'a accordés tout au long de mon parcours académique, en particulier durant l'élaboration de ce travail.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à mon directeur de mémoire, Monsieur Slímaní, Professeur de biologie à l'université de Saïda, pour son encadrement bienveillant, sa disponibilité et la pertinence de ses conseils, qui ont grandement enrichi ce travail.

Je remercie également les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce mémoire.

Ma gratitude s'étend à tous les enseignants, intervenants et collaborateurs, dont les enseignements, les écrits, les remarques et les échanges ont nourri mes réflexions et m'ont guidé durant mes années d'études.

Je tiens à remercier profondément ma famille pour son soutien inconditionnel, ses encouragements constants et les sacrifices consentis tout au long de ce parcours.

Enfin, j'exprime toute ma reconnaissance à toutes les personnes, connues ou anonymes, qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Dedication

To my dear parents

For your unconditional love, sacrifices and constant encouragement.

You are the foundation of all my successes.

To my binôme,

Thank you for your collaboration, patience, and support throughout this journey. This work would not have been the same without our teamwork.

To myself,

For the perseverance, sleepless nights and belief that every step forward no matter how small brings growth.

With gratitude and pride,

This work is dedicated to you all

RESUME :

Le docking moléculaire, une méthode computationnelle importante en découverte de médicaments pour prédire l'affinité et le mode de liaison des molécules, a été appliqué dans notre étude afin d'évaluer le potentiel inhibiteur d'une série de neuf flavonoïdes naturels sur la cyclooxygénase-2 (COX-2), une cible thérapeutique clé de l'inflammation. L'objectif principal était d'identifier des composés d'origine naturelle susceptibles d'offrir une alternative plus sûre aux AINS classiques. Nos résultats ont révélé que plusieurs flavonoïdes, en particulier la myricétine, la quercétine et la fisétine, présentent une affinité de liaison modérée à prometteuse pour la COX-2, avec des scores d'interaction comparables à celui de l'acide méfénamique. L'analyse du mode de liaison a montré que, contrairement à l'acide méfénamique qui interagit directement avec les résidus catalytiques TYR385 et SER530, les flavonoïdes privilégient des interactions avec des résidus périphériques tels qu'ARG44, GLN42 et GLU465, suggérant un mécanisme d'inhibition potentiellement non compétitif. L'analyse préliminaire des relations structure-activité (RSA) indique que la présence d'un nombre élevé de groupements hydroxyle sur le noyau flavonoïde, ainsi que leur positionnement stratégique pour former des liaisons hydrogène avec des résidus clés du site de liaison, semble favoriser une meilleure affinité pour la COX-2. Ces observations suggèrent que des modifications structurales ciblant l'augmentation du nombre de groupes hydroxyle et leur positionnement pourraient conduire à des inhibiteurs plus puissants. Cette étude *in silico* ouvre des perspectives pour la poursuite des recherches sur le potentiel thérapeutique des flavonoïdes comme inhibiteurs de la COX-2 et de leurs caractéristiques structurales dans la détermination de leur affinité.

Mots clés : 5IKR, Acide méfénamique, Anti-inflammatoire, Apigénine, Chrysine, Cyclooxygénase-2 (COX-2), Docking moléculaire, Fisétin, Flavonoïdes, Galangine, Kaempférol, Lutéoline, Myricétine, Naringénine, Quercétine.

ABSTRACT:

Molecular docking, an important computational method in drug discovery for predicting the binding affinity and mode of molecules, was applied in our study to evaluate the inhibitory potential of a series of nine natural flavonoids on cyclooxygenase-2 (COX-2), a key therapeutic target for inflammation. The main objective was to identify naturally occurring compounds likely to offer a safer alternative to conventional NSAIDs. Our results revealed that several flavonoids, particularly myricetin, quercetin, and fisetin, exhibit moderate to promising binding affinity for COX-2, with interaction scores comparable to that of mefenamic acid. Binding mode analysis showed that, unlike mefenamic acid which directly interacts with catalytic residues TYR385 and SER530, flavonoids favor interactions with peripheral residues such as ARG44, GLN42, and GLU465, suggesting a potentially non-competitive inhibition mechanism. Preliminary structure-activity relationship (SAR) analysis indicates that the presence of a high number of hydroxyl groups on the flavonoid backbone, as well as their strategic positioning to form hydrogen bonds with key residues in the binding site, appears to favor better affinity for COX-2. These observations suggest that structural modifications targeting an increase in the number of hydroxyl groups and their positioning could lead to more potent inhibitors. This in silico study opens perspectives for further research on the therapeutic potential of flavonoids as COX-2 inhibitors and their structural characteristics in determining their affinity.

Keywords: 5IKR, Anti-inflammatory, Apigenin, Chrysin, Cyclooxygenase-2 (COX-2), Fisetin, Flavonoids, Galangin, Kaempferol, Luteolin, Mefenamic acid, Molecular docking, Myricetin, Naringenin, Quercetin,

.

ملخص :

الإرساء الجزيئي، طريقة حاسوبية مهمة في اكتشاف الأدوية للتنبؤ بالألفة ونمط ارتباط الجزيئات، تم تطبيقه في دراستنا من أجل تقييم القدرة التثبيطية لسلسلة من تسعة فلافونويدات طبيعية على السيكلوأوكسجيناز-2 (COX-2)، الذي هو هدف علاجي رئيسي للالتهاب. الهدف الرئيسي كان تحديد مركبات ذات أصل طبيعي من المحتمل أن تقدم بديلاً أكثر أماناً لمضادات الالتهاب غير الستيرويدية الكلاسيكية. نتائجنا كشفت أن عدة فلافونويدات، بشكل خاص الميريسيتين، الكيرسيتين والفيسيتين، تُظهر ألفة ارتباط متوسطة إلى واعدة لـ COX-2، مع نتائج تفاعل قابلة للمقارنة بتلك الخاصة بحمض الميفيناميك. تحليل نمط الارتباط أظهر أنه، على عكس حمض الميفيناميك الذي يتفاعل مباشرة مع البقايا التحفيزية TYR385 و SER530، الفلافونويدات تفضل تفاعلات مع بقايا محيطية مثل ARG44، GLN42 و GLU465، مما يقترح آلية تثبيط محتملة غير تنافسية. التحليل الأولي للعلاقات بنية-فعالية (RSA) يشير إلى أن وجود عدد مرتفع من مجموعات الهيدروكسيل على نواة الفلافونويد، وكذلك تموضعها الاستراتيجي لتكوين روابط هيدروجينية مع بقايا رئيسية لموقع الارتباط، يبدو أنه يعزز ألفة أفضل لـ COX-2 هذه الملاحظات تقترح أن تعديلات بنيوية تستهدف زيادة عدد مجموعات الهيدروكسيل وتموضعها يمكن أن تؤدي إلى مثبطات أكثر قوة. هذه الدراسة " في الحاسوب " تفتح آفاقاً لمتابعة الأبحاث حول الإمكانية العلاجية للفلافونويدات كمثبطات لـ COX-2 وخصائصها البنيوية في تحديد ألفتها.

كلمات مفتاحية: 5IKR، أبيجينين، إرساء جزيئي، فيستين، فلافونويدات، جالانجين، حمض الميفيناميك، كامبفيرول، كريسين، كيرسيتين، سيكلوأوكسجيناز-2، لوتولين، ميريسيتين، مضاد للالتهابات، نارينجينين.

SOMMAIRE :

REMERCIEMENT

DEDICACE

RESUME

ABSTRACT

ملخص

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION	1
1PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1.1 ENZYME COX-2 ET SON ROLE DANS L'INFLAMMATION	3
1.1.1 INTRODUCTION À L'INFLAMMATION	3
1.1.2 LES CAUSES DE L'INFLAMMATION	3
1.1.3 LES TYPES DE L'INFLAMMATION	4
1.1.4 LES MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION	5
1.1.5 LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION	9
1.1.6 ROLE DE LA CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) DANS L'INFLAMMATION	10
1.2 STRUCTURE ET FONCTION DE COX-2	11
1.2.1 DIFFERENCES ENTRE COX-1 ET COX-2 : COMPARAISON STRUCTURALE	11
1.2.2 ROLES PHYSIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS PATHOLOG	13
1.2.3 CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES ISOENZYMES : COX1 ET COX 2	14
1.3 ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIENS	16
1.3.1 CLASSIFICATION DES AINS	16
1.3.2 LES AINS NON SELECTIFS	18
1.3.3 LES AINS SELECTIFS COX-2 (COXIBS)	19
1.4 FLAVONOÏDES ET LEUR POTENTIEL ANTI-INFLAMMATOIRE	21
1.4.1 CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES	21
1.4.2 SOUS-CLASSES PRINCIPALES DE FLAVONOÏDES	22
1.4.3 BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES	28
1.4.4 MECANISMES ANTI-INFLAMMATOIRES DES FLAVONOÏDES	31

1.5 LE DOCKING MOLECULAIRE	33
1.5.1 LES ETAPES DU DOCKING MOLECULAIRE	33
1.5.2 LES FONCTIONS DE SCORING	35
1.5.3 NATURE DES FORCES INTERACTIONS	36
1.5.4 ENERGIE LIBRE DE LIAISON	40
1.5.5 LES LOGICIELS DE DOCKING	41
2 MATERIEL ET METHODES	42
2.1 CHOIX DU MODELE PROTEIQUE POUR LE DOCKING MOLECULAIRE	42
2.2 LIGANDS CO-CRISTALLISES	44
2.3 DOCKING MOLÉCULAIRE AVEC MOE (MOLECULAR OPERATING ENVIRONMENT)	45
2.4 LES ETAPES DU DOCKING MOLECULAIRE	47
3 RÉSULTATS ET DISCUSSION	63
3.1 STRUCTURE DE LA CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) HUMAINE (PDB ID 5IKR)	63
3.2 DIAGRAMME DE RAMACHANDRAN DE LA 5IKR (CHAINE A) : ANALYSE CONFORMATIONNELLE	66
3.3 CARTOGRAPHIE DU SITE DE LIAISON DE L'ACIDE MEFANAMIQUE DANS LA 5IKR.	69
3.4 ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE L'ACIDE MEFANAMIQUE (LIGAND CO-CRISTALLISE) ET LA CHAINE A DE LA COX-2 (PDB : 5IKR)	71
3.5 ANALYSE DES INTERACTIONS DES FLAVONOÏDES AVEC LA CHAINE A DE LA COX-2 (PDB : 5IKR)	74
3.6 DISCUSSION GENERALE	88
CONCLUSION	90

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Médiateurs solubles impliqués dans l'inflammation	8
Tableau 2 - Exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavones	23
Tableau 3 : Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavonols	24
Tableau 4 : Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavanones	25
Tableau5 : Molécules appartenant à la sous-classe des flavanols	26
Tableau 6 : Molécules appartenant à la sous-classe des isoflavonoïdes	27
Tableau 7 : caractéristiques des deux entités (5IKR_IDB_A_601 et 5IKR_IDB_B_602)	45
Tableau 8 : Classification structurale des flavonoïdes	57
Tableau9 : structures bidimensionnelles SMILES des molécules	60
.	
Tableau10 : composition des chaînes bêta de la chaîne A de la 5IKR	64
Tableau11 : composition des hélices alpha de la chaîne A de la 5IKR.	65
Tableau12 : Analyse des résultats de docking moléculaire sur la COX-2 (5IKR)	75

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Les étapes de la réaction inflammatoire aiguë.	5
Figure 2 : Représentation schématique des différences structurales entre les canaux de liaison au substrat de la cyclooxygénase (COX)-1 et de la COX-2.	12
Figure 3 : Cascade de l'acide arachidonique.	15
Figure 4 : les valeurs des CI50 des cox1 et cox2.	18
Figure 5 : Structure générale des COXIBS.	19
Figure 6 : structure de base des flavonoides.	21
Figure 7 : Structures générales des principaux flavonoïdes (A) et des groupes mineurs (B).	22
Figure8 : Structure chimique des flavones.	23
Figure 9 : Structure chimique des flavonols.	24
Figure 10 : Structure chimique des flavanones.	25
Figure 11 : Structure chimique des flavanols.	26
Figure 12 : Structure chimique des isoflavonoïdes.	27
Figure 13 : Structure chimique des anthocyanidines.	27
Figure14 : Voies de biosynthèse des flavonoides.	30
Figure15 : les différentes étapes du docking moléculaire	34
Figure 16 : représentation schématique de de l'interaction électrostatique entre le groupe amino de la lysine et la fonction carboxylique de l'acide aspartique	36
Figure 17 : Interaction hydrophobe protéine-ligand.	37
Figure 18 : Intérction de Van der waals.	38
Figure 19 : Liaison d'hydrogène.	38
Figure 20 : L'interaction cation- π , montrant une charge positive générique interagissant avec le benzène (les hydrogènes sont bleus, les carbones rouges).	39
Figure21: L'acide méfénamique	44
Figure 22 : Structure 3D de la protéine cible cox 2 (code 5IKR)	49

Figure 23 : Les sous unités de la cox 2 (code 5IKR)	49
Figure 24: La sous unité A de la 5 IKR	50
Figure 25: Structure de la sous unité A de la 5 IKR co cristallisée avec acide méfénamique (IBR)	50
Figure 26: Localisation de Acide méfénamique dans la sous unité A de la 5IKR	51
Figure 27: Structure 2D de l'acide méfénamique	51
Figure28: les interaction entre le site active et l'acide méfénamique	52
Figure29 : resultat de l'application de Site Finder, localisation de site de liaison de la protéine.	55
Figure 30: Structure de la sous unité A de la 5IKR préparée pour le docking	56
Figure31: structures des Flavones	58
Figure32: structures des Flavanones	58
Figure33: structures des Flavonols	59
Figure34 : représentation de la composition de la structure primaire de la chaîne A de la5IKR	63
Figure35 : représentation des différents types de structure secondaire de la chaîneAde la 5IKR	64
Figure36 : représentation du diagramme de Ramachandran de la chaîne A de la 5IKR	67
Figure37: Cartographie maps du site de fixation du ligand co cristallisé avec 5IKR, acide mefanamique montrant la pochette de docking	70
Figure38 : Représentation des interactions de l'acide mefanamique (ligand co-cristallisé) avec le site actif de la chaîne A de la COX-2 (PDB : 5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	71
Figure39: Le ligand co-cristallisé (ID8) (- 2-[(2,3-Dimethylphenyl) amino] benzoic acid: Mefenamic acid) visualisé via LigPlot	73
Figure40 : Représentation de l'interaction entre la myricétine et la Chaîne A de la COX-2(PDB : 5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	77
Figure41 : Interaction entre la myrecétine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	78
Figure42 : Interaction entre la quercétine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) :visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	79

Figure43 : Interaction entre la NARINGENINE et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	80
Figure44 : Interaction entre la Fisetin et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	82
Figure45 : Interaction entre l'apigenine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	83
Figure46 : Interaction entre la luteonine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite).	84
Figure47 : Interaction entre la chrysin et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)	86

LISTE DES ABREVIATION :

Abréviation	Signification
AINS	Anti-Inflammatoires Non Stéroïdiens
AA	Acide Arachidonique
AP-1	Activator Protein-1 (facteur de transcription)
CHI	Chalcone Isomérase
CHS	Chalcone Synthase
COX	Cyclooxygénase (COX-1, COX-2)
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2
CRP	C-Reactive Protein (Protéine C-réactive)
DFR	Dihydroflavonol Réductase
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase (Kinase régulée par les signaux extracellulaires)
FLS	Flavonol Synthase
FNS	Flavone Synthase
GI	Gastro-Intestinal
IC50	Concentration inhibitrice 50%
IL	Interleukine
IL-1 β	Interleukine 1 bêta
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LOX	Lipoxygénase
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
NF- κ B	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Monoxyde d'azote
PAL	Phénylalanine Ammonia-Lyase

PCT	Procalcitonine
PG	Prostaglandine
PGD ₂ , PGE ₂ , PGF ₂ α	Types de prostaglandines
PGH ₂	Prostaglandine H ₂
PGG ₂	Prostaglandine G ₂
PLA2	Phospholipase A2
PTGS	Prostaglandine-Endoperoxyde Synthase
SAR	Structure-Activity Relationship (Relation Structure-Activité)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
TXA ₂	Thromboxane A ₂
VS	Vitesse de Sédimentation des Érythrocytes

INTRODUCTION :

L'inflammation, un processus biologique complexe et essentiel à la défense de l'organisme, joue un rôle ambivalent. Bien que cruciale pour la réparation tissulaire et la lutte contre les agents pathogènes, une inflammation chronique ou excessive peut contribuer à de nombreuses pathologies, telles que l'arthrite, les maladies cardiovasculaires et le cancer (Medzhitov, 2008). Dans la réponse inflammatoire se trouvent les cyclooxygénases (COX), enzymes clés dans la synthèse des prostaglandines, médiateurs lipidiques impliqués dans la douleur, la fièvre et l'inflammation (Smith et al., 2000).

Les isoenzymes COX-1 et COX-2 présentent des caractéristiques distinctes. La COX-1, constitutive, assure des fonctions physiologiques essentielles, tandis que la COX-2, inducible, est principalement impliquée dans l'inflammation pathologique. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), largement utilisés pour soulager la douleur et l'inflammation, agissent en inhibant ces enzymes. Leur mécanisme d'action principal repose sur le blocage de l'activité des COX, empêchant ainsi la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines (FitzGerald et Patrono, 2001). Les AINS exercent ainsi des effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Cependant, l'inhibition non sélective des COX par les AINS traditionnels peut entraîner des effets secondaires indésirables, notamment des troubles gastro-intestinaux dus à l'inhibition de la COX-1, et des risques cardiovasculaires potentiellement liés à l'inhibition de la COX-2 (4). Des études ont conduit au développement d'inhibiteurs sélectifs de la COX-2, les coxibs, visant à minimiser les effets secondaires gastro-intestinaux. Néanmoins, des préoccupations concernant les risques cardiovasculaires associés aux coxibs ont également été soulevées (Grosser et al., 2006). Face à ces limitations, la recherche de nouvelles molécules anti-inflammatoires plus efficaces est primordiale. Les flavonoïdes, une vaste famille de composés phytochimiques présents dans les plantes, ont suscité un intérêt croissant en raison de leurs diverses activités biologiques, y compris leurs propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes (Middleton et al., 2000 ; Calderon-Montano et al., 2011). Ces composés naturels, abondamment présents dans les fruits, les légumes et les plantes médicinales, se distinguent par leur capacité à moduler de multiples voies de signalisation impliquées dans l'inflammation et le stress oxydatif. Les flavonoïdes attirent particulièrement l'attention. Ces polyphénols hydroxylés, présents en abondance dans les fruits, légumes, céréales, noix, herbes et fleurs, suscitent un intérêt croissant en raison de leurs multiples bienfaits médicaux, incluant des effets antioxydants, anticancéreux, antimicrobiens, neuroprotecteurs et anti-inflammatoires.

Dans cette étude, la partie bibliographique porte sur différents axes en étroite relation avec la thématique développée, à savoir : le processus inflammatoire, les caractéristiques des COX-1 et COX-2, la classification et le mode d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ainsi que la classification et les propriétés biologiques des flavonoïdes. La partie expérimentale porte sur l'évaluation du potentiel anti-inflammatoire des flavonoïdes à l'aide d'approches de criblage virtuel et de docking moléculaire, visant à identifier les composés présentant la meilleure affinité pour la COX-2. Le docking moléculaire est une approche de modélisation informatique permettant de prédire l'interaction entre une molécule et sa cible biologique. Son intérêt réside dans sa capacité à anticiper l'affinité et le mode de fixation d'un ligand à son site actif, facilitant ainsi l'identification de molécules candidates potentiellement actives.

1 PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE:

1.1 ENZYME COX-2 ET SON ROLE DANS L'INFLAMMATION :

1.1.1 INTRODUCTION À L'INFLAMMATION :

L'inflammation est une réponse biologique complexe du système immunitaire à des stimuli nocifs, tels que des agents pathogènes, des cellules endommagées ou des irritants. Bien qu'essentielle pour la protection de l'hôte, une inflammation chronique ou dérégulée contribue à la pathogenèse de nombreuses maladies, incluant les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, auto-immunes et le cancer (Nathan et Ding, 2010).

Le processus inflammatoire implique une cascade d'événements moléculaires et cellulaires visant à éliminer l'agent pathogène, réparer les tissus endommagés et restaurer l'homéostasie. L'inflammation aiguë est généralement bénéfique et auto-limitante. Cependant, une inflammation chronique persistante est à l'origine de nombreuses pathologies (Medzhitov, 2008).

1.1.2 LES CAUSES DE L'INFLAMMATION :

L'inflammation peut résulter de diverses causes, tant internes qu'externes, qui induisent une réponse immunitaire, on distingue :

-Agents infectieux : La contamination par des micro-organismes pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites) est une cause majeure d'inflammation, généralement accompagnée de symptômes tels que douleur, rougeur et gonflement (Roe, 2021).

-Agents physiques : Les traumatismes physiques (coupures, fractures), les expositions à des extrêmes de température (chaleur ou froid) et les radiations peuvent endommager les tissus et induire une réaction inflammatoire (Hawiger et Zienkiewicz, 2019).

-Agents chimiques : L'exposition à des substances caustiques, des toxines ou des venins, qu'ils soient d'origine animale, végétale ou industrielle, peut entraîner une inflammation localisée ou systémique en fonction de la nature de l'agent en question (Hnewa et Hassan, 2023).

-Défaut de vascularisation : La nécrose tissulaire secondaire à une ischémie (manque d'irrigation sanguine) provoque une inflammation, souvent associée à des symptômes de douleur et de perte de fonction dans les tissus privés d'oxygène (Vidale et al., 2017).

-Agression dysimmunitaire : Des anomalies du système immunitaire, telles que celles observées dans les allergies et les maladies auto-immunes, entraînent une activation excessive de la réponse inflammatoire, avec des manifestations cliniques variées (Roe, 2021).

1.1.3 LES TYPES DE L'INFLAMMATION

1.1.3.1 L'INFLAMMATION AIGÜE

L'inflammation aiguë est une réponse physiologique rapide et de courte durée, généralement observée en réponse à un traumatisme ou une infection. Elle se caractérise par des phénomènes vasculaires et cellulaires dynamiques, déclenchés par des médiateurs chimiques. Cette forme d'inflammation, qui dure de quelques minutes à plusieurs jours, se manifeste par une série de signes cliniques caractéristiques, tels que la tuméfaction, l'érythème, la douleur (algie), l'hyperthermie et la perte de fonction du tissu affecté (Arulselvan, 2016).

Les étapes de l'inflammation aiguë sont :

Augmentation du débit sanguin local : Cette phase initiale est marquée par une vasodilatation et une augmentation du flux sanguin vers la zone lésée. **(Figure1)**

Vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire : Cela permet le passage de protéines plasmatiques et de cellules immunitaires dans l'espace extravasculaire, où elles jouent un rôle clé dans la défense de l'organisme.

Migration des leucocytes phagocytaires : Les leucocytes, tels que les neutrophiles et les macrophages, migrent vers le site de l'inflammation pour éliminer les agents pathogènes et les débris cellulaires, contribuant ainsi à la résolution de la réponse inflammatoire.

Ces processus sont régulés par une variété de médiateurs chimiques, tels que les prostaglandines, les leucotriènes, les cytokines et les chimiokines, qui orchestrent les différentes étapes de l'inflammation aiguë (Arulselvan, 2016).

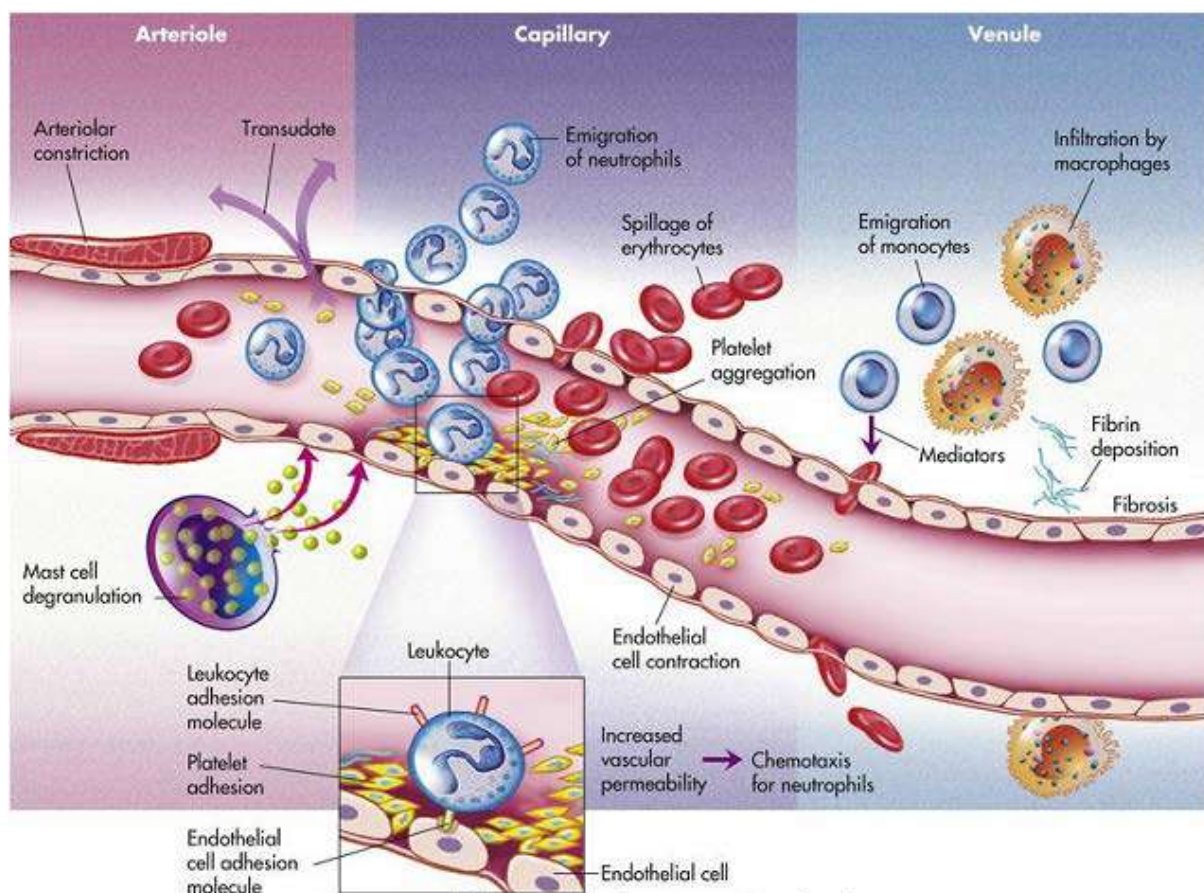


Figure 1 : Les étapes de la réaction inflammatoire aiguë (Ibsen et Phelan, 2018).

1.1.3.2 L'INFLAMMATION CHRONIQUE

C'est également désigner comme une inflammation lente et à long terme, qui dure de plusieurs mois à plusieurs années. En général, l'étendue et les effets de l'inflammation chronique varient selon la cause de la blessure et la capacité de l'organisme à réparer et à surmonter les dommages. Cette activité passe en revue la pathophysiologie de l'inflammation chronique. (Cheima et al ; Pahwa et al., 2021),

1.1.4 LES MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION :

Les médiateurs de l'inflammation sont des molécules bioactives qui orchestrent les réponses vasculaires, cellulaires et systémiques observées lors du processus inflammatoire. Ils peuvent être classés selon leur origine cellulaire (**Tableau 1**), lorsqu'ils sont soit préformés dans des granules intracellulaires soit synthétisés de novo en réponse à une stimulation, ou plasmatique, lorsqu'ils dérivent de protéines circulantes activées par des cascades enzymatiques (systèmes du complément, des kinines et de la coagulation). (Kumar et al., 2021).

1.1.4.1 AMINES VASOACTIVES

Parmi les premiers médiateurs libérés lors de l'inflammation aiguë, les amines vasoactives, notamment l'histamine, jouent un rôle central. Cette dernière est principalement stockée sous

forme préformée dans les granules des mastocytes, des basophiles et des plaquettes. Sa libération est induite par divers stimuli tels que des lésions mécaniques, une stimulation immunologique via les IgE, ou encore par des fragments du complément (C3a, C5a). L'histamine agit rapidement sur les vaisseaux en induisant une vasodilatation des artérioles et en augmentant de manière transitoire la perméabilité des veinules post-capillaires, facilitant ainsi l'exsudation du plasma (Kumar et al., 2021).

1.1.4.2 MÉDIATEURS LIPIDIQUES DERIVES DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE :

Les métabolites de l'acide arachidonique (AA) représentent une autre classe majeure de médiateurs lipidiques de l'inflammation. L'AA, un acide gras polyinsaturé à 20 carbones, est libéré des phospholipides membranaires par l'action des phospholipases A₂. Il est ensuite métabolisé par deux grandes voies enzymatiques : la cyclooxygénase (COX) et la lipoxygénase (LOX), donnant naissance à des eicosanoïdes aux fonctions biologiques variées.

-Voie de la cyclooxygénase (COX-1 et COX-2) :

Cette voie aboutit à la synthèse des prostaglandines (PGE₂, PGD₂, PGI₂) et du thromboxane A₂ (TXA₂).

-Les prostaglandines, produites principalement via l'induction de COX-2 lors de l'inflammation, sont responsables de la vasodilatation, de la sensibilisation des terminaisons nociceptives (douleur) et de l'élévation de la température corporelle (fièvre).

-Le TXA₂, produit plutôt par COX-1, agit comme un vasoconstricteur puissant et un agent pro-agrégant plaquettaire (Ricciotti et FitzGerald, 2011).

-Voie de la lipoxygénase (LOX) :

Cette voie conduit à la production de leucotriènes (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) et de lipoxines.

-Le LTB₄ est un puissant chimiotactique pour les neutrophiles, favorisant leur recrutement au site inflammatoire.

-Les leucotriènes cystéinylés (LTC₄, LTD₄, LTE₄) exercent des effets bronchoconstricteurs, vasoconstricteurs, et augmentent la perméabilité vasculaire, contribuant ainsi aux symptômes inflammatoires, notamment dans l'asthme et les réactions allergiques (Serhan, 2014 ; Kumar et al., 2021).

-Les lipoxines jouent un rôle anti-inflammatoire en favorisant la résolution du processus inflammatoire, soulignant ainsi la dualité des médiateurs lipidiques dans la dynamique inflammation/résolution. (Serhan, 2014 ; Kumar et al., 2021).

1.1.4.3 CYTOKINES ET CHIMIOKINES :

Les cytokines sont des protéines de faible poids moléculaire sécrétées principalement en réponse à divers stimuli inflammatoires. Elles jouent un rôle clé et pléiotrope dans la coordination de la réponse immunitaire et inflammatoire.

Parmi les principales cytokines pro-inflammatoires, le TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) et l'IL-1 β (Interleukine-1 bêta) exercent des fonctions similaires en induisant l'activation de

l'endothélium vasculaire, notamment par l'expression accrue de molécules d'adhésion cellulaire (ICAM-1, VCAM-1, E-selectine), favorisant le recrutement des leucocytes. Ces cytokines stimulent également la production d'autres médiateurs inflammatoires, tels que les prostaglandines via l'induction de COX-2, et participent à la genèse de la fièvre et à la synthèse des protéines de phase aiguë par le foie. À fortes concentrations, elles peuvent déclencher des phénomènes systémiques sévères comme la cachexie, l'apoptose cellulaire ou encore le choc septique (Dinarello, 2010 ; Turner et al., 2014 ; Schett et al., 2016).

L'interleukine-6 (IL-6), également produite lors de l'inflammation aiguë, est le principal inducteur de la synthèse hépatique des protéines de phase aiguë, notamment la CRP (C-reactive protein) et le fibrinogène. Elle joue aussi un rôle important dans la différenciation des lymphocytes B et T, modulant ainsi l'immunité adaptative (Tanaka et al., 2014).

Les chimiokines, telles qu'IL-8/CXCL8, constituent une sous-famille de cytokines spécialisées dans l'attraction des leucocytes. Elles dirigent le recrutement cellulaire vers le foyer inflammatoire en établissant un gradient de chimiotaxie, essentiel à l'amplification et à la localisation de la réponse inflammatoire (Turner et al., 2014).

1.1.4.4 SYSTÈME DU COMPLÉMENT :

Le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques circulantes qui s'activent en cascade en réponse à la présence de pathogènes ou de complexes immuns. Il constitue un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

Parmi les produits de cette activation, les fragments C3a et C5a, appelés anaphylatoxines, sont des médiateurs puissants de l'inflammation. Ils induisent la dégranulation des mastocytes avec libération d'histamine, favorisant ainsi une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le C5a est en outre un puissant agent chimiotactique qui attire les neutrophiles et les monocytes vers le site d'infection. Le fragment C3b, quant à lui, joue un rôle d'opsonine, facilitant la phagocytose des pathogènes en les marquant pour reconnaissance par les phagocytes (Ricklin et al., 2010).

1.1.4.5 SYSTEMES PLASMATIQUES : SYSTEME DES KININES :

Le système des kinines est une autre cascade enzymatique plasmatique activée par le facteur Hageman (facteur XII). Il conduit à la production de bradykinine, un médiateur vasoactif aux effets puissants.

La bradykinine provoque une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire, ainsi qu'une stimulation directe des terminaisons nerveuses sensibles, ce qui en fait un des principaux médiateurs de la douleur inflammatoire (**Tableau 1**). Elle intervient également dans les phénomènes d'œdème et contribue à l'amplification de la réponse inflammatoire locale (Kumar et al., 2021).

Tableau 1 : Médiateurs solubles impliqués dans l'inflammation (Margerie, 1986 ; Engeler,1996 ; James et al., 2004 ; Cavaillon, 2005 ; Sanchez-Munoz et al., 2008 ; Narimiya et al.,2016 ; Hazhazi et al 2020).

Médiateurs	Source	Fonction
Cytokines (IL-1β, TNF-α, IL-6, MCP1, chémokines)	Macrophages, fibroblastes, cellules endothéliales, monocytes, mastocytes, cellules épithéliales, hépatocytes, neutrophiles	Régulation de l'inflammation et chimiotactisme
Histamine et PAF	Mastocytes et plaquettes	Augmentation de la perméabilité vasculaire et attraction des leucocytes
Fragments du complément actif	Capillaires et tissus lésés	Activation du facteur de Hageman et amplification de la réponse inflammatoire
Kinines, fibrinogènes	Exsudat du plasma	Augmentation de la perméabilité vasculaire, contraction des muscles lisses et recrutement des leucocytes
Bradykinine, fibrinopeptide	Systèmes kinines et fibrinogènes plasmatiques	Agrégation plaquettaire via des récepteurs membranaires spécifiques
Eicosanoïdes (Prostaglandines PGE2, Leucotriènes LTB, C, D, Thromboxanes TXA2)	Cellules endothéliales vasculaires, neutrophiles, macrophages, cellules endommagées	Vasodilatation, sensibilisation à la douleur, régulation de la température, agrégation plaquettaire et modulation de la perméabilité vasculaire
Radicaux libres	Polynucléaires, monocytes macrophages, cellules endothéliales, fibroblastes	Oxydation des acides aminés et altération des protéines, peroxydation des lipides membranaires, augmentation de la perméabilité cellulaire
Cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF-β, IL-13)	Monocytes, macrophages activés	Inhibition des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α), stimulation de la production d'antagonistes des récepteurs IL et TNF

1.1.5 LES MARQUEURS DE L'INFLAMMATION :

Les marqueurs de l'inflammation sont des biomolécules dont les concentrations plasmatiques varient de manière significative au cours d'une réponse inflammatoire. Leur dosage permet une évaluation indirecte de l'intensité et de la nature du processus inflammatoire, qu'il soit aigu ou chronique. Ils reflètent souvent l'activation des médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines, notamment l'interleukine-6 (IL-6), ainsi que l'activation des systèmes de défense immunitaire innée. (Sproston et Ashworth, 2018).

1.1.5.1 Protéine C-Réactive (CRP) :

La CRP est une protéine pentamérique de phase aiguë synthétisée principalement par les hépatocytes, sous l'influence de l'IL-6. Elle constitue un marqueur très sensible mais non spécifique de l'inflammation, de l'infection bactérienne et des lésions tissulaires. Son taux sérique peut s'élever précocement (dans les 6 heures) après le déclenchement de la réaction inflammatoire, atteignant un pic en 24 à 48 heures (Sproston et Ashworth, 2018). Elle joue également un rôle fonctionnel dans l'opsonisation et l'activation du complément.

1.1.5.2 Vitesse de Sédimentation des Érythrocytes (VS) :

La VS est une mesure indirecte de l'inflammation, reposant sur la vitesse de décantation des globules rouges dans un tube vertical. Une augmentation de la VS traduit une élévation des protéines plasmatiques de phase aiguë, telles que le fibrinogène et les immunoglobulines, qui altèrent les charges de surface des érythrocytes, facilitant leur agrégation (rouleaux). Bien que moins sensible que la CRP, la VS reste utilisée en clinique pour détecter des inflammations chroniques ou suivre leur évolution (Tishkowski et Zubair, 2025).

1.1.5.3 Fibrinogène :

Le fibrinogène est une glycoprotéine hépatique de phase aiguë qui participe à la coagulation (précurseur de la fibrine) et à l'inflammation. Induit notamment par l'IL-6, son augmentation plasmatique contribue à l'augmentation de la VS. Outre son rôle dans l'hémostase, le fibrinogène est impliqué dans l'adhésion cellulaire, l'angiogenèse et la réponse immunitaire, et son élévation est reconnue comme facteur de risque cardiovasculaire (Danesh et al., 2005).

1.1.5.4 Procalcitonine (PCT) :

La procalcitonine est une pro-hormone de la calcitonine, physiologiquement produite en faibles quantités par la thyroïde. Lors d'infections bactériennes systémiques sévères (ex. sepsis), elle est massivement synthétisée par divers tissus extra-thyroïdiens en réponse à des composants microbiens et des cytokines telles que le TNF- α et l'IL-1 β . La production de PCT est inhibée par l'interféron- γ , ce qui en fait un marqueur discriminant entre infections bactériennes et virales (Christ-Crain et Müller, 2007 ; Schuetz et al., 2017).

1.1.5.5 Numération Leucocytaire (Leucocytose Inflammatoire) :

La numération des globules blancs (leucocytes) dans le sang périphérique permet d'évaluer l'intensité de la réponse immunitaire. Une élévation globale des leucocytes, en particulier des neutrophiles (neutrophilie), reflète une mobilisation massive en réponse à des signaux pro-inflammatoires comme les chimiokines (ex. IL-8/CXCL8), le C5a ou le LTB4. Elle est

couramment utilisée pour diagnostiquer et surveiller les infections aiguës, les inflammations systémiques ou certaines maladies auto-immunes (Christ-Crain et Müller, 2007 ; Schuetz et al., 2017).

1.1.6 ROLE DE LA CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) DANS L'INFLAMMATION :

La COX-2 est une enzyme inductible jouant un rôle central dans la médiation des réponses inflammatoires aiguës et chroniques. Contrairement à la COX-1, constitutivement exprimée dans de nombreux tissus et impliquée dans l'homéostasie physiologique (protection gastrique, agrégation plaquettaire), la COX-2 est absente en conditions basales et induite lors d'un stimulus inflammatoire (cytokines comme TNF- α , IL-1 β , facteurs de croissance, LPS, stress oxydant) (Patrignani et Patrono, 2015).

Cette enzyme catalyse la transformation de l'acide arachidonique, libéré des phospholipides membranaires via les phospholipases A₂, en endoperoxydes instables (PGG₂ et PGH₂). Ces intermédiaires sont ensuite convertis en prostanoïdes bioactifs via des synthases spécifiques : prostaglandines (PGE₂, PGD₂, PGF₂ α), prostacycline (PGI₂), thromboxane A₂ (TXA₂) ; (Vane et Botting, 2003 ; Nuhrich, 2015).

Parmi ces médiateurs, la prostaglandine E₂ (PGE₂) est particulièrement impliquée dans les manifestations cardinales de l'inflammation :

- Vasodilatation et augmentation de la perméabilité vasculaire, favorisant la formation d'œdème ;
- sensibilisation des nocicepteurs, induisant la douleur ;
- stimulation du centre thermorégulateur hypothalamique, provoquant la fièvre ;
- activation et recrutement des cellules immunitaires.

En effet, la COX-2 représente une cible pharmacologique majeure dans le traitement de l'inflammation, justifiant le développement d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sélectifs de la COX-2, afin de limiter les effets indésirables liés à l'inhibition de la COX-1 (Ricciotti et FitzGerald, 2011).

1.2 STRUCTURE ET FONCTION DE COX-2 :

1.2.1 DIFFERENCES ENTRE COX-1 ET COX-2 : COMPARAISON STRUCTURALE :

Les cyclooxygénases (COX), appelées prostaglandine-endoperoxyde synthases (PTGS), est constitué de deux isoformes : COX-1 et COX-2. Elles catalysent la même réaction enzymatique. Ces isoenzymes présentent des différences structurales (**Figure 2**), à l'origine de leurs fonctions biologiques distinctes.

Séquence et structure primaire :

Les deux iso enzymes présentent une homologie de séquence significative, COX-1 et COX-2 diffèrent par plusieurs éléments structuraux :

-Taille et composition en acides aminés : COX-1 humaine est constituée de 576 acides aminés, tandis que COX-2 en compte 604 (Attiq et al., 2018).

-Variations au niveau des extrémités :

COX-1 possède une séquence additionnelle de 17 acides aminés à l'extrémité N-terminale, absente chez COX-2. À l'inverse, COX-2 présente une extension de 18 acides aminés à l'extrémité C-terminale, qui n'est pas retrouvée chez COX-1 (Grosser et al., 2017).

-Masse moléculaire : Les deux isoformes présentent une masse moléculaire voisine, d'environ 70 kDa par monomère (Attiq et al., 2018).

Structure génique et organisation transcriptionnelle :

-Organisation du gène : Le gène codant pour COX-1 contient un intron supplémentaire (intron 1), absent dans le gène de COX-2 (Chandrasekharan et Simmons, 2004).

-Régulation de l'expression : L'expression du gène **COX-1** est dite constitutive, régulée de manière stable et indépendante des stimuli externes. De plus, le gène **COX-2** est soumis à une régulation inductible : il possède des éléments de réponse à divers facteurs de transcription et des séquences instables dans la région 3'-non traduite (3'-UTR) de l'ARNm, facilitant une dégradation rapide de ce dernier en fonction des signaux cellulaires (Attiq et al., 2018).

Structure tridimensionnelle et site actif :

Les deux isoenzymes COX-1 et COX-2 présentent une structure tridimensionnelle très similaire. Les deux enzymes fonctionnent sous forme d'homodimères et possèdent une organisation comparable des domaines catalytiques. Chacune comporte trois sites de glycosylation contenant des oligosaccharides riches en mannose ; COX-2 se distingue toutefois par la présence d'un quatrième oligosaccharide additionnel (Attiq et al., 2018).

Les différences majeures entre COX-1 et COX-2 résident dans la configuration du site actif, influençant l'accessibilité et la sélectivité de l'enzyme vis-à-vis de certains substrats ou inhibiteurs. Ces variations sont dues à des substitutions d'acides aminés clés :

-À la position 523, l'isoleucine (COX-1) est remplacée par une valine dans (COX-2).

-À la position 434, une substitution identique est observée (isoleucine → valine).

Ces remplacements d'acides aminés, plus petits dans COX-2, élargissent la cavité du site actif (**Figure 2**), permettant l'accès à des inhibiteurs sélectifs spécifiques de cette isoforme (Gierse et al., 1996).

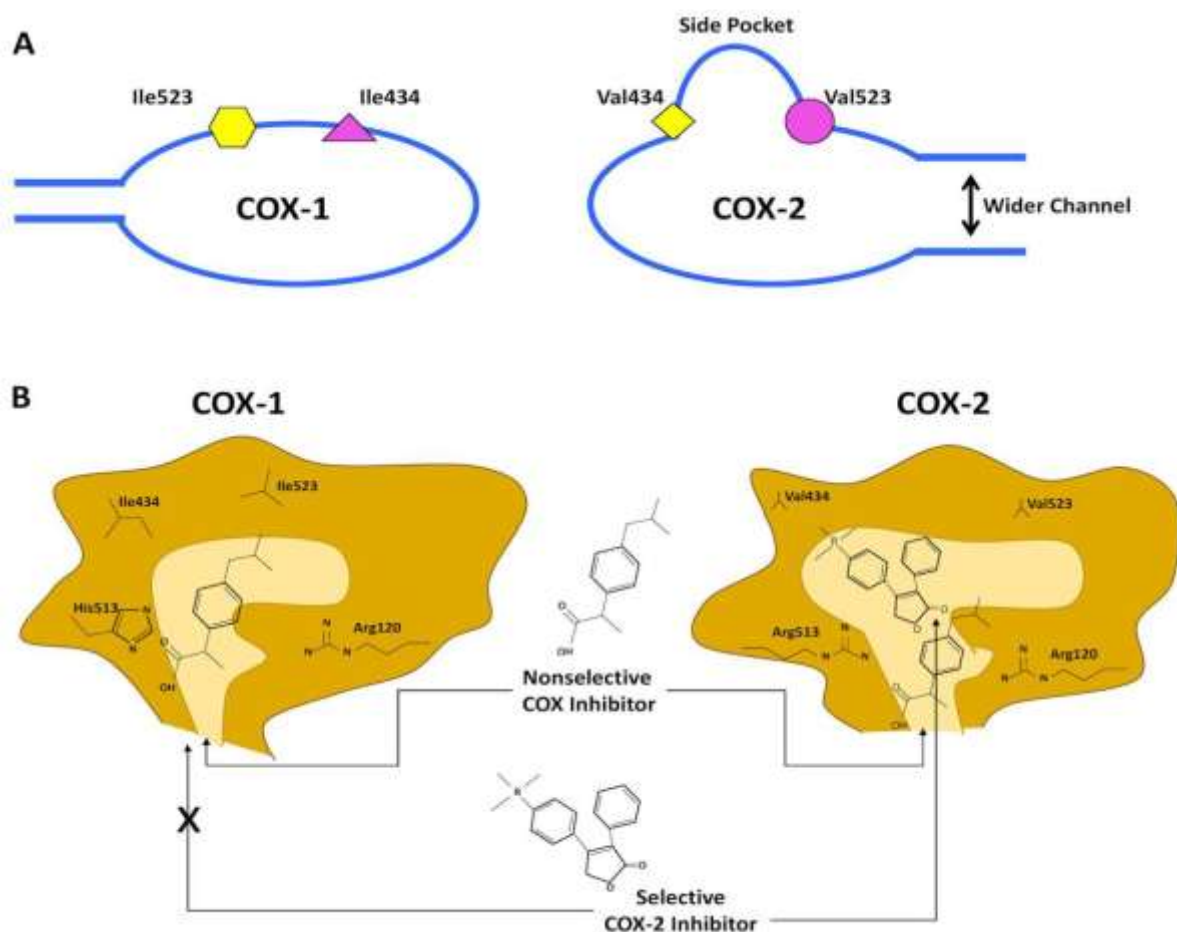


Figure 2 : Représentation schématique des différences structurales entre les canaux de liaison au substrat de la cyclooxygénase (COX)-1 et de la COX-2. (Faki, et al.,2021)

Ces substitutions d'acides aminés créent une poche latérale hydrophobe plus large (17-25% plus grande) dans le site actif de COX-2. La présence de valine, un acide aminé plus petit que l'isoleucine, élargit le canal de liaison, permettant un accès plus facile au substrat et une accommodation plus flexible des inhibiteurs sélectifs (Warner et Mitchell, 2004)

Les deux isoenzymes possèdent deux sites catalytiques distincts mais fonctionnellement couplés :

- Un site cyclooxygénase qui convertit l'acide arachidonique en prostaglandine G₂ (PGG₂)
- Un site peroxydase qui réduit la PGG₂ en prostaglandine H₂ (PGH₂) (Smith et al., 2000).

Localisation subcellulaire et Modalités d'expression des isoformes :

La distribution intracellulaire des deux isoformes diffère sensiblement :

-COX-1 est principalement localisée au niveau du réticulum endoplasmique, où elle assure une activité constitutive en lien avec l'homéostasie cellulaire. La COX1 présente une expression constitutive et ubiquitaire dans la majorité des tissus. Elle est particulièrement abondante dans les plaquettes, les reins, la muqueuse gastrique et l'intestin, où elle remplit des fonctions physiologiques de base (Chandrasekharan et Simmons, 2004)

-COX-2, en revanche, est retrouvée à la fois au niveau du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire. Elle présente une concentration accrue au niveau des membranes nucléaires, ce qui pourrait moduler l'accès au substrat ainsi que l'efficacité catalytique (Grosser et al., 2017). La COX2, est faiblement exprimée dans les tissus en conditions physiologiques normales. Son expression est hautement inductible en réponse à des stimuli pro-inflammatoires tels que les cytokines (TNF- α , IL-1 β), les facteurs de croissance, les lipopolysaccharides (LPS), ou encore le stress oxydatif. Elle est notamment induite dans les monocytes, les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Patrignani et Patrono, 2015).

1.2.2 ROLES PHYSIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES :

COX-1 participe au maintien de l'homéostasie dans divers tissus. Elle est impliquée dans :

- La protection de la muqueuse gastro-intestinale par la synthèse de prostaglandines cytoprotectrices
- La régulation de la perfusion rénale et de la filtration glomérulaire
- L'agrégation plaquettaire et l'hémostase via la synthèse de thromboxane A₂
- La régulation du tonus vasculaire (Grosser et al., 2017)

COX-2, bien qu'inductible, présente également une expression constitutive localisée dans certains tissus comme le cerveau, le rein et l'utérus. Elle joue un rôle dans :

- Le développement rénal
- La plasticité neuronale, notamment dans la mémoire
- L'adaptation au stress
- L'ovulation et l'implantation embryonnaire

-Les processus de cicatrisation et de réparation tissulaire (Chandrasekharan et Simmons, 2004)

La COX-2 est largement impliquée dans les processus inflammatoires et pathologiques :

-Elle constitue une source majeure de prostaglandine E_2 (PGE_2), un médiateur central de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre.

-Elle est surexprimée dans plusieurs conditions pathologiques chroniques :

-Maladies inflammatoires (arthrite rhumatoïde, colite ulcéreuse)

-Maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson)

-Divers types de cancers, où elle favorise la croissance tumorale et l'angiogenèse

-Troubles de la cicatrisation, notamment un retard dans la consolidation des fractures (Grosser et al., 2017)

1.2.3 CARACTERISTIQUES FONCTIONNELLES DES ISOENZYMES : COX1 ET COX 2 :

-Enzymes COX-1 métabolise principalement l'acide arachidonique extracellulaire.

-Enzymes COX-2 possède une spécificité plus large, étant capable d'utiliser à la fois l'acide arachidonique intracellulaire et extracellulaire, ainsi que d'autres acides gras polyinsaturés (Harizi et al., 2008).

-Les deux isoenzymes catalysent la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine H_2 (PGH_2), un précurseur commun des prostanoïdes.

La PGH_2 est ensuite convertie en différents composés bioactifs (PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 , TXA_2) via des enzymes spécifiques selon le contexte cellulaire. **(Figure3)**

Enzyme COX-2 présente un profil distinct de prostanoïdes, modulé par l'environnement cellulaire et les conditions pathologiques (Chandrasekharan et Simmons, 2004).

Enzyme COX-2 présente une efficacité catalytique supérieure à celle de COX-1, lui permettant d'agir de manière plus efficace, même à de faibles concentrations d'acide arachidonique. Cette propriété lui confère un rôle prépondérant dans les situations où la production de prostanoïdes doit être rapidement amplifiée en réponse à un stimulus inflammatoire.

La régulation de COX-1 est principalement assurée au niveau post-traductionnel, reflétant son rôle constitutif dans l'homéostasie cellulaire.

En revanche, COX-2 est soumise à une régulation complexe à plusieurs niveaux :

-**Transcriptionnel** : induction dépendante de facteurs de transcription tels que NF- κ B, AP-1, CREB, en réponse à des signaux pro-inflammatoires.

-Post-transcriptionnel : modulation de la stabilité de l'ARNm, notamment via des éléments AU-rich présents dans la région 3'-UTR.

-Post-traductionnel : modifications covalentes telles que la glycosylation et la phosphorylation, influençant la stabilité et l'activité de l'enzyme (Attiq et al., 2018).

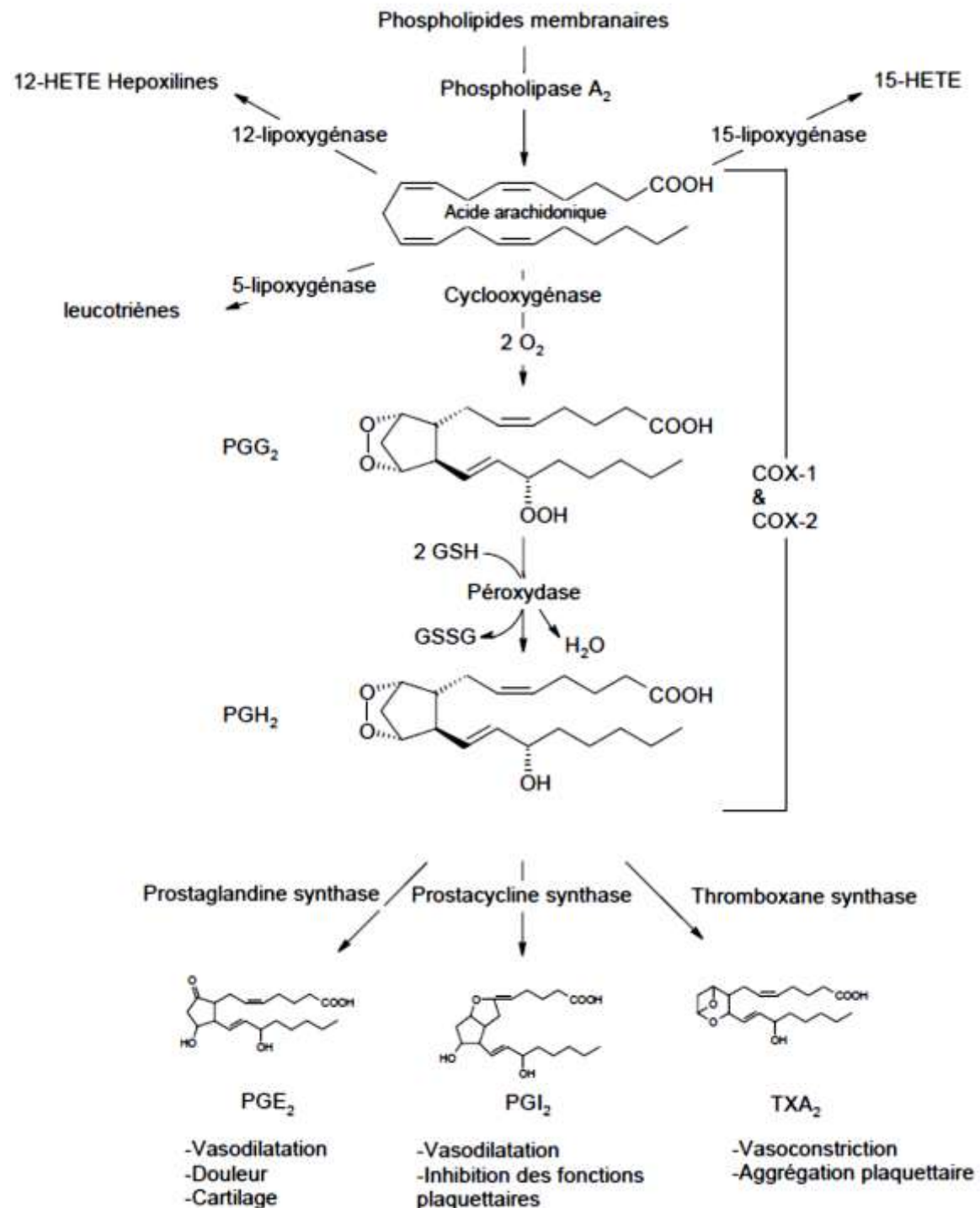


Figure 3 : Cascade de l'acide arachidonique (Arrault, 2007).

1.3 ANTI-INFLAMMATOIRES NON STÉROÏDIENS :

1.3.1 CLASSIFICATION DES AINS

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) peuvent être classés selon plusieurs critères :

Une classification chimique : repose sur la structure du noyau central, permettant de distinguer des groupes tels que les dérivés de l'acide acétique, propionique, anthranilique ou encore les oxicams (Brune et Patrignani, 2015).

- les fénacs : diclofénac, indométhacine, sulindac, portant une fonction acide
- les profènes : ibuprofène, kétoprofène, naproxène, dont la particularité est de porter une fonction acide sur un carbone asymétrique
- les oxicams : piroxicam, tenoxicam, Dérivés carboxamides du benzothiazine dioxyde.
- les acétylants de la 530Ser : aspirine, o-(acetoxyphenyl) hept-2-ynyl-sulfide et certains dérivés de l'acide salicylique.

La plupart de ces composés présentent un groupement capable de créer une liaison ionique avec l'arginine 120 qui se situe en entrée du site actif.

Classification pharmacocinétique : un autre critère de classification concerne leur pharmacocinétique, notamment la demi-vie plasmatique, qui permet de différencier les AINS à courte durée d'action, nécessitant des prises fréquentes, et ceux à longue durée d'action, favorisant une administration espacée (Rainsford, 2004).

Sélectivité vis-à-vis des cyclooxygénases : Le critère majeur repose sur leur sélectivité vis-à-vis des cyclooxygénases. Les AINS traditionnels inhibent de manière non sélective les isoformes COX-1 et COX-2, tandis que les inhibiteurs spécifiques de la COX-2 ont été développés pour limiter les effets indésirables gastro-intestinaux liés à l'inhibition de la COX-1 (Vane et Botting, 1998 ; Patrono et al., 2001).

La sélectivité d'une molécule envers COX-2 est définie par le calcul du ratio de son IC₅₀ sur COX-1 et de son IC₅₀ sur COX-2, l'IC₅₀ évaluant la concentration de la molécule nécessaire pour réduire de 50% la production de PGs

$IC_{50}(COX-2) / IC_{50}(COX-1) > 1 \Rightarrow$ inhibition préférentielle de COX-2.

$IC_{50}(COX-2) / IC_{50}(COX-1) < 1 \Rightarrow$ inhibition préférentielle de COX-1.

$IC_{50}(COX-1) / IC_{50}(COX-2) = 1 \Rightarrow$ inhibition non sélective.

La puissance d'un inhibiteur de COX-2 se caractérise par un fort ratio d'IC₅₀ (COX-1) / IC₅₀(COX-2), une activité anti-inflammatoire conséquente, très peu d'effets indésirables, et donc une meilleure tolérance. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré une relation entre le ratio d'IC₅₀(COX-1/COX-2) et les effets secondaires du système GI : plus, le ratio est grand, moindre sont les effets secondaires.

Les inhibiteurs préférentiels de COX-1 :

Sont des AINS qui exercent une inhibition prédominante sur la COX-1, avec une inhibition plus faible de la COX-2. Leur ratio IC₅₀ (COX-1/COX-2) est faible, indiquant une affinité plus élevée pour la COX-1. En raison de cette sélectivité, ces inhibiteurs sont souvent associés à des effets secondaires gastro-intestinaux, tels que des ulcères et des troubles digestifs, liés à la diminution de la production des prostaglandines protectrices de la muqueuse gastrique. Quelques exemples de cette catégorie, Aspirine avec un rapport IC₅₀ cox1/cox 2 de l'ordre de 0.006 (**Figure 4**) et l'indométacine avec un rapport IC₅₀ cox1/cox 2 de l'ordre de 0.35 (Vane et Botting, 1998 ; Rayar, 2017)

Les inhibiteurs préférentiels de COX-2 :

Ces AINS exercent une inhibition modérée de la COX-1, mais leur effet sur la COX-2 est plus prononcé, avec un rapport IC₅₀ allant de 2 à 100 fois plus élevé pour la COX-2 par rapport à la COX-1. Ces médicaments sont généralement mieux tolérés au niveau gastro-intestinal. Exemple : Meloxicam avec un rapport IC₅₀ cox1/cox 2 de l'ordre de 13.1 (Pairet et al., 1998). Ils sont souvent utilisés pour traiter des affections inflammatoires tout en minimisant les effets secondaires sur l'estomac et les intestins (Patrono et al., 2001 ; Rayar, 2017).

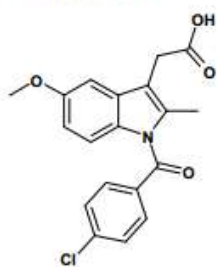
Les inhibiteurs non sélectifs de COX :

Ces AINS inhibent de manière significative les deux isoformes, COX-1 et COX-2, à des concentrations thérapeutiques courantes. Exemple : Ibuprofène. Bien qu'efficaces pour soulager la douleur et l'inflammation, leur action sur la COX-1 peut entraîner des risques accrus de complications gastro-intestinales, en particulier lors de traitements prolongés (Cryer et Dubois, 1998 ; Rayar, 2017).

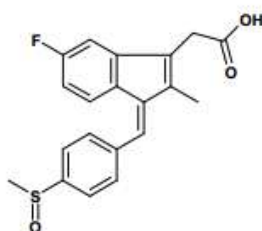
Inhibiteurs sélectifs de COX-2 :

Les inhibiteurs sélectifs de la COX-2, également appelés COXIBs, sont caractérisés par un rapport IC₅₀ (COX-1/COX-2) faible, ce qui signifie qu'ils inhibent principalement la COX-2 et ont une faible affinité pour la COX-1 permet de réduire les effets secondaires gastro-intestinaux courants avec les AINS non sélectifs, qui inhibent à la fois la COX-1 et la COX-2. Par exemple, le Célécoxib présente un rapport IC₅₀ COX-1/COX-2 de l'ordre de 30, indiquant une sélectivité marquée pour la COX-2. Un autre exemple, le Rofécoxib (CI₅₀cox1/cox2 de l'ordre de 272), (Martina et al., 2005) également un COXIB, montre une sélectivité similaire pour la COX-2 par rapport à la COX-1 (Grosser et al., 2006 ; Rayar, 2017).

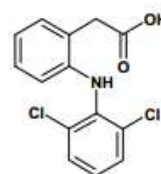
Les fénacs



Indométhacine
 CI_{50} COX-1 = 0,16 μ M
 CI_{50} COX-2 = 0,46 μ M

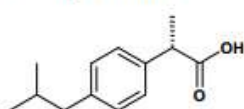


Sulindac
 CI_{50} COX-1 = 1,02 μ M
 CI_{50} COX-2 = 10,43 μ M

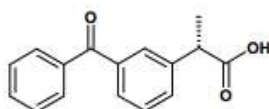


Diclofénac
 CI_{50} COX-1 = 0,14 μ M
 CI_{50} COX-2 = 0,05 μ M

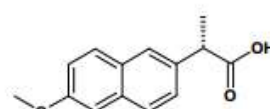
Les profènes



Ibuprofène
 CI_{50} COX-1 = 4,7 μ M
 CI_{50} COX-2 > 30 μ M

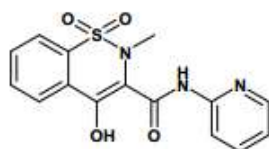


Kétoprofène
 CI_{50} COX-1 = 0,02 μ M
 CI_{50} COX-2 = 1,08 μ M

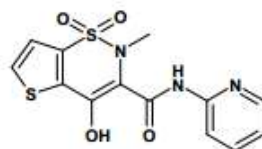


Naproxène
 CI_{50} COX-1 = 7,76 μ M
 CI_{50} COX-2 = 74 μ M

Les oxicames

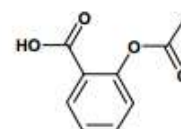


Piroxicam
 CI_{50} COX-1 = 0,76 μ M
 CI_{50} COX-2 = 9,0 μ M



Tenoxicam
 CI_{50} COX-1 = 2,30 μ M
 CI_{50} COX-2 = 14 μ M

L'aspirine



Aspirine
 CI_{50} COX-1 = 0,3 μ M
 CI_{50} COX-2 = 50 μ M

Figure 4 : les valeurs des CI_{50} des cox1 et cox2 (Beziere, 2010)

1.3.2 LES AINS NON SELECTIFS :

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) non sélectifs, également qualifiés de « classiques » ou « traditionnels », exercent leur action pharmacologique en inhibant de manière non spécifique les deux isoformes de la cyclooxygénase : COX-1 et COX-2. Bien que leur efficacité thérapeutique repose en grande partie sur l'inhibition de COX-2, responsable de la synthèse des prostaglandines pro-inflammatoires, l'inhibition concomitante de COX-1, isoforme constitutive aux fonctions physiologiques, explique la survenue fréquente d'effets indésirables (HAS, 2013 ; Nuhric, 2015 ; Haroun et al., 2023).

Parmi les molécules les plus représentatives de cette classe figurent l'ibuprofène, le naproxène, le kétoprofène, le diclofénac, l'indométacine, ainsi que l'aspirine à dose anti-inflammatoire (Grandin, 2013 ; Nuhrich, 2015). Le ratio COX-1/COX-2 varie selon les molécules, influençant à la fois leur profil d'efficacité et leur tolérance.

Les effets indésirables des AINS résultent principalement de l'inhibition des cyclooxygénases, notamment COX-1, impliquées dans la production de prostaglandines protectrices. Au niveau gastro-intestinal, cette inhibition réduit la synthèse de PGE₂ et PGI₂, compromettant l'intégrité de la muqueuse digestive et favorisant ulcères et hémorragies. Sur le plan rénal, les prostanoïdes rénaux jouent un rôle clé dans l'homéostasie hydrosodée et le débit de filtration glomérulaire, et leur inhibition peut entraîner rétention, insuffisance rénale ou nécrose papillaire, en particulier en contexte de stress hémodynamique. L'inhibition de COX-1 plaquettaire diminue la production de thromboxane A₂, prolongeant le temps de saignement et augmentant le risque hémorragique, notamment avec l'aspirine. Enfin, les AINS peuvent induire des réactions d'hypersensibilité liées à une dérivation du métabolisme de l'acide arachidonique vers la voie des leucotriènes, ainsi que des hépatotoxicités rares mais graves, comme celles associées au diclofénac (Temple, 2006 ; Wallace, et al., 2008 ; Grosser, et al., 2010 ; Grandin, 2013 ; Nuhrich, 2015).

1.3.3 LES AINS SELECTIFS COX-2 (COXIBS) :

Les AINS sélectifs COX-2, appelés coxibs (**Figure 5**), ont été développés dans le but de maximiser l'efficacité anti-inflammatoire liée à l'inhibition de la COX-2, tout en minimisant les effets secondaires gastro-intestinaux observés avec les AINS non sélectifs. L'objectif principal était de réduire les risques de lésions muqueuses, de saignements gastro-intestinaux et d'ulcères, qui sont principalement dus à l'inhibition de COX-1 (Nuhrich, 2015).

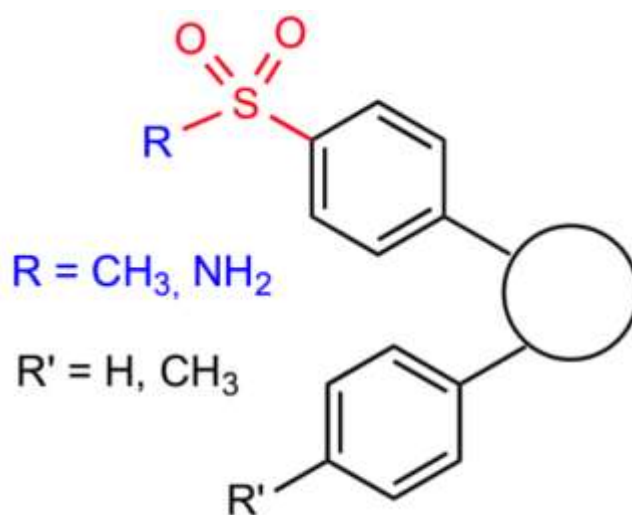


Figure 5 : Structure générale des COXIBS (Nuhrich, 2015)

La sélectivité des coxibs repose sur des différences structurales clés entre les sites actifs des isoformes COX-1 et COX-2. Le site catalytique de COX-2 possède une poche latérale hydrophobe plus volumineuse et plus accessible que celle de COX-1. Ce phénomène est attribué à la présence d'une valine en position 523 dans COX-2, par rapport à une isoleucine plus encombrante en position 523 dans COX-1 (Arrault, 2007 ; Ricciotti et FitzGerald, 2011). Cette variation structurale permet aux molécules sélectives de COX-2 de s'insérer préférentiellement dans la poche plus large de COX-2, beaucoup moins que dans le site plus étroit de COX-1, limitant ainsi l'inhibition de cette dernière (Nuhrich, 2015).

Les coxibs sont souvent de plus grande taille que les AINS classiques et contiennent des groupements spécifiques qui facilitent leur sélectivité pour COX-2. Par exemple, le célécoxib contient un groupe sulfonamide, tandis que l'étoricoxib porte un groupe sulfone, permettant une liaison plus spécifique à COX-2 (Ricciotti et FitzGerald, 2011 ; Nuhrich, 2015).

L'action pharmacologique principale des AINS se distinguent par leur capacité à inhiber les enzymes cyclooxygénases (COX). Les AINS agissent en se fixant au site catalytique des enzymes COX, inhibant ainsi leur activité cyclooxygénase et réduisant la production de l'ensemble des prostanoides en aval (Nuhrich, 2015).

La majorité des AINS sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles. L'aspirine (acide acétylsalicylique) fait exception en provoquant une inhibition irréversible par acétylation d'un résidu sérine (Ser530 pour COX-1, Ser516 pour COX-2) dans le canal hydrophobe du site actif, bloquant ainsi l'accès de l'acide arachidonique (Vane et Botting, 2003 ; Nuhrich, 2015).

1.4 FLAVONOÏDES ET LEUR POTENTIEL ANTI-INFLAMMATOIRE

1.4.1 CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES :

Structure chimique et caractéristiques générales :

Les flavonoïdes constituent l'une des classes les plus importantes de composés phénoliques présents dans le règne végétal. Ils sont caractérisés par une structure de base commune composée de deux cycles aromatiques (cycles A et B) reliés par un hétérocycle oxygéné de trois carbones (cycle C), formant ainsi un squelette carboné en C15 (Panche et al., 2016). Cette structure de base, représentée par la formule C₆-C₃-C₆, est responsable des propriétés biologiques de ces molécules (Brodowska, 2017).

Le noyau principal des flavonoïdes (**Figure 6**), nommé 2-phénylchromane, est composé d'un benzène (cycle A) condensé à un noyau pyrane (cycle C) portant un groupement phényle (cycle B) en position 2 (Kumar et Pandey, 2013). Les différentes classes de flavonoïdes se distinguent par le degré d'oxydation et les substitutions sur le cycle C, tandis que les composés individuels au sein de chaque classe diffèrent par les substitutions sur les cycles A et B (Brodowska, 2017).

La grande diversité structurale des flavonoïdes résulte de modifications chimiques variées comme l'hydroxylation, la méthylation, la glycosylation ou l'acylation. Ces modifications affectent considérablement leurs propriétés biologiques, notamment leur solubilité, leur biodisponibilité et leur activité anti-inflammatoire (Panche et al., 2016).

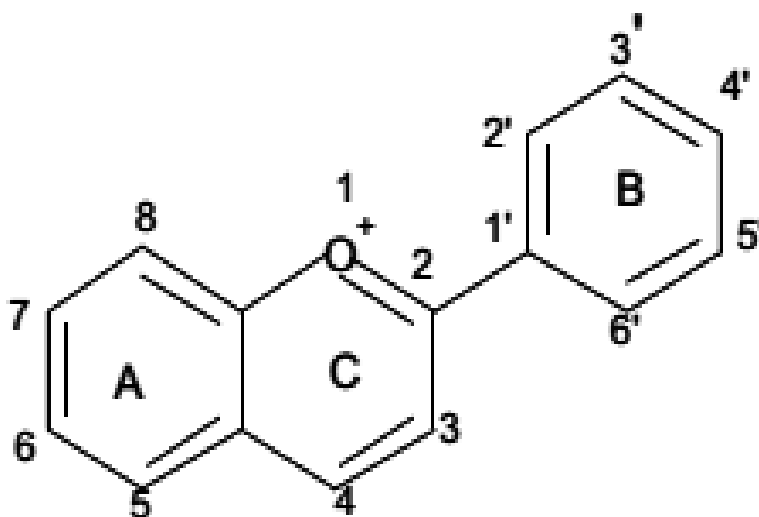


Figure 6 : structure de base des flavonoides (Ghedira, 2005)

1.4.2 SOUS-CLASSES PRINCIPALES DE FLAVONOÏDES :

En fonction de leur structure chimique, les flavonoïdes sont classés en six grandes sous-classes. **(Figure 7)** Chacune possède des caractéristiques structurales spécifiques qui déterminent ses propriétés biologiques (Panche et al., 2016).

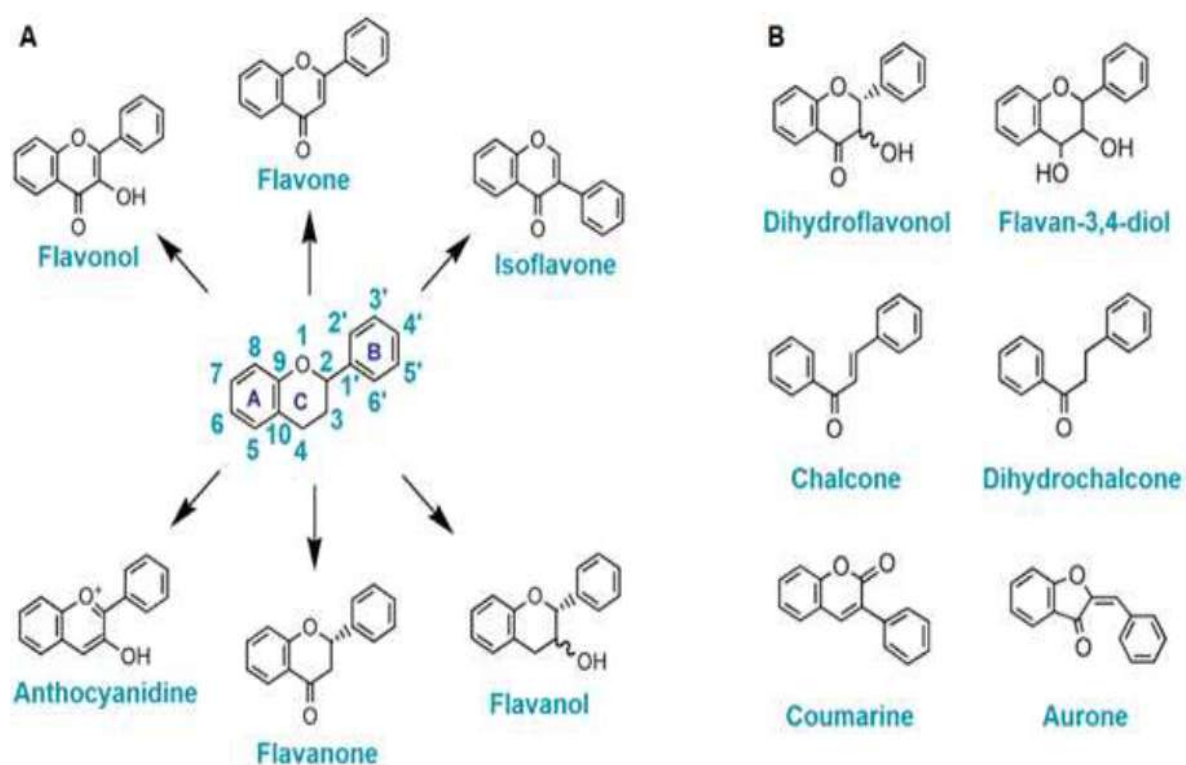


Figure 7 : Structures générales des principaux flavonoïdes (A) et des groupes mineurs (B) (Crozier et al., 2008).

1.4.2.1 Flavones :

Les flavones présentent une double liaison entre les carbones C2 et C3 du cycle C et un groupe carbonyle en position C4 (**Figure8**). Cette sous-classe inclut des composés tels que l'apigénine, la lutéoline et la chrysine (**Tableau 2**) (Kumar et Pandey, 2013). Les flavones sont caractérisées par l'absence d'un groupe hydroxyle en position 3 du cycle C, ce qui les distingue des flavonols

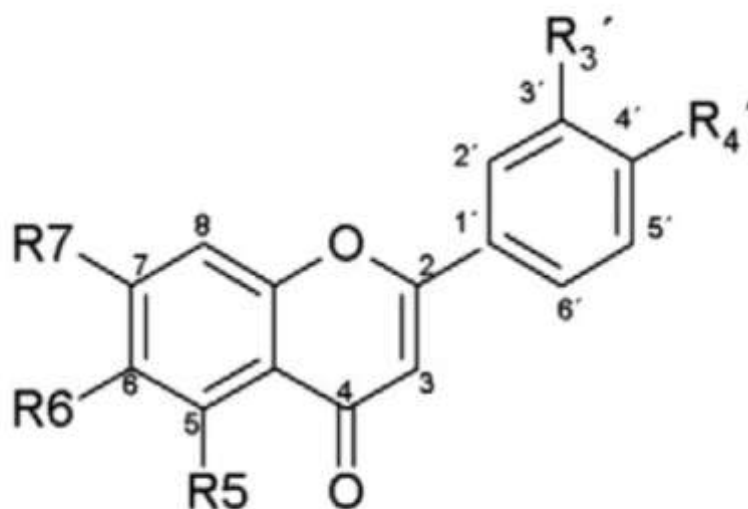


Figure8 : Structure chimique des flavones (Emeraux, 2021)

Tableau 2 : Exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavones

Flavones	Substitution				
	5	6	7	3'	4'
Flavone	H	H	H	H	H
Chrysine	OH	H	OH	H	H
Apigénine	OH	H	OH	OH	OH
Lutéoline	OH	H	OH	OH	OH
Baicaléine	OH	OH	OH	H	H
Diosmine	OH	H	O-Glc-Rha	OH	OCH ₃

Elles sont abondantes dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym et la camomille (Panche et al., 2016 ; Brodowska, 2017).,

1.4.2.2 Flavonols

Les flavonols partagent la structure de base des flavones mais possèdent un groupe hydroxyle supplémentaire en position 3 du cycle C (**Figure 9**). Cette sous-classe comprend la quercétine, le kaempférol, la myricétine et la fisétin (**Tableau 3**) (Kumar et Pandey, 2013).

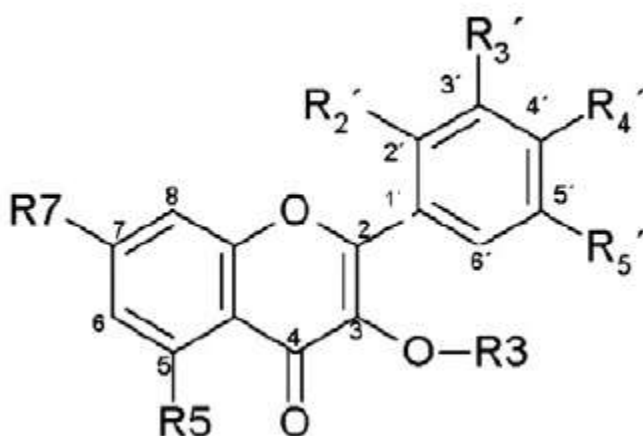


Figure 9: Structure chimique des flavonols (Emeraux, 2021.)

Tableau 3 : Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavonols (Emeraux, 2021.)

Flavonols	Substitution						
	3	5	7	2'	3'	4'	5'
Kaempférol	H	OH	OH	H	H	OH	H
Quercétine	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Myricétine	H	OH	OH	H	OH	OH	OH
Rutine	-Glc-Rha	OH	OH	H	OH	OH	H
fisetin	H	OH	OH	H	OH	OH	H

Ces composés sont largement distribués dans le règne végétal et constituent les flavonoïdes les plus abondants dans notre alimentation (Brodowska, 2017). On les trouve principalement dans les oignons, le chou frisé, les tomates, les pommes et les baies (Panche et al., 2016).

1.4.2.3 Flavanones :

Les flavanones sont caractérisées par la saturation de la liaison C2-C3 dans le cycle C, sans le groupe hydroxyle en position 3 (**Figure10**). Cette sous-classe inclut l'hespérétine, la naringénine et l'ériodictyol (**Tableau 4**) (Kumar et Pandey, 2013).

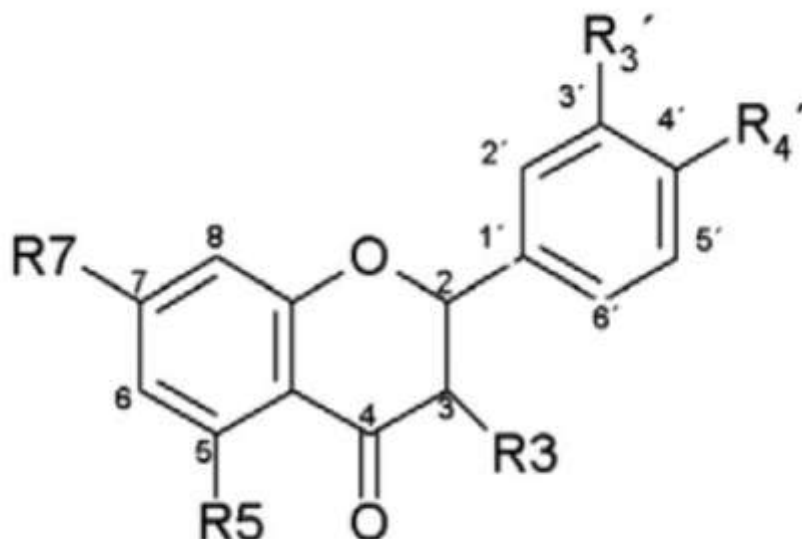


Figure 10 : Structure chimique des flavanones (Emeraux, 2021.)

Tableau 4 : Quelques exemples de molécules appartenant à la sous-classe des flavanones

Flavanones	Substitution				
	3	5	7	3'	4'
Naringénine	H	OH3	OH	H	OH
Naringine	H	OH	O-Glc-Rha	H	OH
Hespérétine	H	OH	OH	OH	OCH3
Hespéridine	H	OH	O-Glc-Rha	OH	OCH3
Taxifoline	OH	OH	OH	OH	OH

Les flavanones sont principalement présentes dans les agrumes comme les oranges, les citrons et les pamplemousses (Panche et al., 2016).

1.4.2.4 Flavanols (ou flavan-3-ols)

Les flavanols possèdent un groupe hydroxyle en position 3 du cycle C et ne présentent pas de double liaison C2-C3 ni de groupe carbonyle en C4 (**Figure 11**). Cette sous-classe comprend la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine et leurs dérivés galloylés (**Tableau5**) (Kumar et Pandey, 2013).

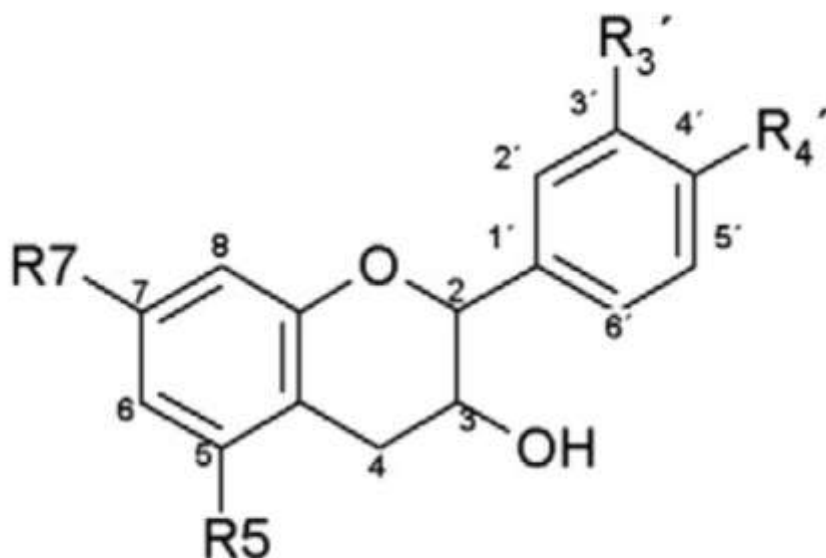


Figure 11 : Structure chimique des flavanols (Emeraux, 2021.)

Tableau5 : Molécules appartenant à la sous-classe des flavanols

Flavanols	Substitution				Conformation
	5	7	3'	4'	
Épicatéchine (- ou +)	OH	OH	OH	OH	2R, 3R (-) ou 2S, 3S (+)
Catéchine (- ou +)	OH	OH	OH	OH	2S, 3R (-) ou 2R, 3S (+)

Ces composés sont abondants dans le thé vert, le cacao et certains fruits comme les pommes et les raisins (Panche et al., 2016).

1.4.2.5 Isoflavones

Les isoflavones diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B, qui est attaché au carbone C3 plutôt qu'au carbone C2 du cycle C (**Figure 12**). Cette sous-classe comprend la génistéine, la daidzéine et la glycitéine (**Tableau 6**) (Kumar et Pandey, 2013).

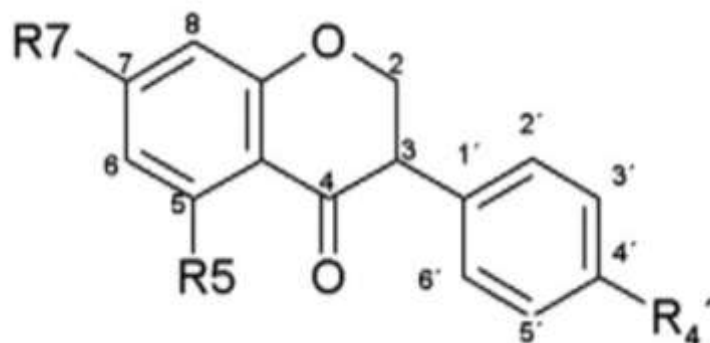


Figure 12 : Structure chimique des isoflavonoïdes (Emeraux, 2021.)

Tableau 6 : Molécules appartenant à la sous-classe des isoflavonoïdes

Isoflavonoïdes	Substitution		
	5	7	4'
Daidzéine	H	OH	OH
Génistéine	OH	OH	OH

Les isoflavones sont principalement présentes dans les légumineuses, avec le soja comme source la plus importante (Panche et al., 2016).

1.4.2.6 Anthocyanidines :

Les anthocyanidines possèdent un cycle C cationique (ion flavylum) avec des doubles liaisons conjuguées (**Figure 13**). Cette sous-classe comprend la cyanidine, la delphinidine, la malvidine et la pélagonidine (Kumar et Pandey, 2013).

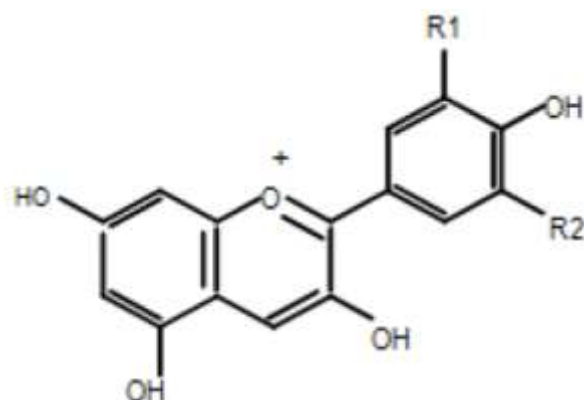


Figure 13 : Structure chimique des anthocyanidines (Emeraux, 2021.)

Ces composés sont responsables des couleurs rouges, bleues et violettes des fruits et légumes comme les baies, les raisins rouges et le chou rouge (Panche et al., 2016).

1.4.3 BIOSYNTHÈSE DES FLAVONOÏDES :

1.4.3.1 Introduction :

Le métabolisme des organismes vivants se divise en métabolisme primaire et métabolisme secondaire. Le métabolisme primaire regroupe les réactions biochimiques essentielles à la croissance et à la survie des cellules, telles que la glycolyse, le cycle de Krebs et la biosynthèse des acides aminés, des lipides et des nucléotides (Dixon et Pasinetti, 2010). En revanche, le métabolisme secondaire produit des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans la croissance, mais qui confèrent des avantages adaptatifs aux organismes, comme les flavonoïdes, les alcaloïdes et les terpènes (Vogt, 2010).

Le métabolisme secondaire est souvent dérivé du métabolisme primaire. Par exemple, la **voie** du shikimate, qui provient du métabolisme des glucides (via la glycolyse et la voie des pentoses phosphates), aboutit à la formation du chorismate, un précurseur clé des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane (Maeda et Dudareva, 2012). Ces acides aminés sont ensuite impliqués dans la biosynthèse de nombreux métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes.

1.4.3.2 Origine des précurseurs des flavonoïdes :

La biosynthèse des flavonoïdes repose principalement sur deux voies métaboliques issues du métabolisme primaire :

La voie du shikimate et la formation des acides aminés aromatiques :

La voie du shikimate commence avec la condensation du phosphoénolpyruvate (PEP) et de l'érythrose-4-phosphate, provenant respectivement de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates, pour former le shikimate. Après une série de réactions enzymatiques, le shikimate est transformé en chorismate, qui sert de précurseur aux acides aminés aromatiques. (Herrmann et Weaver, 1999).

-Le chorismate est converti en préphénate par l'enzyme chorismate mutase.

-Le préphénate donne naissance à la phénylalanine via la préphénate déshydratase et à la tyrosine via la préphénate déshydrogénase.

-Le chorismate est également transformé en tryptophane par une voie indépendante impliquant plusieurs enzymes, dont la tryptophane synthase.

Ces acides aminés aromatiques constituent la base de nombreuses voies du métabolisme secondaire, y compris la biosynthèse des flavonoïdes (Maeda et Dudareva, 2012).

Conversion de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA :

L'acétyl-CoA, issu de la glycolyse et de la dégradation des acides gras, est converti en malonyl-CoA par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC). Cette étape est essentielle, car le malonyl-CoA est un donneur d'unités à trois carbones pour la synthèse des flavonoïdes et d'autres métabolites secondaires ((Schijlen et al., 2004 ; Vogt, 2010).

1.4.3.3 Etapes de la Biosynthèse des Flavonoïdes :

La biosynthèse des flavonoïdes commence par la voie des phénylpropanoïdes, qui transforme la phénylalanine en composés intermédiaires essentiels (**Figure 14**).

Transformation de la phénylalanine en acide cinnamique : L'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) catalyse la déamination oxydative de la phénylalanine, aboutissant à la formation de l'acide cinnamique. Cette réaction marque le début de la voie des phénylpropanoïdes (Dixon et Pasinetti, 2010).

Formation du p-coumaroyl-CoA : L'acide cinnamique est hydroxylé en acide p-coumarique par l'enzyme cinnamate 4-hydroxylase (C4H). L'acide p-coumarique est ensuite activé en p-coumaroyl-CoA par l'action de la 4-coumarate-CoA ligase (4CL) (Vogt, 2010).

Formation des flavonoïdes : Le p-coumaroyl-CoA entre dans la voie de la biosynthèse des flavonoïdes grâce à l'enzyme chalcone synthase (CHS), qui catalyse la condensation de trois unités de malonyl-CoA avec une molécule de p-coumaroyl-CoA, formant ainsi une chalcone, le premier intermédiaire flavonoïde.

-La chalcone est ensuite isomérisée en flavanone par la chalcone isomérase (CHI).

-Les flavanones peuvent être transformées en différents flavonoïdes sous l'action d'enzymes spécifiques, comme la flavone synthase (FNS), la flavonol synthase (FLS) et la dihydroflavonol réductase (DFR). (Dixon et Pasinetti, 2010)

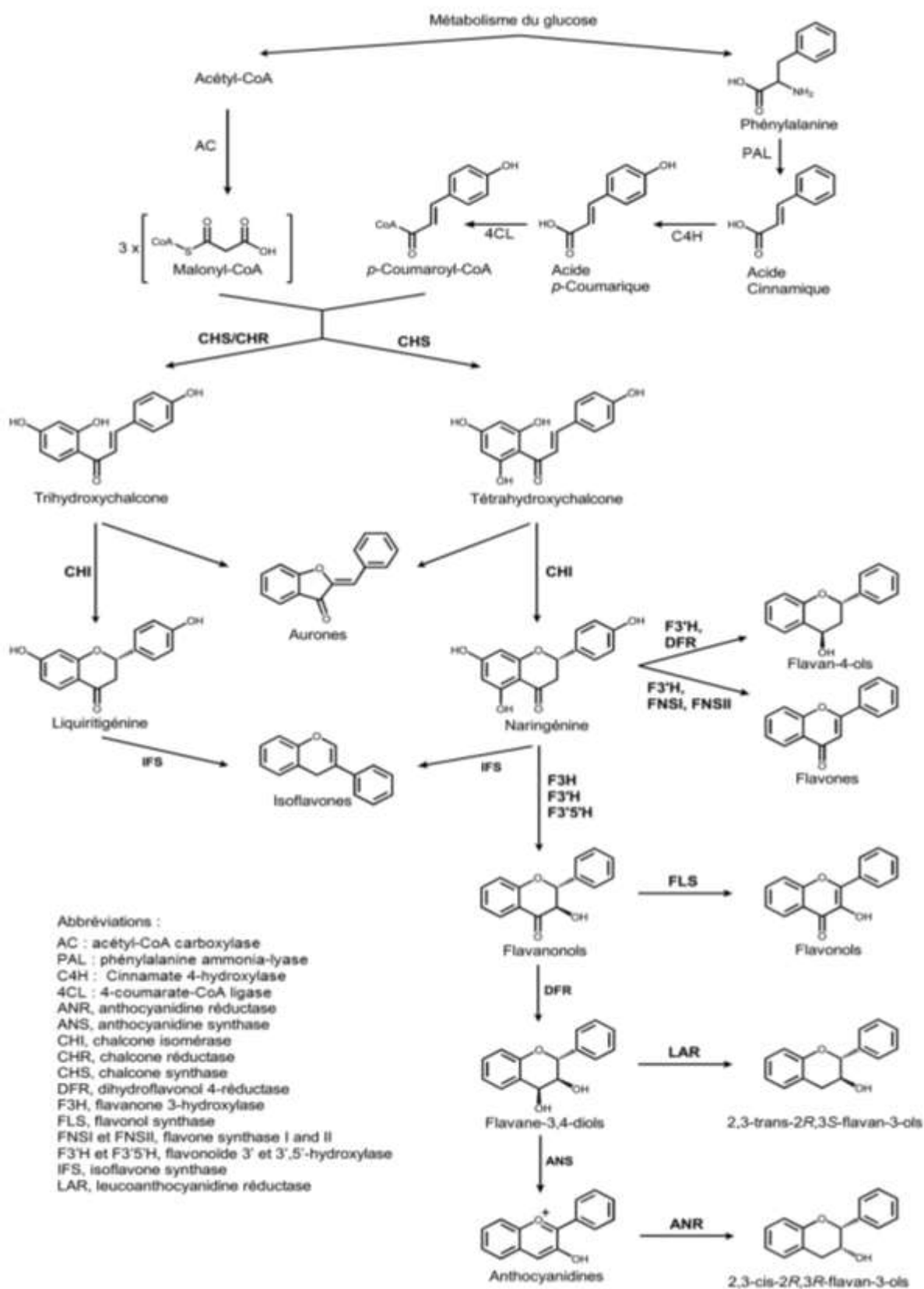


Figure14 : Voies de biosynthèse des flavonoides (Marais et al., 2007 ; Winkel et al., 2007)

1.4.4 MECANISMES ANTI-INFLAMMATOIRES DES FLAVONOÏDES :

Les flavonoïdes, un groupe de composés polyphénoliques largement distribués dans les plantes, exercent leurs effets anti-inflammatoires en modulant plusieurs médiateurs inflammatoires à différents niveaux de la cascade inflammatoire. Ces composés naturels sont capables d'atténuer les réponses inflammatoires en interférant avec diverses cibles cellulaires et moléculaires (Chen et al., 2018). Parmi leurs mécanismes d'action les plus étudiés figurent l'inhibition des enzymes pro-inflammatoires, la modulation de voies de signalisation intracellulaires, ainsi que la régulation de la voie de transcription NF- κ B.

1.4.4.1 Inhibition des Enzymes Pro-inflammatoires :

- **Inhibition de la Cyclooxygénase-2 (COX-2) :**

La cyclooxygénase-2 (COX-2) est une enzyme inductible, principalement exprimée en réponse à des stimuli inflammatoires. Elle catalyse la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines, des médiateurs lipidiques qui jouent un rôle clé dans la modulation de l'inflammation, de la douleur et de la fièvre (Rathee et al., 2009). Les flavonoïdes exercent une inhibition de COX-2 par plusieurs mécanismes :

Inhibition directe : Certains flavonoïdes, tels que la quercétine, l'apigénine et la lutéoline, se lient directement au site actif de COX-2, empêchant ainsi l'interaction avec son substrat. La quercétine, qui contient un groupe catéchol sur le cycle B, présente une affinité particulièrement élevée pour COX-2 (Chen et al., 2018).

Inhibition de l'expression génique : Les flavonoïdes peuvent également réduire l'expression du gène COX-2 en inhibant les facteurs de transcription tels que NF- κ B et AP-1, qui régulent la transcription de COX-2. Par exemple, l'apigénine inhibe la phosphorylation de l'inhibiteur I κ B- α , empêchant ainsi l'activation de NF- κ B et la transcription du gène COX-2 (Hussain et al., 2016).

Modulation des voies de signalisation : Les flavonoïdes influencent les voies de signalisation en amont de COX-2, telles que les kinases activées par les MAP kinases (p38, ERK, JNK), réduisant ainsi l'expression de COX-2. Par exemple, la lutéoline inhibe la phosphorylation de p38 et de JNK, limitant ainsi l'expression de COX-2 induite par des stimuli inflammatoires (Chen et al., 2007). Les relations structure-activité montrent que certaines caractéristiques des flavonoïdes, telles que la présence d'une double liaison C2-C3, d'un groupe carbonyle en C4, et de groupes hydroxyles à certaines positions, augmentent la capacité inhibitrice vis-à-vis de COX-2 (Rathee et al., 2009).

- **Inhibition d'autres Enzymes Inflammatoires :**

En plus de COX-2, les flavonoïdes agissent également sur d'autres enzymes impliquées dans l'inflammation, telles que :

5-Lipoxygénase (5-LOX) : Cette enzyme catalyse la production de leucotriènes, des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires impliqués dans l'asthme et les réactions allergiques.

Des flavonoïdes comme la quercétine et le kaempférol inhibent l'activité de 5-LOX, diminuant ainsi la production de leucotriènes (Chen et al., 2018).

-Oxyde Nitrique Synthase Inductible (iNOS) : Cette enzyme génère de l'oxyde nitrique (NO), un médiateur inflammatoire clé. Des flavonoïdes, tels que la lutéoline et l'apigénine, inhibent l'expression et l'activité d'iNOS, réduisant ainsi la production de NO et atténuant les effets inflammatoires (Xiao, 2017).

-Phospholipase A2 (PLA2) : Cette enzyme libère l'acide arachidonique des phospholipides membranaires, fournissant ainsi le substrat pour COX-2 et 5-LOX. Des flavonoïdes, en particulier la quercétine, inhibent l'activité de PLA2, limitant ainsi la disponibilité de l'acide arachidonique et la production de médiateurs inflammatoires (Hussain et al., 2016).

Inhibition de la production de chimiokines pro-inflammatoires

Les chimiokines sont des protéines qui favorisent l'attraction des cellules immunitaires vers les sites d'inflammation. Les flavonoïdes modulent la production et l'activité des chimiokines, contribuant ainsi à limiter l'infiltration cellulaire dans les tissus inflammés (Hussain et al., 2016).

-Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) : La quercétine et la lutéoline inhibent la production de MCP-1, une chimiokine importante dans le recrutement des monocytes au site de l'inflammation. Cette inhibition est souvent associée à la suppression de l'activation de NF- κ B et des MAP kinases (Hussain et al., 2016).

-Régulation de la production de chimiokines dans les cellules endothéliales : Les flavonoïdes influencent la production de chimiokines dans les cellules endothéliales activées par des stimuli inflammatoires. Par exemple, la quercétine réduit l'expression de CCL2 et CCL5 dans les cellules endothéliales stimulées par LPS (Xiao et al., 2016).

Les flavonoïdes exercent ainsi une régulation à la fois de la production de cytokines et de chimiokines, modulant plusieurs mécanismes de signalisation et agissant en amont de ces médiateurs pour limiter la propagation de la réponse inflammatoire.

Propriétés antioxydantes et relation avec l'effet anti-inflammatoire :

Le stress oxydatif et l'inflammation sont étroitement liés, formant un cercle vicieux dans de nombreuses pathologies. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent activer les voies inflammatoires, tandis que l'inflammation augmente la production de ROS (Chen et al., 2018). Les flavonoïdes exercent leurs effets anti-inflammatoires en partie grâce à leurs propriétés antioxydantes. Ils réduisent l'activation de NF- κ B induite par les ROS, protégeant ainsi contre l'inflammation. En prévenant les dommages oxydatifs, ils atténuent le stress oxydatif, un facteur majeur de l'inflammation. Les flavonoïdes modulent également le stress du réticulum endoplasmique et inhibent l'oxydation des lipides, limitant la formation de médiateurs inflammatoires. Bien que leur activité anti-inflammatoire soit souvent corrélée à leurs propriétés antioxydantes, d'autres mécanismes peuvent également être impliqués (Chen et al., 2018).

1.5 LE DOCKING MOLECULAIRE :

Le docking moléculaire est une technique computationnelle essentielle en conception de médicaments et en biologie structurale, visant à prédire l'orientation préférentielle (pose) d'une petite molécule (ligand) lorsqu'elle est liée à une cible macromoléculaire (récepteur), généralement une protéine ou un acide nucléique. Cette approche *in silico* permet d'évaluer l'affinité entre les molécules et d'identifier de potentiels candidats médicaments en simulant le processus de reconnaissance moléculaire à l'échelle atomique. Le docking moléculaire repose sur deux étapes principales : la phase de recherche (sampling) et la phase d'évaluation (scoring) (Pagadala et al., 2017 ; Shen et al., 2022).

1.5.1 LES ETAPES DU DOCKING MOLECULAIRE :

Le processus de docking moléculaire peut être schématiquement divisé en deux étapes consécutives mais interdépendantes : la recherche de poses et l'évaluation de ces poses.

1.5.1.1 LA PREMIERE (SEARCHING) :

La première étape, souvent appelée "searching" ou "sampling", consiste à générer un ensemble de conformations possibles pour le ligand au sein du site de liaison du récepteur. L'objectif est d'explorer de manière exhaustive ou semi-exhaustive l'espace conformationnel et translationnel du ligand ainsi que, dans les approches plus avancées, la flexibilité du récepteur (López-Blanco et al., 2014). Divers algorithmes de recherche sont employés pour explorer cet espace complexe. Parmi les méthodes courantes figurent les algorithmes génétiques, les recuits simulés, les algorithmes de Monte Carlo, les explorations systématiques ou basées sur des fragments, et plus récemment, les méthodes basées sur l'apprentissage automatique (Gaillard, 2018 ; Shen et al., 2022). Le défi majeur de cette étape est de trouver la ou les poses les plus pertinentes qui représentent l'état lié expérimental (la conformation native). **(Figure15)**

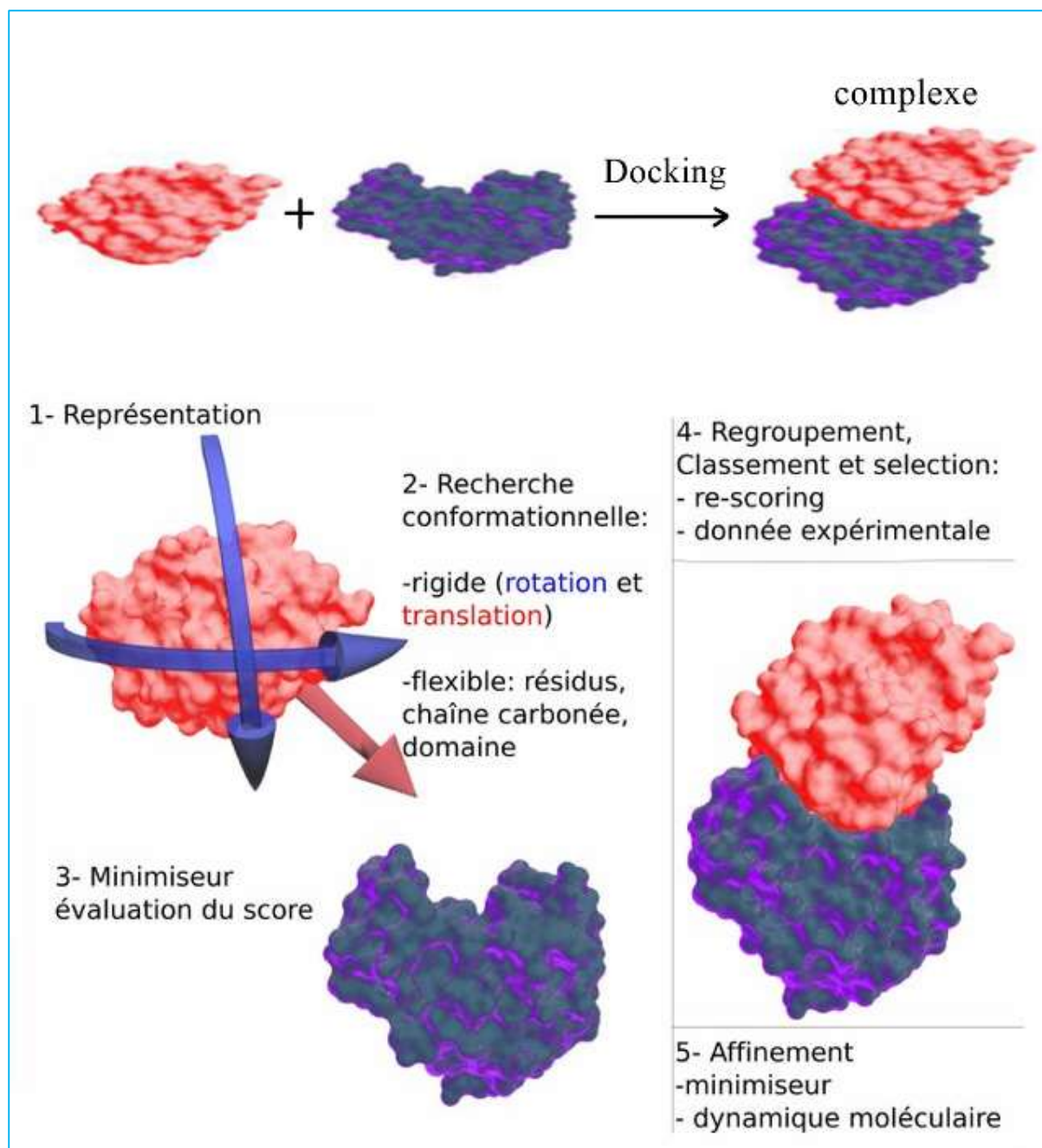


Figure15 : les différentes étapes du docking moléculaire (Férey et al.,2008).

1.5.1.2 LE SCORING EST L'ETAPE DE CLASSEMENT :

La seconde étape, le "scoring", a pour but d'évaluer la qualité de chaque pose générée par l'algorithme de recherche. Une fonction de score attribue une valeur numérique (un score) à chaque pose, censée refléter la force de liaison ou l'énergie d'interaction entre le ligand et le récepteur (Pagadala et al., 2017). Ces scores sont ensuite utilisés pour classer les différentes poses et identifier la plus probable (souvent celle avec le meilleur score) ainsi que pour estimer l'affinité de liaison. Une fonction de score idéale devrait être capable de discriminer

correctement les vraies poses des fausses (capacité de "ranking") et, idéalement, de prédire avec précision l'énergie libre de liaison expérimentale (capacité d'estimation de l'affinité) (Souza et de Azevedo Jr, 2014 ; Su et al., 2019).

1.5.2 LES FONCTIONS DE SCORING :

Les fonctions de score représentent le cœur du docking moléculaire et leur précision est cruciale pour le succès de la prédiction. Elles peuvent être globalement classées en trois catégories principales : les fonctions basées sur un champ de force, les fonctions empiriques et les fonctions basées sur la connaissance (Souza et de Azevedo Jr, 2014 ; Pagadala et al., 2017).

1.5.2.1 FONCTIONS DE SCORE BASEES SUR UN CHAMP DE FORCE :

Ces fonctions sont basées sur les principes de la mécanique moléculaire et calculent l'énergie d'interaction entre le ligand et le récepteur en utilisant des champs de force classiques (Hsin et al., 2008). L'énergie totale est généralement une somme de termes représentant les interactions de Van der Waals, les interactions électrostatiques et parfois des termes de désolvatation. Bien que théoriquement rigoureuses, ces fonctions peuvent être coûteuses en temps de calcul et leur précision dépend fortement de la qualité des paramètres du champ de force et de la gestion de la désolvatation (Souza et de Azevedo Jr, 2014).

1.5.2.2 FONCTIONS DE SCORE EMPIRIQUE :

Les fonctions de score empirique sont développées en ajustant linéairement ou non-linéairement une combinaison de termes d'énergie pondérés à des données expérimentales d'affinité de liaison de complexes protéine-ligand (Vilar et al., 2008). Ces termes peuvent inclure des contributions pour les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes, les interactions ioniques, etc. Les poids de chaque terme sont dérivés par régression à partir d'un ensemble de données d'apprentissage. Ces fonctions sont généralement plus rapides à calculer que les fonctions basées sur un champ de force et peuvent atteindre de bonnes performances pour le classement des poses, mais leur capacité à prédire l'affinité absolue peut être limitée et elles peuvent être sensibles à l'ensemble de données d'entraînement (Vilar et al., 2008 ; Souza et de Azevedo Jr, 2014).

1.5.2.3 LES FONCTIONS BASEES SUR LA CONNAISSANCE « DE TYPE KNOWLEDGE-BASED » :

Les fonctions de score basées sur la connaissance, ou *knowledge-based*, sont dérivées des fréquences statistiques des contacts atomiques observés dans les structures 3D expérimentales de complexes protéine-ligand disponibles dans des bases de données comme la Protein Data Bank (PDB) (Su et al., 2019). Elles reposent sur l'hypothèse que les arrangements atomiques fréquemment observés correspondent à des interactions énergétiquement favorables. Ces fonctions utilisent souvent des potentiels statistiques (par exemple, potentiels de paire) dérivés de l'analyse de ces fréquences. Elles sont rapides à évaluer et peuvent être efficaces pour la prédiction de poses, mais elles dépendent de la disponibilité de structures

expérimentales et peuvent avoir du mal à extrapoler à des types d'interactions ou des environnements peu représentés dans les données d'entraînement (Souza et de Azevedo Jr, 2014 ; Su et al., 2019). Récemment, des approches basées sur l'apprentissage automatique ont été intégrées pour développer des fonctions de score *knowledge-based* plus sophistiquées (Su et al., 2019).

1.5.3 NATURE DES FORCES INTERACTIONS :

L'exactitude du docking moléculaire dépend de la description appropriée des diverses forces non-covalentes qui régissent l'interaction entre le ligand et le récepteur dans le site de liaison (Kumar et Chaudhary, 2021). Ces interactions sont de nature électrostatique et stérique.

1.5.3.1 INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES :

Les interactions électrostatiques résultent de l'attraction ou de la répulsion entre des charges partielles ou complètes présentes sur le ligand et le récepteur (Honig et Nicholls, 1995). Elles comprennent les interactions ioniques entre groupes chargés (par exemple, carboxylates et ammoniums) (**Figure 16**) et les interactions dipôle-dipôle entre molécules polaires. Ces forces sont de longue portée et dépendent fortement de l'environnement diélectrique.

Les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogènes sont considérées comme les principaux facteurs responsables des propriétés des protéines telles que l'organisation structurale, la stabilité ainsi que les propriétés fonctionnelles. L'énergie de cette liaison est de 8,0 à 21,0 kJ /mol. (Milburn et Gerstein ,2004 ; Farhi,2023).

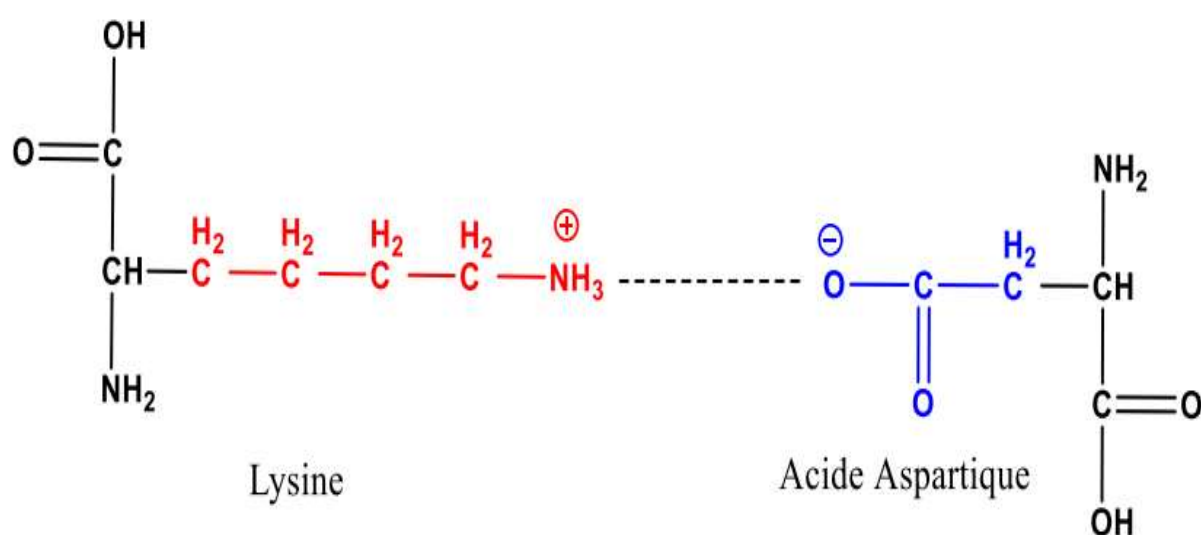


Figure 16 : représentation schématique de de l'interaction électrostatique entre le groupe amino de la lysine et la fonction carboxylique de l'acide aspartique. (Khalil, 2016 ; Farhi,2023).

1.5.3.2 INTERACTIONS HYDROPHOBES :

Les interactions hydrophobes sont dues à la tendance des molécules hydrophobes à se regrouper pour minimiser leur exposition à l'eau. Ils forment dans la structure des protéines des zones hydrophobes où les molécules d'eau ne peuvent échanger aucune liaison avec les radicaux d'acides aminés (Langmuir, 1991) (**Figure 17**). Les résidus d'acides aminés hydrophobes de la protéine peuvent interagir avec les parties hydrophobes du ligand. (Clark, 2009 ; Farhi,2023).

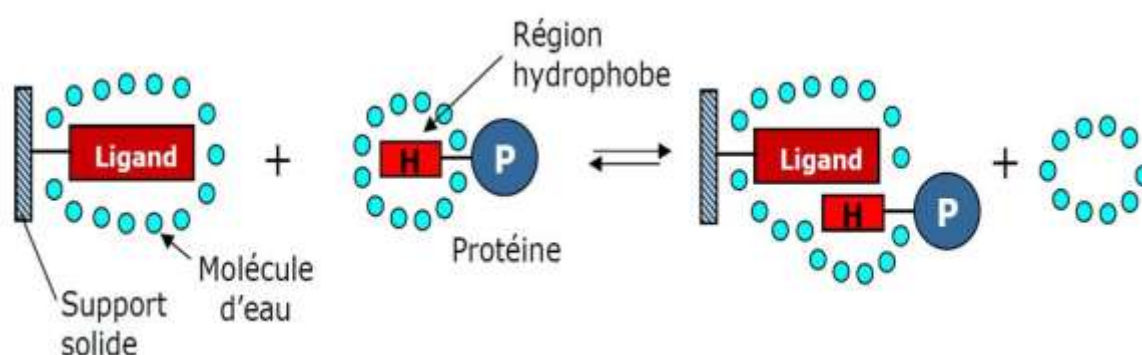


Figure 17 : Interaction hydrophobe protéine-ligand (Clark, 2009 ; Farhi,2023).

Ces interactions hydrophobes sont énergétiquement favorables car elles minimisent les interactions entre les résidus non polaires et l'eau. (Jahn et Radford ,2008 ; Farhi,2023).

1.5.3.3 INTERACTIONS DE VAN DER WAALS :

Les interactions de Van der Waals sont des forces de courte portée qui incluent les forces de dispersion (London), les forces de Keesom (dipôle permanent-dipôle permanent) et les forces de Debye (dipôle permanent-dipôle induit) (Kumar et Chaudhary, 2021). Elles proviennent des dipôles temporaires induits par les fluctuations de densité électronique (**Figure 18**). Bien qu'individuellement faibles, les nombreuses interactions de Van der Waals à l'interface ligand-récepteur peuvent apporter une contribution significative à l'énergie de liaison (Kumar et Chaudhary, 2021).

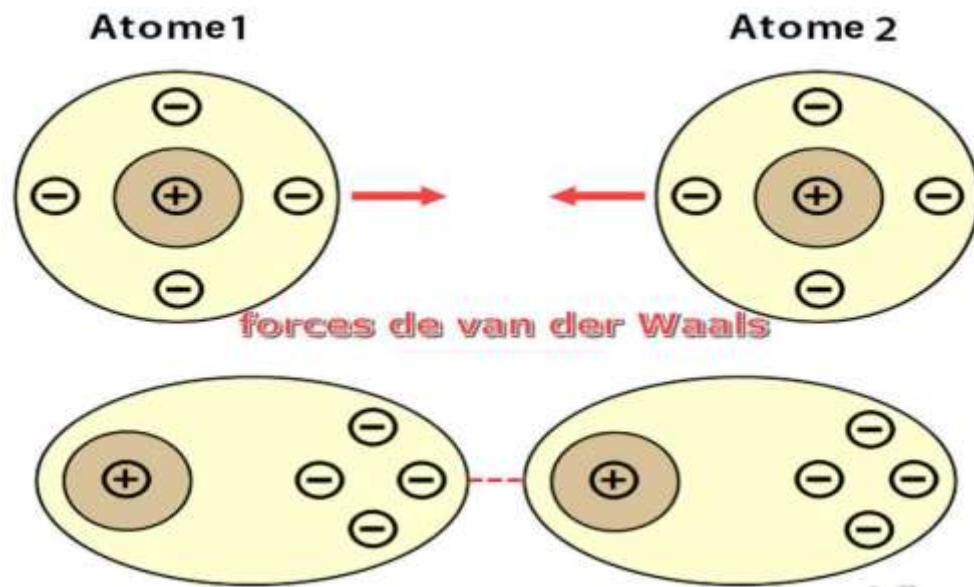


Figure 18 : Intérction de Van der waals

1.5.3.4 INTERACTIONS PONT-HYDROGENE :

Les liaisons hydrogène sont des interactions directionnelles cruciales impliquant un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (donneur de liaison hydrogène) et un autre atome électronégatif avec un doublet non liant ou une densité électronique négative (accepteur de liaison hydrogène) (**Figure 19**) (Jeffrey, 1997). Elles jouent un rôle essentiel dans la spécificité et l'affinité de la liaison ligand-récepteur.

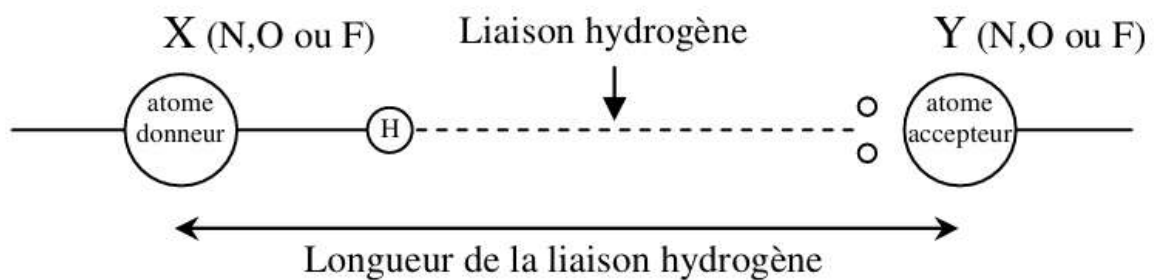


Figure 19 : Liaison d'hydrogène (Cavillon,2008)

1.5.3.5 LES INTERACTIONS DIPOLAIRES :

Les interactions dipolaires se produisent entre des molécules ou des parties de molécules possédant des moments dipolaires permanents (Kumar et Chaudhary, 2021). L'alignement favorable de ces dipôles peut conduire à une attraction électrostatique, contribuant à la stabilisation du complexe ligand-récepteur. Ces interactions sont incluses dans le terme électrostatique général des fonctions de score basées sur un champ de force.

1.5.3.6 INTERACTIONS « π - π » ET « CATION- π » :

Ce type d'interaction peut s'expliquer par la présence préférentielle de certains résidus, dont les résidus Arg, Trp et Tyr (Magis, 2007), au niveau des interfaces, de par leur aptitude à établir de interactions multiples (cation- π , π - π). Rapporté par les travaux de Munos, 2009.

Les deux types de liaisons peuvent coexister le long d'un même axe, permettant l'établissement de liaisons doubles [$\sigma\pi$] ou triples [$\sigma\pi\pi$]. La rotation des groupements atomiques autour de leur axe de liaison n'est possible que dans le cas d'une liaison simple de type σ . (Fox et al, 2001 ; Farhi, 2023).

- **Les Interactions Entre Systemes π :**

Les interactions π - π se produisent entre deux cycles aromatiques et peuvent être de nature empilée (face-à-face) ou en forme de T (bord-à-face) (Kumar et Chaudhary, 2021). Elles résultent de l'interaction entre les nuages électroniques π des cycles.

- **Les Interactions Cation- π :**

Les interactions cation- π impliquent l'attraction entre un cation et le nuage électronique π d'un cycle aromatique (Dougherty, 2013) (**Figure 20**). Ces interactions peuvent être particulièrement fortes et sont souvent observées impliquant des résidus d'acides aminés aromatiques (Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane) et des ligands contenant des groupes chargés positivement (Dougherty, 2013).

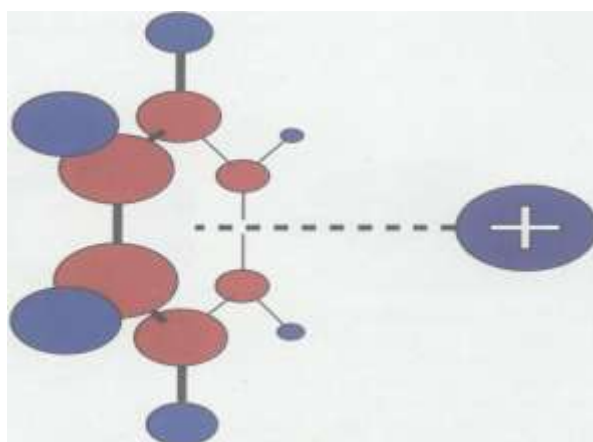


Figure 20 : L'interaction cation- π , montrant une charge positive générique interagissant avec le benzène (les hydrogènes sont bleus, les carbones rouges). (Dougherty, 2013).

1.5.3.7 LES INTERACTIONS IMPLIQUANT DES METAUX :

Certains sites de liaison de protéines contiennent des ions métalliques qui peuvent interagir directement avec le ligand, Ces interactions de coordination métal-ligand sont souvent fortes et directionnelles, et leur modélisation précise est importante pour le docking (Dudev et Lim, 2014).

Les résidus impliqués dans ce type d'interaction sont principalement l'aspartate, le glutamate, l'histidine et la cystéine, et les principaux ions métalliques rencontrés sont le zinc, fer, le calcium, le magnésium, le cuivre et le manganèse. (Freindorf et Shao,2005 ; Farhi,2023).

1.5.4 ENERGIE LIBRE DE LIAISON :

Les conformations du complexe sont ordonnées selon leurs énergies libres (ΔG_{bind}) croissantes par la fonction de score formulées à partir de l'équation suivante :

$$\Delta G_{bind} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hydrophobiques} + \Delta G_{liaison\ hydrogène} + \Delta G_{déformation} + \Delta G_o$$

Vdw : interactions de van der Waals.

ΔG_o : constante qui exprime la perte d'entropie due à la déformation du complexe

C'est globalement une approximation de l'énergie libre résultant du passage de la forme libre de la protéine et du ligand à l'association sous forme de complexe (Bahar,1997 ; farhi,2023).

L'objectif ultime du docking moléculaire est souvent d'estimer l'énergie libre de liaison ($\Delta G_{binding}$) entre le ligand et le récepteur, car cette valeur est directement liée à l'affinité de liaison expérimentale (K_d ou IC_{50}) par l'équation :

$$\Delta G = -RT \ln K_{eq} = \Delta H - T \Delta S = \Delta G_{complexe} - \Delta G_{ligand} - \Delta G_{protéine}$$

R est la constante des gaz parfaits et T est la température absolue. L'énergie libre de liaison est une grandeur thermodynamique qui prend en compte les contributions enthalpiques (interactions directes) et entropiques (changement de désordre du système) du processus de liaison (Wang et al., 2015)

La constante d'équilibre K_{eq} (affinité de liaison), qui est le rapport de K_A (K_{on}), constante d'association du complexe, sur K_D (K_{off}), constante de dissociation. (Barkema et Mousseau ,1996 ; farhi,2023).

L'énergie libre de liaison est égale à la somme des contributions enthalpiques et entropiques à la stabilité du complexe : enthalpies ΔH (Energie d'interaction) et entropiques ΔS (désordre) à la stabilité du complexe. (Yun,2006 ; Farhi,2023).

T : température absolue

$K > 1$ et $\Delta G < 0$: équilibre en faveur de [P-L]

$K < 1$ et $\Delta G > 0$: équilibre en faveur de [P] et [L]

$K = 1$ et $\Delta G = 0$: $[P-L] = [P] [L]$

1.5.5 LES LOGICIELS DE DOCKING :

De nombreux logiciels de docking moléculaire, commerciaux et académiques, ont été développés, chacun employant différents algorithmes de recherche et fonctions de score (Meng et al., 2011 ; Pagadala et al., 2017). Parmi les logiciels populaires, on trouve AutoDock et AutoDock Vina, GOLD, Glide, MOE Dock, rDock, LeDock, et d'autres (Meng et al., 2011 ; Pagadala et al., 2017).

Le choix du logiciel dépend de plusieurs facteurs, notamment le type de système étudié (flexibilité du récepteur, présence de métaux), les ressources computationnelles disponibles et le compromis souhaité entre précision et vitesse de calcul (Meng et al., 2011).

Le protocole de la plupart des logiciels de docking développés se décompose en trois étapes (Derreumaux et Mousseau, 2007 ; Farhi,2023).

- Représentation du système.
- Algorithme de recherche, grâce auquel l'espace conformationnel de chacune des molécules est balayé.
- L'affinité entre les molécules dockées est testée par le biais d'une fonction, appelée fonction de scoring.

L'algorithme de docking doit calculer l'énergie de formation du complexe afin de déterminer si la réaction est favorable énergétiquement ou non. (Gruebele et Schulten, 2008 ; Farhi,2023).

2 MATERIEL ET METHODES :

2.1 CHOIX DU MODELE PROTEIQUE POUR LE DOCKING MOLECULAIRE :

Dans le cadre de l'évaluation in silico du potentiel inhibiteur de composés flavonoïdes ciblant l'enzyme cyclooxygénase-2 (COX-2), la sélection d'un modèle protéique fiable, représentatif et biologiquement pertinent est une étape cruciale. À cet effet, la structure cristallographique 5IKR, disponible dans la Protein Data Bank (PDB), a été choisie pour servir de support au docking moléculaire.

La structure 5IKR correspond à l'enzyme COX-2 humaine (Homo sapiens), co-cristallisée avec un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), l'acide méfénamique, ce qui en fait un modèle de référence pour l'étude de l'inhibition de la COX-2 (Smith et al., 2000)

Toutes les informations de la 5IKR ont été récoltés à partir de la base de données pdb qui une base de données.

2.1.1 UTILISATION DES BASES DE DONNEES POUR LA SELECTION DU MODELE :

Pour la sélection de la protéine cox2 qui fera l'objet de l'étude du docking moléculaire, plusieurs bases de données spécialisées ont été consultées :

NCBI : fournit des informations génétiques, structurales et fonctionnelles sur les protéines.

PDBsum : offre un aperçu détaillé des structures déposées dans la PDB, incluant les interactions ligand-protéine, les caractéristiques structurales, ainsi que les paramètres expérimentaux.

Ces ressources offrent des éléments essentiels pour évaluer la qualité d'une structure, notamment :

- La structure tridimensionnelle de la protéine.
- L'organisme d'origine.
- La méthode d'obtention de la structure (ex. : cristallographie aux rayons X, résonance magnétique nucléaire).
- Le facteur R, indicateur de la qualité cristallographique (un facteur R proche de 0 signale un modèle précis).
- La résolution cristallographique, où une résolution inférieure ou égale à 2 Å témoigne d'une structure de haute qualité (Marnett et al., 1999)

2.1.2 CRITERES DE SELECTION DU MODELE 5IKR POUR ETUDE DU DOCKING :

Toutes les informations de la 5IKR ont été récoltés à partir de la base de données pdb qui une base de données.

Nous avons choisi étude du docking moléculaire la structure 5IKR. Ce choix repose sur plusieurs critères scientifiques rigoureux :

- Origine humaine (Homo sapiens) : garantit la pertinence biologique des résultats, en lien direct avec les cibles pharmacologiques des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) chez l'homme (Berman et al., 2000)

- Bonne résolution cristallographique (2,34 Å) : une résolution inférieure à 2,5 Å est généralement considérée comme suffisante pour assurer une représentation précise des atomes et des résidus du site actif, ce qui est essentiel pour des prédictions fiables en docking moléculaire (Warner et Mitchell, 2004)

- Présence d'un ligand co-cristallisé (acide méfénamique) : cet AINS interagit de manière réversible avec la poche catalytique de la COX-2, permettant une meilleure définition du site actif pour le docking de nouvelles molécules.

Ainsi, la structure 5IKR constitue un modèle de référence pour l'étude de l'affinité de flavonoïdes en tant que potentiels inhibiteurs de la COX-2. Ce modèle permet à la fois une comparaison structurale avec un inhibiteur connu et la sélection rationnelle du flavonoïde le plus prometteur sur la base de ses interactions moléculaires avec la COX-2 humaine.

2.1.3 CRITERES DE QUALITE D'UNE STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE :

Une structure cristallographique est considérée de haute qualité si :

- Le facteur R avoisine 0,2

- La résolution est inférieure ou égale à 2 Å (Marnett et al., 1999)

Ces critères garantissent la fiabilité des analyses structurales, indispensables pour mener des études de docking moléculaire précises

2.1.4 DETAILS SUR LA STRUCTURE SELECTIONNEE : 5IKR CO-CRISTALLISEE AVEC L'ACIDE MEFENAMIQUE :

La structure 5IKR présente les caractéristiques suivantes :

Classification enzymatique : Oxidoreductase

Organisme source : Homo sapiens

Système d'expression : Spodoptera frugiperda

Méthode d'obtention : Cristallographie aux rayons X

Résolution : 2,34 Å

Mutations : Aucune

Référence PDB : DOI : 10.2210/pdb5IKR/pdb

2.2 LIGANDS CO-CRISTALLISES:

La structure 5IKR contient plusieurs ligands co-cristallisés, notamment :

COH : Protoporphyrin IX contenant du monoxyde de carbone (CO).

BOG : Octyl β -D-glucopyranoside.

ID8 : 2-[(2,3-Diméthylphényl) amino] acide benzoïque (acide méfénamique).

NAG : 2-Acétamido-2-désoxy- β -D-glucopyranose.

NH₄ : Ion ammonium.

Profil pharmacologique de l'acide méfénamique :

Classe : AINS (Anti-inflammatoire non stéroïdien)

Structure : Dérivé de l'acide anthranilique (classe des fenamates) (**Figure21**)

Mécanisme d'action : Inhibition réversible des cyclooxygénases (COX-1 et COX-2)

L'acide méfénamique montre une inhibition significative de COX-2, mais non sélective : il inhibe aussi la COX-1.

Valeurs de CI 50 pour COX-2 : généralement autour de 0,1 à 1 μ M, selon les études (Warner et al., 1999 ; Hinz et al., 2000).

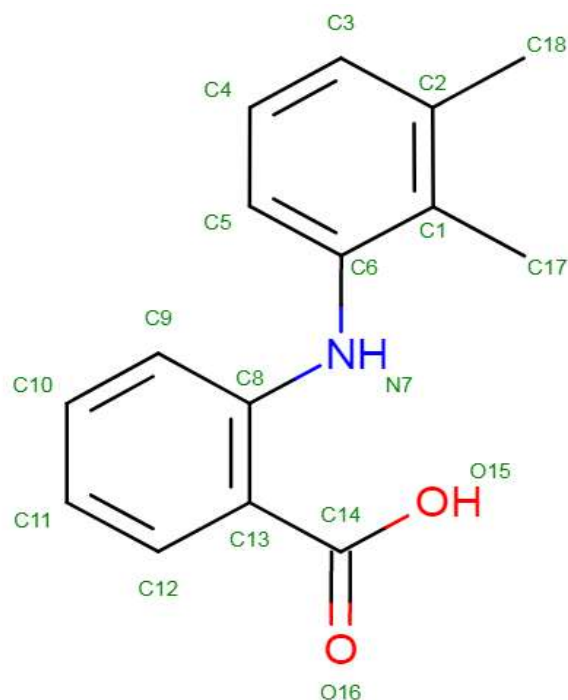


Figure21 : L'acide méfénamique (pubchem)

2.3 DOCKING MOLÉCULAIRE AVEC MOE (MOLECULAR OPERATING ENVIRONMENT) :

MOE est un logiciel de modélisation moléculaire largement utilisé pour la conception de médicaments.

Le logiciel MOE donne la structure 3D de la protéine cox2, code 5IKR co cristallisée avec acide méfénamique,

Préparation de la Protéine 5IKR pour l'étude de Docking Moléculaire :

- **Identification et sélection de la sous-unité active :**

Avant d'entreprendre la préparation de la protéine 5IKR pour l'étude de docking moléculaire, il est essentiel de procéder à l'identification précise de la sous-unité contenant le site actif responsable de l'interaction avec les ligands.

La protéine 5IKR correspond à la structure cristallographique de la cyclooxygénase-2 (COX-2) complexée avec l'acide niflumique, un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) inhibiteur sélectif de COX-2.

- **Évaluation de la qualité structurale et sélection de la chaîne du modèle 5IKR :**

Afin de garantir la fiabilité des résultats du docking moléculaire, la qualité de la structure cristallographique sélectionnée a été évaluée à partir des informations disponibles sur la banque de données PDB (Protein Data Bank). La protéine cox 2, code 5IKR, humaine complexée à un inhibiteur, présente deux entités distinctes (5IKR_IDB_A_601 et 5IKR_IDB_B_602) dont les paramètres de validation sont rapportés dans le **tableau** ci-dessous :

Tableau 7 : caractéristiques des deux entités (5IKR_IDB_A_601 et 5IKR_IDB_B_602) (pdb banck)

Identifier	Ranking for goodness of fit	Ranking for geometry	Real space R factor	Real space correlation coefficient	RMSZ-bond-length	RMSZ-bond-angle	Outliers of bond length	Outliers of bond angle	Atomic clashes	Stereochemical errors	Model completeness	Average occupancy
5IKR_IDB_A_601	91%	16%	0.061	0.948	2.04	1.69	9	4	4	0	100%	1
5IKR_IDB_B_602	80%	16%	0.078	0.927	1.65	2.06	3	5	9	0	100%	1

Les deux entités présentent des indices de qualité satisfaisants. Le facteur R (Real space R factor) est inférieur à 0,1 pour les deux chaînes, indiquant une bonne adéquation entre la densité électronique observée et celle calculée. Le coefficient de corrélation en espace réel (Real space correlation coefficient) est également élevé (>0,9), confirmant la bonne correspondance du modèle avec la carte de densité électronique.

Les valeurs RMSZ (Root Mean Square Z-score) des longueurs et angles de liaisons sont proches de 2, ce qui est acceptable. Le nombre d'outliers stéréochimiques (atomes ayant des géométries aberrantes) reste faible, tout comme le nombre de clashes atomiques, ce qui témoigne de la bonne qualité globale du modèle.

- **Sélection de la chaîne pour les études de docking**

La structure cristallisée du modèle 5IKR présente quatre chaînes identiques (A, B, C et D) (**Figure23**), résultant de l'arrangement symétrique des molécules de COX-2 dans le cristal. Cependant, afin de simplifier les calculs et de limiter les risques d'interférences entre chaînes lors des simulations de docking moléculaire, seule une chaîne représentative a été conservée. La chaîne A a ainsi été sélectionnée pour les étapes ultérieures de préparation du récepteur et d'amarrage moléculaire.

- **Nettoyage de la structure** : suppression des éléments non essentiels

Après importation de la protéine dans le logiciel MOE (Molecular Operating Environment), les étapes suivantes ont été réalisées :

- Suppression des molécules d'eau : Les molécules d'eau présentes dans les structures cristallines peuvent interférer avec le docking si elles ne sont pas directement impliquées dans la stabilisation du ligand. Les molécules ont été supprimées.

- Suppression des chaînes B, C et D : Les trois chaînes supplémentaires, identiques à la chaîne A, ont été éliminées.

- Suppression des petites molécules annexes, à l'exception du ligand principal (acide niflumique) et de certaines molécules fonctionnelles importantes comme :

- HEM (hème) : L'hème est un groupe prosthétique contenant un ion ferreux (Fe^{2+}), essentiel pour l'activité enzymatique de COX-2. Il participe directement à la catalyse de l'oxydation de l'acide arachidonique en prostaglandines, des médiateurs clés de l'inflammation.

- NAG (N-acétylglucosamine) : Le NAG est un sucre dérivé de la glucosamine, impliqué dans la glycosylation des protéines. Ce processus contribue à stabiliser la structure tridimensionnelle de COX-2 et à moduler sa fonction biologique.

- COH (Protoporphyrin IX contenant du CO) : Le COH correspond à une protoporphyrine IX complexe avec du monoxyde de carbone (CO). La protoporphyrine IX est le précurseur de l'hème ; la présence de CO peut influencer l'état oxydatif et la fonction catalytique de l'enzyme.

- BOG (octyl- β -D-glucopyranoside) : Le BOG est un détergent doux utilisé pour stabiliser les protéines membranaires. Dans la structure cristallographique, il aide à maintenir la solubilité et l'intégrité structurelle de COX-2 en mimant l'environnement lipidique naturel.

- ID8 (2-[(2,3-diméthylphényl) amino] acide benzoïque) : L'ID8 est l'inhibiteur co-cristallisé principal dans cette structure, correspondant à un dérivé de l'acide niflumique. Il se lie au site actif de COX-2 et bloque la conversion de l'acide arachidonique, inhibant ainsi la production de prostaglandines.

-NH₄ (ion ammonium) : L'ion ammonium (NH₄⁺) est souvent présent comme un artefact de cristallisation. Il peut contribuer à la stabilisation électrostatique de la structure sans interagir spécifiquement avec le site actif.

La présence de ces ligands biologiques participe à la stabilité de la protéine cristallisée et reflète mieux son état fonctionnel *in vivo*.

La suppression des éléments non essentiels (eau, chaînes supplémentaires, ligands accessoires) réduit la complexité du système et optimise la précision de l'analyse des interactions ligand-protéine.

Toutefois, pour l'étude de docking, seule la chaîne A, contenant le site actif et complexée avec son ligand co-cristallisé, a été conservée pour l'étape de docking.

Le ligand co cristallisé est Acide niflumique, un inhibiteur compétitif sélectif de la COX-2. Sa présence dans le site actif permet de définir précisément la région de docking et d'analyser les modes d'interaction.

Le logiciel MOE fournit également des informations relatives à la structure primaire de la sous-unité (séquence des acides aminés) ainsi qu'à sa structure secondaire, en identifiant les éléments structuraux tels que les hélices α , les feuillets β et les coudes.

2.4 LES ETAPES DU DOCKING MOLECULAIRE :

Le docking moléculaire comporte les étapes suivantes

1-Préparation : Préparer la protéine et le ligand en optimisant leur structure et en ajoutant les informations nécessaires.

2-Recherche de poses : Générer différentes configurations du ligand dans le site actif de la protéine.

3-Scoring : Évaluer la qualité de chaque pose en calculant un score basé sur l'interaction entre les atomes.

4-Sélection : Choisir la pose avec le score le plus élevé, indiquant la meilleure interaction possible.

5 -Analyse : Examiner les résultats pour comprendre comment le ligand se lie à la protéine.

2.4.1 PREPARATION DES STRUCTURES :

2.4.1.1 PREPARATION INITIALE DE LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE 5IKR POUR LE DOCKING MOLECULAIRE

La première étape de l'étude de docking moléculaire consiste à importer la structure cristallographique 5IKR dans le logiciel MOE (Molecular Operating Environment). Cette structure correspond à la cyclooxygénase-2 (COX-2) co-cristallisée avec un inhibiteur, l'acide méfénamique (**Figure 22**).

Avant de procéder à la préparation complète de la protéine pour le docking, il est essentiel d'effectuer un premier nettoyage de la structure. Cette étape consiste à sélectionner uniquement la sous-unité A de la protéine 5IKR (**Figure 24**) et à éliminer toutes les molécules d'eau ainsi que les entités non protéiques associées (telles que les ions, cofacteurs ou autres ligands secondaires).

La conservation exclusive de la chaîne A vise à simplifier l'étude en se concentrant sur une seule unité fonctionnelle de la protéine, ce qui évite les interférences éventuelles dues aux formes multimériques souvent présentes dans les structures cristallographiques. De même, l'élimination des molécules d'eau est importante car leur présence peut perturber l'interaction du ligand avec le site actif lors du docking.

Le ligand co-cristallisé, l'acide méfénamique, doit être conservé car il joue un rôle essentiel : il permet d'identifier précisément le site actif de la protéine et sert de référence pour évaluer la fiabilité du protocole de docking.

Ainsi, à l'issue de cette phase de préparation initiale, seules deux entités la sous-unité A (**Figure 23**) de la protéine COX-2 (5IKR) et le ligand co-cristallisé (acide méfénamique) doivent être conservées. (**Figure 25**).

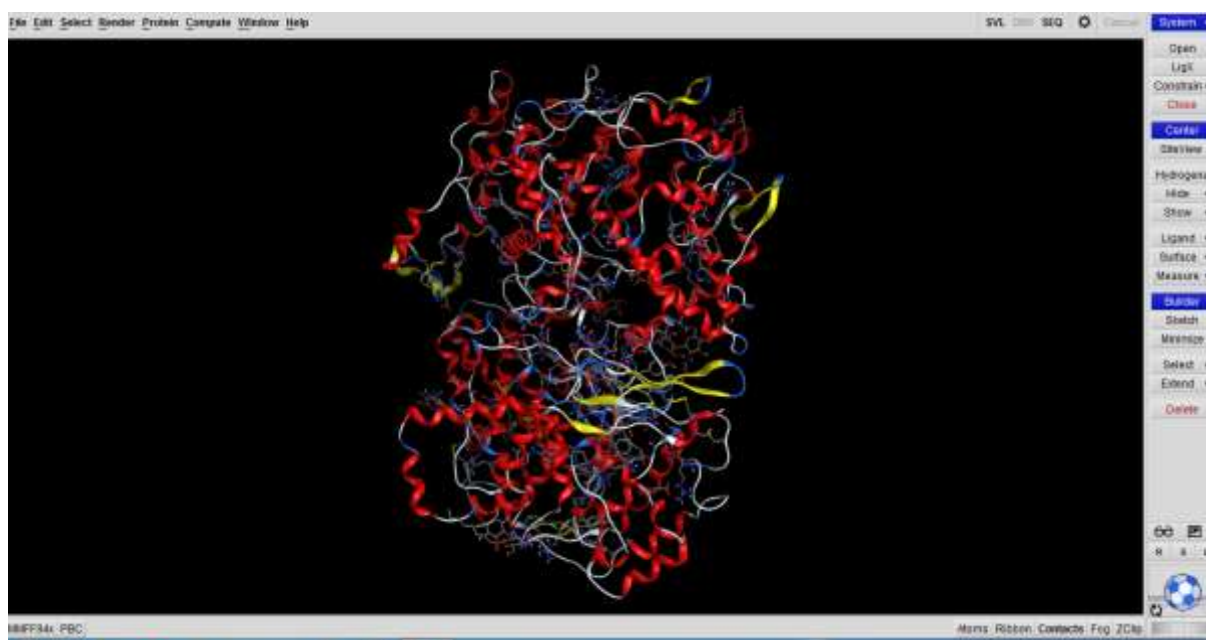


Figure 22 : Structure 3D de la protéine cible cox 2 (code 5IKR)

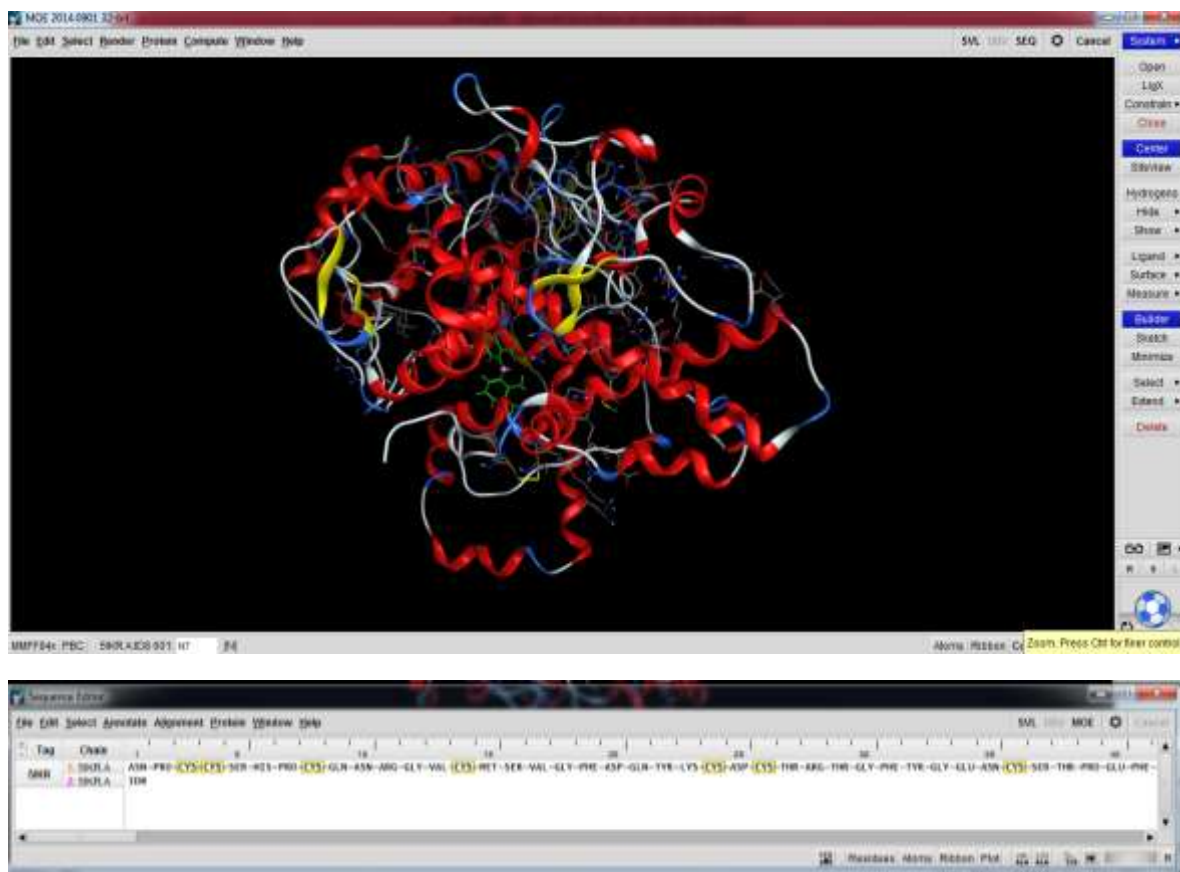


Figure 25 : Structure de la sous unité A de la 5 IKR co cristallisée avec acide méfénamique (IBR)

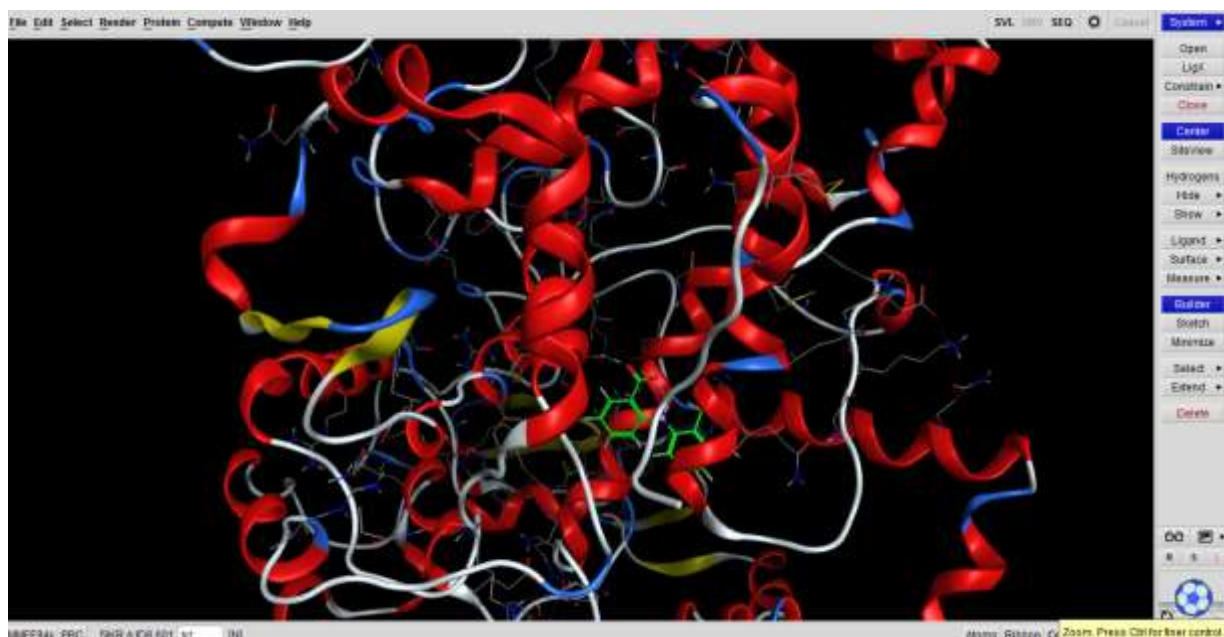


Figure 26 : Localisation de Acide méfénamique dans la sous unité A de la 5IKR

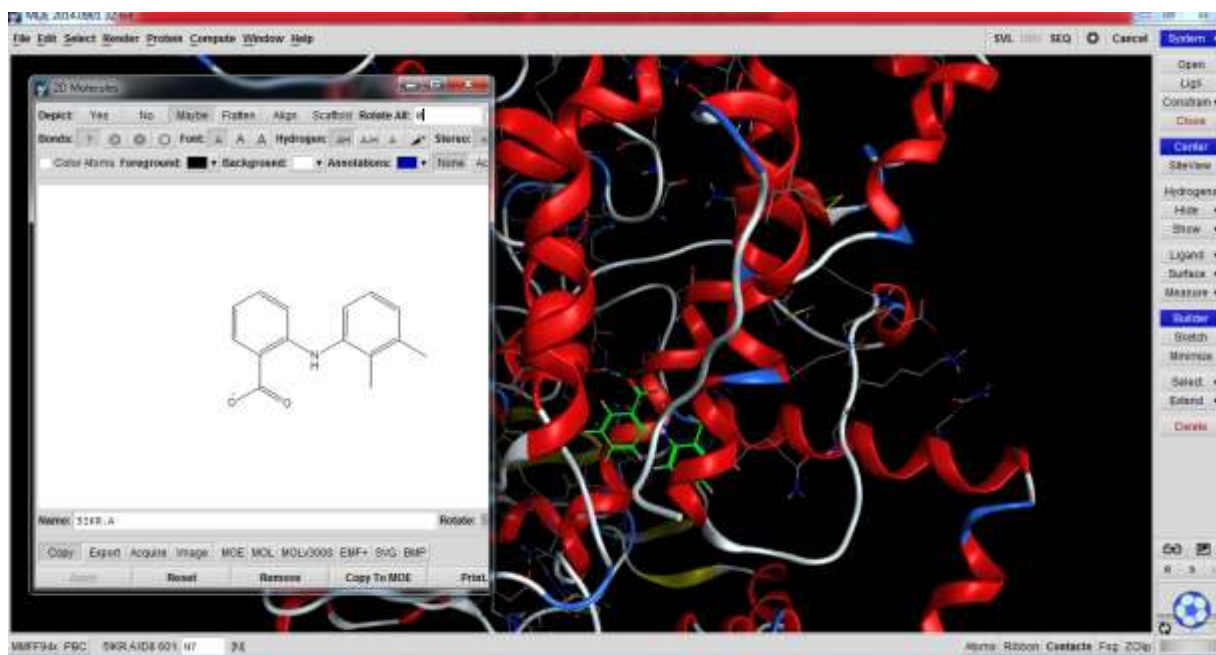
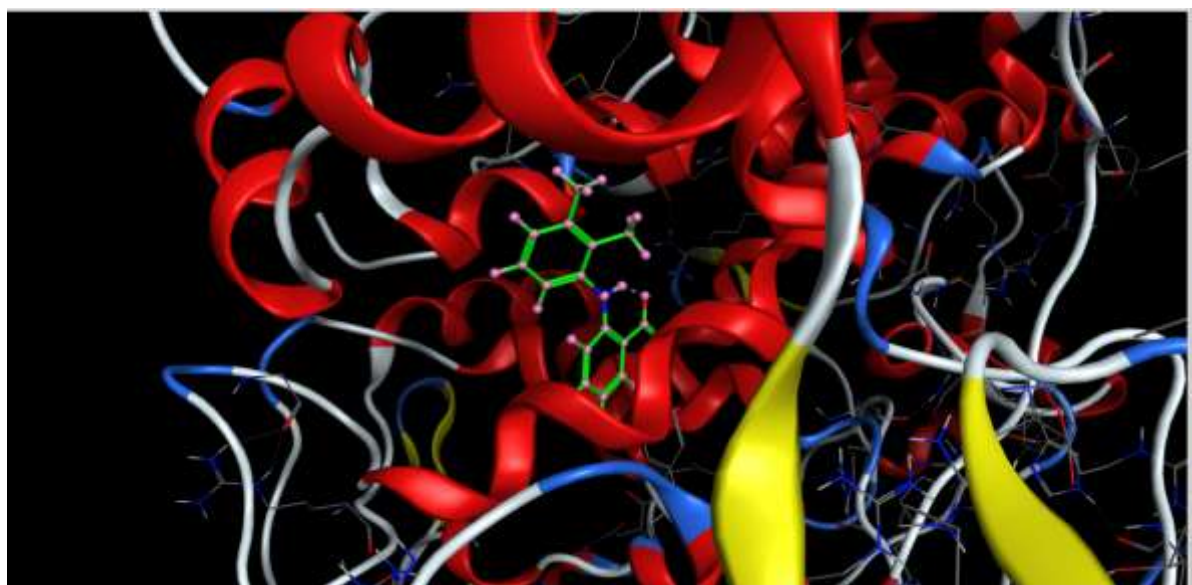


Figure 27 : Structure 2D de l'acide méfénamique



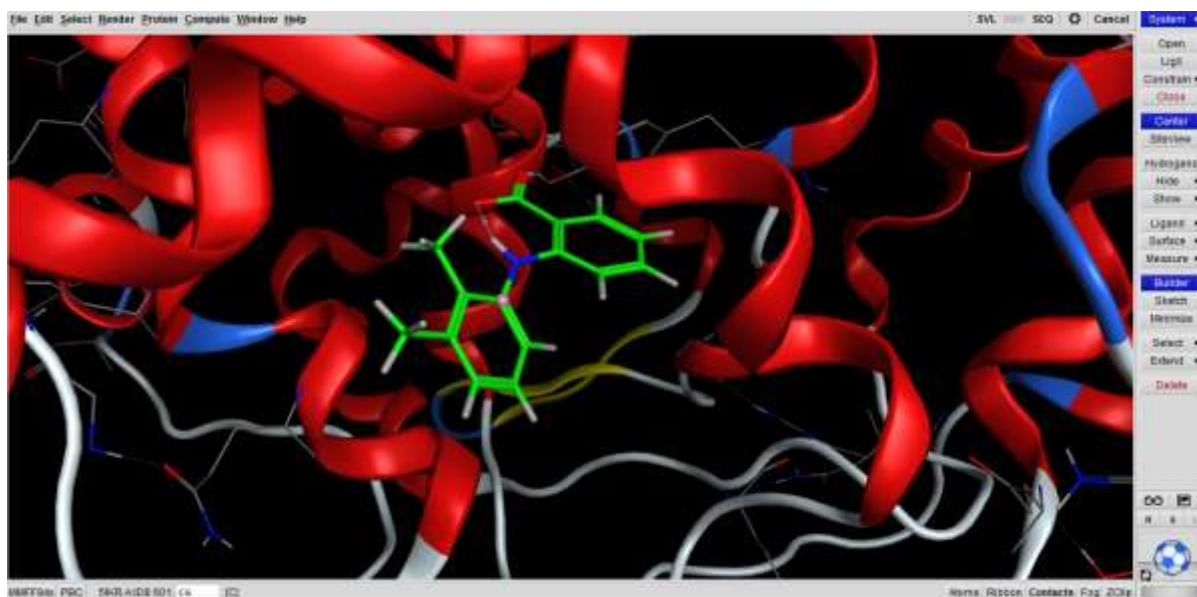


Figure28 : les interactions entre le site active et l'acide méfénamique

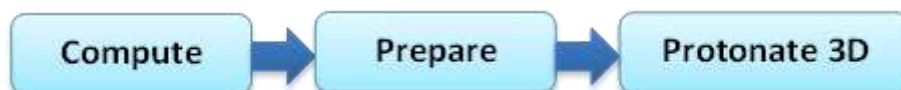
Description des étapes de préparation de la protéine :

Reconstruction de l'hydrogène :

La structure de protéine en 3D téléchargée à partir du PDB (Protein Data Bank), ne contient pas les atomes d'hydrogène. Cela est dû en partie au fait que les atomes d'hydrogène sont très petits et difficiles à détecter par les techniques de cristallographie aux rayons X, qui sont souvent utilisées pour déterminer la structure des protéines.

Cependant, il est possible d'ajouter des atomes d'hydrogène à la structure de la protéine après l'avoir téléchargée à partir du PDB, En utilisant des programmes informatiques spécialisés, Le MOE peut prédire leurs positions en fonction des positions des autres atomes dans la protéine.

Cette opération est réalisée par la fonctionnalité suivante :



Le MOE corrige la protonation, les angles de liaisons, les longueurs de liaisons et d'autres inexactitudes dans la structure.

Cliquer sur compute prepare protonate 3D OK la préparation a commencé, les corrections ont démarré, cela prendra un moment et les corrections que le MOE apporte dans le structure

Fonctionnalité hide hydrogenes :

Il est courant de cacher les hydrogènes pour simplifier la représentation de la molécule pour les raisons suivantes : simplification de la visualisation. En masquant les hydrogènes, on réduit la taille du système à étudier, ce qui peut faciliter le calcul et l'analyse des interactions entre les atomes importants.

Cliquer sur Hide /hydrogen

Cacher les hydrogènes pour rendre plus accessible le site de fixation.

Réparer les cassures des liaisons lors de la synthèse :

Il est possible que des acides aminés soient perdus ou que des liaisons covalentes soient rompues en raison de l'interaction de la protéine avec le milieu de cristallisation ou avec les rayons X utilisés pour la cristallographie.

La fonctionnalité "Compute Connected and Type" de MOE en relation avec la correction de modèles de structures de protéines. Elle peut aider à identifier et à corriger ces problèmes en reconstruisant les liaisons covalentes manquantes ou en ajoutant des atomes manquants dans la structure de la protéine



Le nombre de réparations est indiquée dans cette fenêtre cliquer OK

Pour le potentiel :

La fonctionnalité « Compute Potential Fix" dans le logiciel MOE, permet de calculer les énergies de fixation potentielles d'une petite molécule dans une protéine cible



Diagramme de Ramachandron :

Le logiciel MOE permet également d'évaluer la qualité structurale de la protéine à l'aide du diagramme de Ramachandran, qui analyse la distribution des angles de torsion ϕ (phi) et ψ (psi) des acides aminés. Il permet de visualiser les angles dièdres ψ (psi) et ϕ (phi) des liaisons peptidiques, ce qui est essentiel pour comprendre la structure tridimensionnelle des protéines et la précision de l'identification du site de liaison. L'objectif de l'analyse du diagramme de Ramachandran est de s'assurer que la structure de la protéine a été correctement modélisée et que les angles dièdres principaux sont conformes aux contraintes stéréochimiques.

Dans MOE, ce diagramme peut être généré en accédant au menu :

Protein → Geometry → ϕ/ψ Plot

Définition du Site de Fixation :

L'objectif de cette application est d'identifier les sites actifs ou les cavités de liaison sur la protéine où les ligands se fixeront.

La fonctionnalité du logiciel MOE permet de sélectionner le site de liaison des ligands



Cette application Site Finder permet d'explorer les sites de liaison potentiels d'une protéine cible avec des ligands. Cela permet d'identifier les régions de la protéine susceptibles de se lier à des molécules spécifiques.

On retient la size le plus large pour le docking, fait apparaître le site le plus large numéro1 avec un nombre maximum d'acides aminés.

Application dummies dans MOE sont utilisés pour représenter des points d'interaction potentiels dans le site actif d'une protéine lors de la recherche de ligands ou de substrats. Ils sont essentiels pour effectuer des simulations de docking moléculaire et pour comprendre comment différentes molécules se lient à la protéine cible.

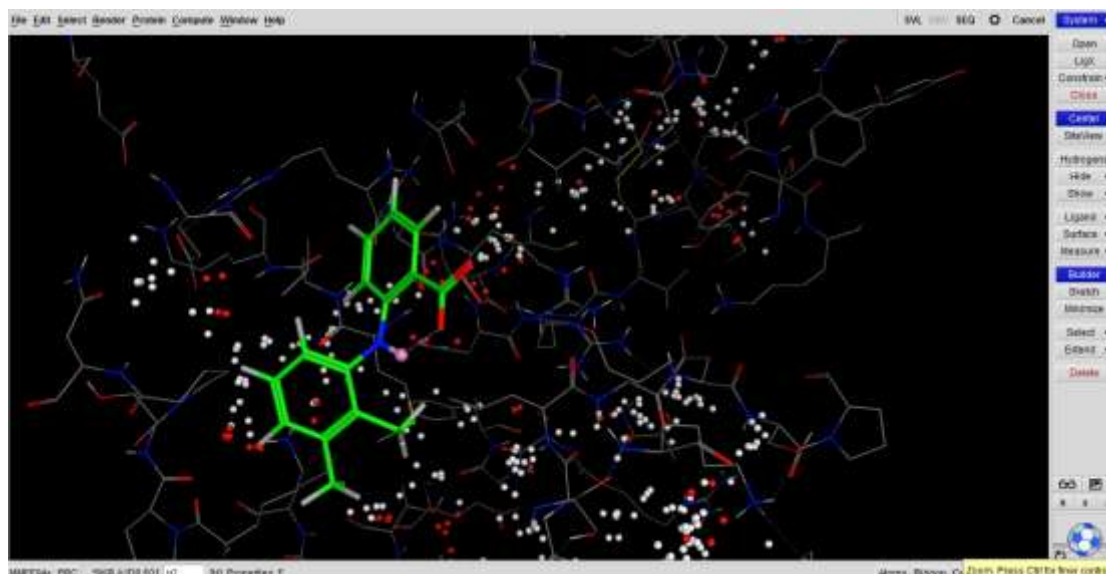


Figure 29 : resultat de l'application de Site Finder, localisation de site de liaison de la protéine.

Outil Site Finder de MOE pour localiser le site de liaison (binding site) de la protéine. Cet outil génère des petites billes sur la surface protéique :

Les billes rouges indiquent des régions hydrophiles du site de liaison (hydrophilic binding sites),

Les billes grises représentent des zones hydrophobes (hydrophobic binding sites).

Le site de liaison le plus large, souvent celui contenant le plus grand nombre d'acides aminés, correspond au site actif principal, où se trouve le ligand co-cristallisé.

Les petites billes qui s'affichent permettent d'obtenir une cartographie de la nature chimique du site, ce qui est crucial pour comprendre comment les ligands dockés pourraient interagir avec la protéine. **(Figure 29)**

L'étape suivante consiste à sauvegarder la sous A de la 5IKR sous extension moe qui servira pour l'étape du docking moléculaire **(Figure 30)**

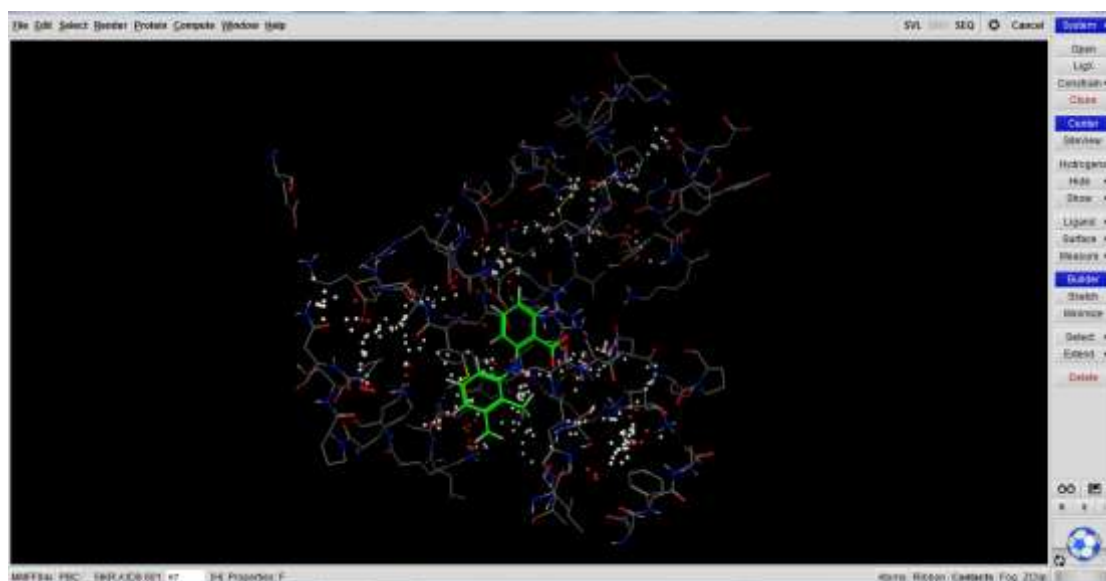


Figure 30 : Structure de la sous unité A de la 5IKR préparée pour le docking

2.4.1.2 PREPARATION DES LIGANDS POUR LE DOCKING MOLECULAIRE :

Caractéristiques structurales des flavonoïdes :

Dans le cadre de cette étude, plusieurs flavonoïdes ont été sélectionnés pour cette étude docking moléculaire

La structure de base des flavonoïdes partage une structure commune de type C6-C3-C6, composée de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par une chaîne à trois carbones formant un hétérocycle (cycle C). Selon les modifications apportées à ce squelette de base (saturation du cycle C, position et nombre de groupes hydroxyles, présence de cétone...), ils sont répartis en différentes classes : flavones, flavonols et flavanones.

Les caractéristiques structurales (**Tableau 8**), notamment le nombre et la position des groupes hydroxyles (-OH), influencent considérablement l'activité biologique de ces composés, notamment leur capacité à se lier à des cibles enzymatiques telles que la cyclooxygénase-2 (COX-2).

Tableau 8 : Classification structurale des flavonoïdes

Molécule	Classe	Groupes hydroxyles (-OH)	Caractéristiques structurales
Apigénine	Flavone	5, 7, 4'	Trihydroxyflavone, non substituée en position 3 (cycle C)
Lutéoline	Flavone	5, 7, 3', 4'	Tétrahydroxyflavone, forte polarité, substitution sur B
Chrysine	Flavone	5, 7	Faiblement substituée, pas de -OH sur cycle B
Quercétine	Flavonol	3, 5, 7, 3', 4'	Pentahydroxyflavonol, hautement polaire, très antioxydante
Kaempférol	Flavonol	3, 5, 7, 4'	Tétrahydroxyflavonol, moins polaire que la quercétine
Fisétin	Flavonol	3, 7, 3', 4'	Tétrahydroxy, cycle B riche en hydroxyles
Myricétine	Flavonol	3, 5, 7, 3', 4', 5'	Hexahydroxy, très polaire, forte activité de chélation
Galangine	Flavonol	3, 5, 7	Aucun groupe hydroxyle sur le cycle B, moins polaire
Naringénine	Flavanone	5, 7, 4'	Cycle C saturé (flavanone), structure non plane

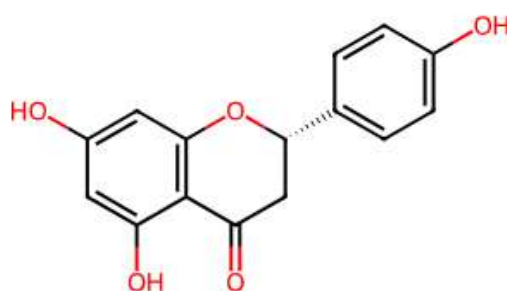
Flavones (Apigénine, Lutéoline, Chrysine) : caractérisées par une double liaison C2=C3 et une cétone en C4. L'absence d'un groupe hydroxyle en C3 distingue les flavones des flavonols. **(Figure31).**



Figure31 : structures des Flavones (pubchem)

Flavanones (Naringénine) : le cycle C est saturé, réduisant la planéité et la conjugaison électronique, ce qui peut moduler leur interaction avec la COX-2.

Le nombre et la position des groupes -OH influencent fortement l'hydrophilie, la capacité de chélation des métaux, et les interactions hydrogène avec les enzymes cibles. **(Figure32)**



Naringénine

Figure32 : structures des Flavanones(pubchem)

Flavonols (Quercétine, Kaempférol, Fisetin, Myricétine, Galangine) : possèdent un groupe -OH en C3 en plus de la cétone en C4, leur conférant une forte capacité antioxydante. (Figure33).

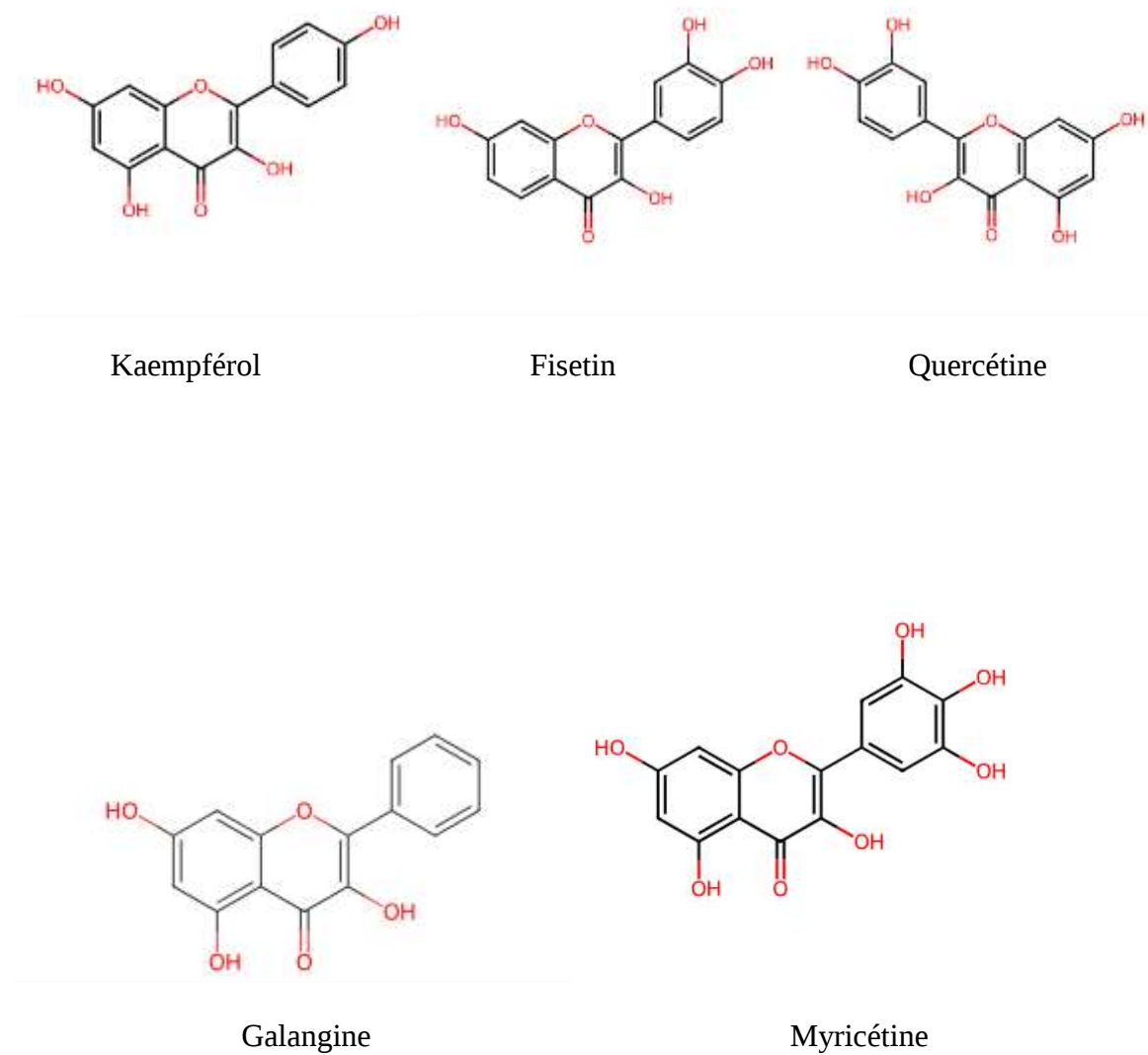


Figure33 : structures des Flavonols(pubchem)

Preparation des structures moléculaires :

Les représentations SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry System) des structures bidimensionnelles (2D) de tous les composés ont été importées de la base pub chem dans l'environnement MOE. Le format SMILES permet une représentation linéaire et unique de la structure chimique de chaque molécule (**Tableau9**). Les structures 2D importées ont été converties en modèles tridimensionnels (3D) par MOE.

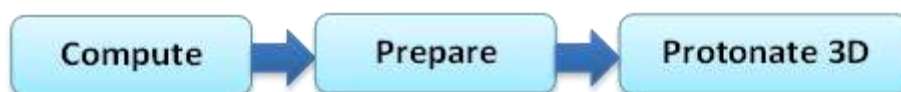
Tableau9 : structures bidimensionnelles SMILES des molécules

Molécule	Smiles
Lutéoline	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>
Fisetin	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(O2)C=C(C=C3)O)O)O)O</chem>
Myricétine	<chem>C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>
Apigénine	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>
Quercétine	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O)O</chem>
Kaempférol	<chem>C1=CC(=CC=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>
Chrysin	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O</chem>
Galangine	<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)O</chem>
Naringénine	<chem>C1[C@H](OC2=CC(=CC(=C2C1=O)O)O)C3=CC=C(C=C3)O</chem>

Les structures 3D générées ont ensuite été soumises à une série d'étapes de préparation visant à obtenir des géométries moléculaires plus adaptés pour le calcul des descripteurs et la modélisation docking :

-Hydrogénation 3D : Le but de l'hydrogénation 3D est de compléter la valence de chaque atome, en tenant compte de son environnement chimique. Les atomes d'hydrogène sont essentiels pour une représentation moléculaire complète et pour le calcul précis de nombreux descripteurs, notamment ceux liés aux interactions intermoléculaires et aux propriétés électroniques.

Il faut utiliser la commande :



-Ajout de charges : Des charges partielles ont été attribuées aux atomes de chaque molécule. L'ajout de charges est important car il permet de tenir compte de la distribution électronique au sein de la molécule. Ces charges influencent les interactions électrostatiques, qui jouent un rôle crucial dans la liaison des molécules aux cibles biologiques (comme la COX-2) et dans leurs propriétés physicochimiques.

Il faut utiliser la commande :



- **Minimisation d'Énergie** : Les structures 3D avec les hydrogènes et les charges ajoutées ont été soumises à une optimisation de la géométrie à l'aide de l'application MOPAC-AM1 dans MOE. L'optimisation énergétique a pour but de trouver la conformation de chaque molécule qui correspond à un minimum d'énergie potentielle. Cette conformation est considérée comme la plus stable et plus représentative de la structure que la molécule pourrait adopter lors de son interaction avec la cible biologique.

Il faut utiliser la commande :



Application MOPAC (Molecular Orbital PACkage) et AM1(Austin Model1) rapidité des calculs, le calcul évaluera la structure électronique et l'énergétique du site actif

L'étape suivante consiste à sauvegarder ces molécules sous extension moe

Après ces deux étapes de préparation des structures (protéine et ligands) commence l'étape du docking moléculaire :

2.4.2 LE DOCKING :

La dernière étape du docking moléculaire consiste à déterminer l'énergie de liaison entre ligand et la protéine, ainsi que la nature des interactions formées entre eux. Cette étape est cruciale pour évaluer la qualité de l'interaction et prédire l'affinité du ligand pour la protéine cible.

2.4.2.1 PLACEMENT DU LIGAND :

Recherche de différentes conformations du ligand adaptées à la boîte de recherche.
Génération de multiples poses.

2.4.2.2 SCORING ET ANALYSE :

Chaque pose est évaluée à l'aide d'un score d'interaction exprimé en Kcal/mol

Le score indique la force potentielle de liaison entre les composés et la protéine.

Le score peut être utilisé pour comparer différentes poses (conformations) du ligand dans le site actif de la protéine, et pour sélectionner la pose la plus probable plus stable, en classant les composés en fonction de leur score de docking.

Un score plus négatif indique que l'interaction ligand-récepteur est plus favorable sur le plan énergétique, ce qui suggère une plus grande affinité et une plus grande stabilité du complexe ligand-récepteur.

Si le score de liaison est positif, cela suggère généralement une interaction moins favorable entre le ligand et le récepteur. Un score positif indique que l'interaction entre le ligand et le récepteur est moins stable du point de vue énergétique.

-Calcul du RMSD (Root Mean Square Deviation) pour comparer la similarité structurale entre les poses des composés testés et celle du ligand original.

Le RMSD est exprimé en angstroms (Å) est souvent utilisé pour évaluer la qualité de la superposition de deux structures moléculaires et également pour évaluer la qualité d'un alignement de structures ou pour comparer la conformation d'un ligand dans un site actif avec celle d'un ligand cristallisé. Un RMSD élevé indique que les deux structures sont très différentes, tandis qu'un RMSD faible indique que les deux structures sont très similaires.

La prédiction est acceptable si sa valeur de RMSD ne dépasse pas 2 Å (angströms), il est considéré comme un amarrage réussi, et que les deux structures sont très similaires.

-Sélection des meilleures poses en fonction de l'affinité et de la similitude structurale.

2.4.2.3 VISUALISATION DES RESULTATS :

-Visualisation des interactions ligand-protéine (liaisons hydrogène, interactions hydrophobes...).

-Analyse des propriétés énergétiques.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION:

3.1 STRUCTURE DE LA CYCLOOXYGENASE-2 (COX-2) HUMAINE (PDB ID 5IKR) :

La séquence primaire de la chaîne A de la protéine COX-2 humaine (identifiée dans la Protein Data Bank sous le code 5IKR) a été déterminée par analyse bio-informatique à l'aide du logiciel MOE (Molecular Operating Environment). Cette chaîne polypeptidique est constituée de 551 résidus d'acides aminés, présentant une Asparagine (Asn, N) comme extrémité N-terminale et une Proline (Pro, P) comme extrémité C-terminale (**Figure34**)



Figure34 : représentation de la composition de la structure primaire de la chaîne A de la 5IKR

La séquence primaire complète est la suivante : >5ikr:A

```
NPCCSHPCQNRGVCMSVGFDQYKCDCTRTGFYGENCSTPEFLTRIKLFLKPTPNTVH
YILTHFKGFWNVVNNIPFLRNAIMSYVLTSRSHLIDSPPTYNADYGYKSWEAFSNLSY
YTRALPPVPDDCPTPLGVKGKKQLPDSNEIVEKLLLRRKFIPDPQGSNMMFAFFAQH
FTHQFFKTDHKRGPAFTNGLGHGVDLNHIYGETLARQRKLRLFKDGKMKYQIIDGE
MYPPTVKDTQAEMIYPPQVPEHLRFVAVGQEVFGLVPGLMMYATIWLREHNRVCDV
LKQEHPEWGDEQLFQTSRLILIGETIKIVIEDYVQHLSGYHFKLKFDPELLFNKQFQYQ
NRIAAEFNTLYHWHPLLPDTFQIHDQKYNYYQFIYNNISILLEHGITQFVESFTRQIAGR
VAGGRNVPPAVQKVSQASIDQSRQMKYQSFNEYRKRFMLKPYESFEELTGEKEMSA
ELEALYGDIDAVELYPALLVEKPRPDAIFGETMVEVGAPFSLKGLMGNVICSPAYWK
PSTFGGEVGFQIINTASIQSLICNNVKGCPFTSFSVP.
```

En raison de l'encombrement stérique des chaînes latérales des acides aminés et des contraintes angulaires des liaisons peptidiques, la chaîne polypeptidique n'adopte pas une conformation linéaire mais se replie pour former des structures secondaires.

Les trois types principaux sont l'hélice α (structure en spirale stabilisée par des liaisons hydrogène intramoléculaires), le feuillet plissé β (structure étendue formée de brins polypeptidiques liés par des liaisons hydrogène inter-brins, pouvant être parallèles ou antiparallèles), et les coudes (régions connectant les éléments de structure secondaire).

Dans la structure secondaire d'une protéine, un "turn" (ou coude) désigne une courte portion de la chaîne polypeptidique qui provoque un changement de direction de la chaîne, souvent à la surface de la protéine

L'application du logiciel MOE, affiche les principaux types de structure secondaire (**Figure35**)

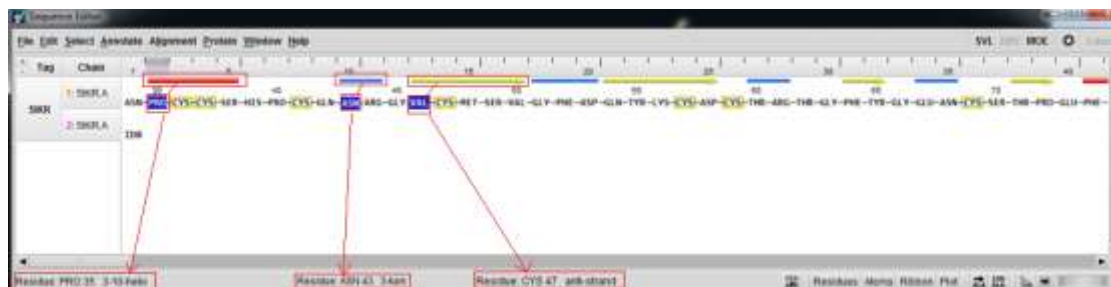


Figure35 : représentation des différents types de structure secondaire de la chaîne A de la 5IKR

La structure secondaire de la chaîne A de la 5IKR est formée de 32 hélices alpha (**Tableau11**), 8 chaînes beta antiparallèles (**Tableau10**) et 36 coudes

Tableau10 : composition des chaînes beta de la chaîne A de la 5IKR.

No	Start	End	No.resid	Sequence
1	Val46	Val50	5	VCMSV
2	Gln54	Asp58	5	QYKCD
3	Phe64	Tyr65	2	FY
4	Thr71	Pro72	2	TP
5	Gln255	Ile257	3	QII
6	Glu260	Tyr262	3	EMY
7	Phe395	Ile397	3	FQI
8	Gln400	Tyr402	3	QKY

Tableau11 : composition des helices alpha de la chaine A de la 5IKR.

No	Start	end	No.resid	Sequence
1	Pro35	Ser38	4	PCCS
2	Phe74	Leu82	9	FLTRIKLFL
3	Pro86	Leu93	8	PNTVHYIL
4	Lys97	Val103	7	KGFWNVVN
5	Pro106	Ser121	16	PFLRNAIMSYVLTSS
6	Trp139	Ser143	5	WEAFS
7	Ser174	Leu181	8	SNEIVEKL
8	Met196	Thr206	11	MMFAFFAQHFT
9	Asn231	Tyr234	4	NHIY
10	Leu238	Leu244	7	LARQRKL
11	Val266	Thr269	4	VKDT
12	Glu281	Leu283	3	EHL
13	Pro296	Glu319	24	PGLMMYATIWLREHNRVCDVLKQE
14	Asp325	Glu346	22	DEQLFQTSRLILIGETIKIVIE
15	Tyr348	Ser353	6	YVNHL
16	Pro363	Leu366	4	PELL
17	Ala379	Leu384	6	AEFNTL
18	His388	Leu390	3	HPL
19	Tyr404	Phe407	4	YQQF
20	Asn411	Arg428	18	SILLEHGITQFVESFTR
21	Pro442	Val444	3	PAV
22	Gln445	Gln457	13	QKVSQASIDQSRQ
23	Phe463	Arg469	7	FNEYRKR
24	Phe478	Thr482	5	FEELT
25	Glu486	Tyr495	10	EMSAELEALY
26	Ile498	Ala500	3	IDA
27	Leu503	Val509	7	LYPALLV
28	Glu520	Met535	16	ETMVEVGAPFSLKGLM
29	Val538	Cys540	3	VIC
30	Pro547	Phe550	4	PSTF
31	Glu553	Asn560	8	EVGFQIIN
32	Ile564	Asn571	8	IQSLICNN

Ces informations sur la structure secondaire permettent :

- Identifier les segments structurés de la protéine,
- Localiser le site de liaison du ligand (dans ce cas, l'acide mefanamique)
- Analyser les interactions ligand-hélice (utile pour le docking moléculaire),
- Modéliser les interactions avec d'autres ligands, par exemple des flavonoïdes.

La connaissance de cette séquence primaire et de la structure tridimensionnelle est fondamentale pour le docking moléculaire. La structure 3D définit l'espace d'interaction pour les ligands et révèle les sites de liaison potentiels. La séquence identifie les acides aminés clés au sein de ces sites, permettant de prédire les interactions ligand-protéine et de guider la conception rationnelle de médicaments ciblant la COX-2. Le docking moléculaire s'appuie sur cette information pour simuler l'ancrage de molécules et évaluer leur affinité, contribuant ainsi à l'identification de composés bioactifs.

3.2 DIAGRAMME DE RAMACHANDRAN DE LA 5IKR (CHAÎNE A) : ANALYSE CONFORMATIONNELLE :

Le diagramme de Ramachandran visualise les conformations possibles des résidus d'acides aminés dans une structure protéique en fonction des angles dièdres de leur squelette peptidique : phi (ϕ) et psi (ψ) (Ramachandran et al., 1963).

Angle phi (ϕ) : Cet angle dièdre est défini par la rotation autour de la liaison entre l'atome d'azote (N) de l'acide aminé et l'atome de carbone alpha ($C\alpha$) du même acide aminé. Il mesure la flexion de la liaison entre l'atome d'azote et le carbone alpha.

Angle psi (ψ) : Cet angle dièdre est défini par la rotation autour de la liaison entre l'atome de carbone alpha ($C\alpha$) de l'acide aminé et l'atome de carbone du groupement carbonyle ($C=O$) du même acide aminé. Il mesure la flexion de la liaison entre le carbone alpha et le groupe carbonyle.

Ces angles dièdres ϕ et ψ déterminent la conformation de la chaîne polypeptidique, ce qui est essentiel pour la structure tridimensionnelle globale d'une protéine (**Figure 36**)

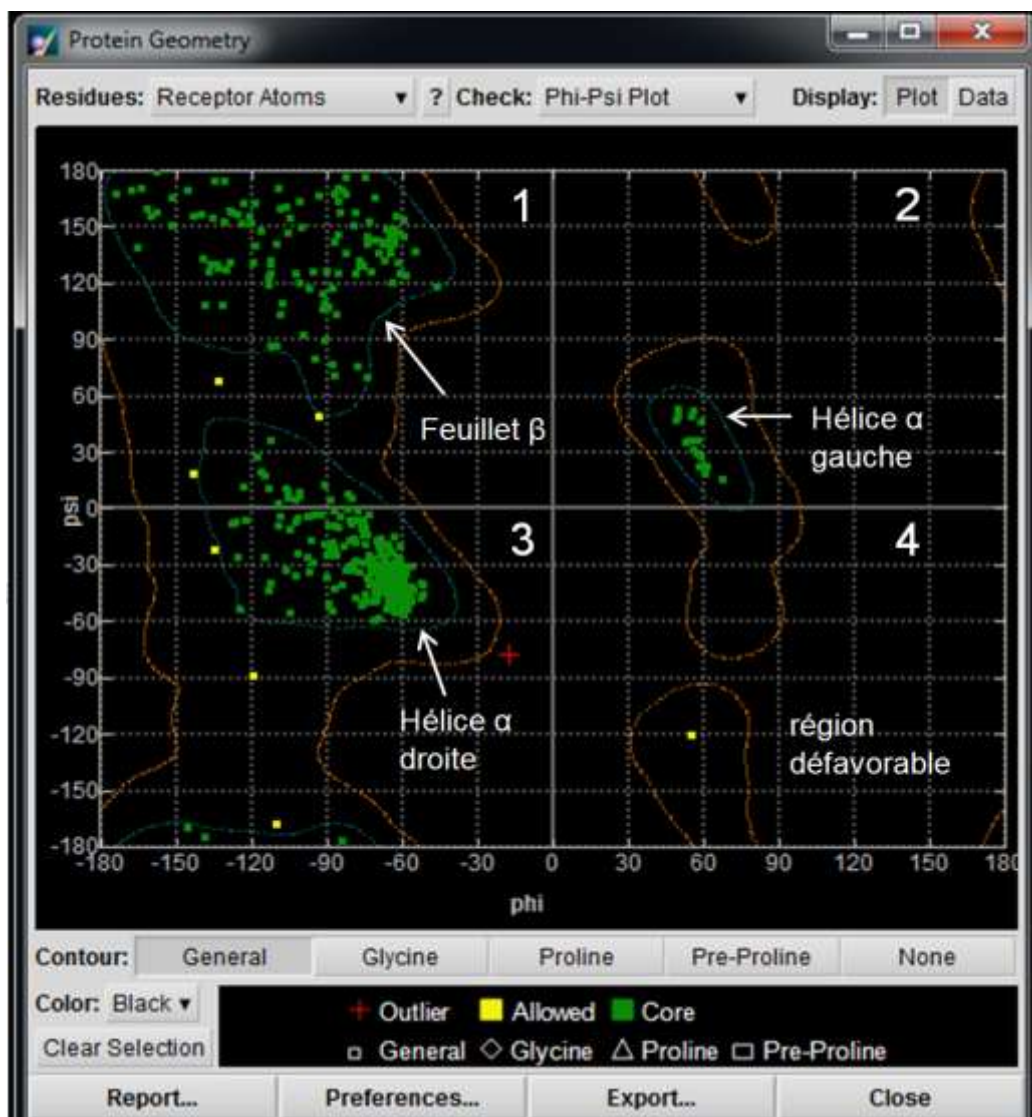


Figure36 : représentation du diagramme de Ramachandran de la chaîne A de la 5IKR

Dans la légende du diagramme de Ramachandran fournie par le logiciel MOE, la valeur de l'angle diédral ϕ phi en abscisse et celle de l'angle diédral ψ en ordonnée, pour des valeurs de -180 à +180 degrés

-Les régions "Allowed" (autorisées), mais moins favorisées, Représente les régions du diagramme de Ramachandran où les combinaisons d'angles dièdres (ϕ , ψ) sont stériquement possibles

- « Core(vert) » : Noyau (ou Région Favorisée) : Indique les régions du diagramme de Ramachandran qui correspondent aux combinaisons d'angles dièdres (ϕ , ψ) les plus fréquemment observées et stériquement les plus favorables pour les différents types de structures secondaires (hélice alpha, feuillet bêta, etc.). Les résidus situés dans ces régions adoptent des conformations stables de la structure secondaire. Ces angles ϕ et ψ se situent

généralement dans cette zone pour une protéine bien repliée et stable. Une forte proportion de résidus dans les régions "core" est un indicateur de bonne qualité structurale.

- Outlier « Croix rouge » (ou Région non autorisée) : Cette région représente les combinaisons d'angles ϕ et ψ qui sont énergétiquement instables et peu probables dans une structure de protéine bien repliée. Les angles dans cette région sont généralement associés à des contraintes géométriques qui rendent ces conformations très peu favorables sur le plan énergétique. Dans ce diagramme de Ramachandran de la chaîne A de la 5IKR, un seul résidu est affiché comme un outlier (croix rouge) dans le cadran 3 (qui correspond généralement à des conformations d'hélice alpha droite, bien que l'outlier soit en dehors de la région favorisée). Ceci signifie que la grande majorité des résidus de la chaîne A de la 5IKR adoptent des conformations stériquement favorables

Ces couleurs et légendes permettent d'évaluer la qualité de la structure tridimensionnelle d'une protéine en fonction de la distribution de ses angles ϕ et ψ dans le diagramme de Ramachandran.

Chaque point sur le diagramme représente une paire d'angles (ϕ , ψ) pour un résidu d'acide aminé spécifique. Les régions colorées indiquent les zones de conformations stériquement permises ou favorisées, tandis que les zones en dehors de ces régions non colorées représentent les conformations stériquement défavorables (Morris et al, 2009).

-Points verts (résidus non-glycine, non-proline) : La majorité des points verts représentent les angles (ϕ , ψ) des résidus d'acides aminés généraux, concerne tout les acides aminés à l'exception de la Glycine et de la Proline, de la chaîne A de la 5IKR. La forte concentration de ces points dans les régions colorées indique que la structure de la protéine présente une bonne qualité globale en termes de géométrie du squelette peptidique pour la majorité de ses résidus. La Glycine et la Proline présentent des contraintes conformationnelles différentes en raison de leur structure unique (la Glycine n'a pas de chaîne latérale, et la Proline a une chaîne latérale cyclique qui se lie à l'atome d'azote de l'amide, limitant sa flexibilité).

La subdivision du diagramme en quatre quadrants permet d'identifier la distribution des angles dièdres préférés pour les structures protéiques. Cette analyse aide à évaluer la qualité de la structure tridimensionnelle en mettant en évidence les conformations conformes aux éléments structuraux tels que les hélices alpha et les feuillets bêta. Elle permet également d'identifier les régions non favorables qui pourraient indiquer des déformations structurales.

-Région 3 (Hélice α droite) : On observe une concentration significative de points verts dans la région 3, marquée comme "Hélice α droite". Cela suggère que la chaîne A de la 5IKR contient une proportion importante de structures en hélice alpha droite, caractérisées par des valeurs spécifiques des angles ϕ (environ -60°) et ψ (environ -45°).

-Région 1 (Feuillet β) : Une concentration très marquée de points verts est visible dans la région 1 "Feuillet β ". Ceci indique la présence de structures en feuillet bêta, qui présentent des valeurs d'angles ϕ et ψ généralement situées autour de -140° et $+135^\circ$, respectivement.

-Région 2 "Hélice α gauche » : Présence de quelques points par rapport à la région 3 (hélice α droite) sont visibles dans la région 2, correspondant à l'"Hélice α gauche" (angles ϕ positif et ψ positif). Les hélices α gauches sont beaucoup moins fréquentes. La présence de quelques résidus dans cette région pourrait indiquer des coudes ou des conformations locales spécifiques.

-Points jaunes (Glycine) : Les points jaunes représentent la Glycine. Cet acide aminé n'ayant pas de chaîne latérale, il possède une plus grande liberté de rotation autour des liaisons N-C α (ϕ) et C α -C (ψ), lui permettant d'occuper des régions du diagramme qui seraient stériquement défavorables pour d'autres acides aminés.

Les angles dièdres ϕ et ψ des acides aminés fournissent des informations clés sur la structure secondaire des protéines, permettant de distinguer les hélices α des feuillets β . Ces informations sont essentielles pour la compréhension de la structure tridimensionnelle et de la fonction des protéines. (Branden et Tooze, 1999 ; Berg et al, 2015).

Il ressort que le diagramme de Ramachandran de la chaîne A de la 5IKR suggère une structure de bonne qualité globale, avec une majorité des résidus non-glycine et non-proline adoptant des conformations (ϕ , ψ) caractéristiques des hélices α droites et des feuillets β , situées dans les régions colorées permises. La présence de quelques résidus de glycine en dehors de ces régions est normale en raison de sa flexibilité. Les points en dehors des régions colorées représentent les zones défavorables ou non permises.

3.3 CARTOGRAPHIE DU SITE DE LIAISON DE L'ACIDE MEFANAMIQUE DANS LA 5IKR :

Suite à l'identification du site actif le plus étendu de la chaîne A de la protéine 5IKR à l'aide de l'application 'Dummies' du logiciel MOE, l'étape suivante de notre analyse structurale a consisté à visualiser la surface du site de liaison du ligand co-cristallisé, l'acide mefanamique, à l'aide de l'outil 'Maps Surface' de MOE. Cette cartographie a pour objectif de délimiter spatialement le site de liaison et d'évaluer la complémentarité stérique entre la protéine et le ligand. La visualisation de la surface moléculaire de la chaîne A de la protéine 5IKR révèle une cavité bien définie qui constitue le site de liaison de l'acide mefanamique (**Figure37**). Le ligand co-cristallisé s'insère dans cet espace tridimensionnel, adoptant une orientation spécifique dictée par la forme et la taille du site. La surface protéique environnante présente une complémentarité stérique avec la structure de l'acide mefanamique suggérant un ajustement conformationnel précis lors de la liaison. Cette cartographie de la surface du site actif met en évidence les régions de la protéine qui sont en contact direct avec le ligand, délimitant ainsi l'interface moléculaire responsable de la reconnaissance et de la fixation de l'acide mefanamique."

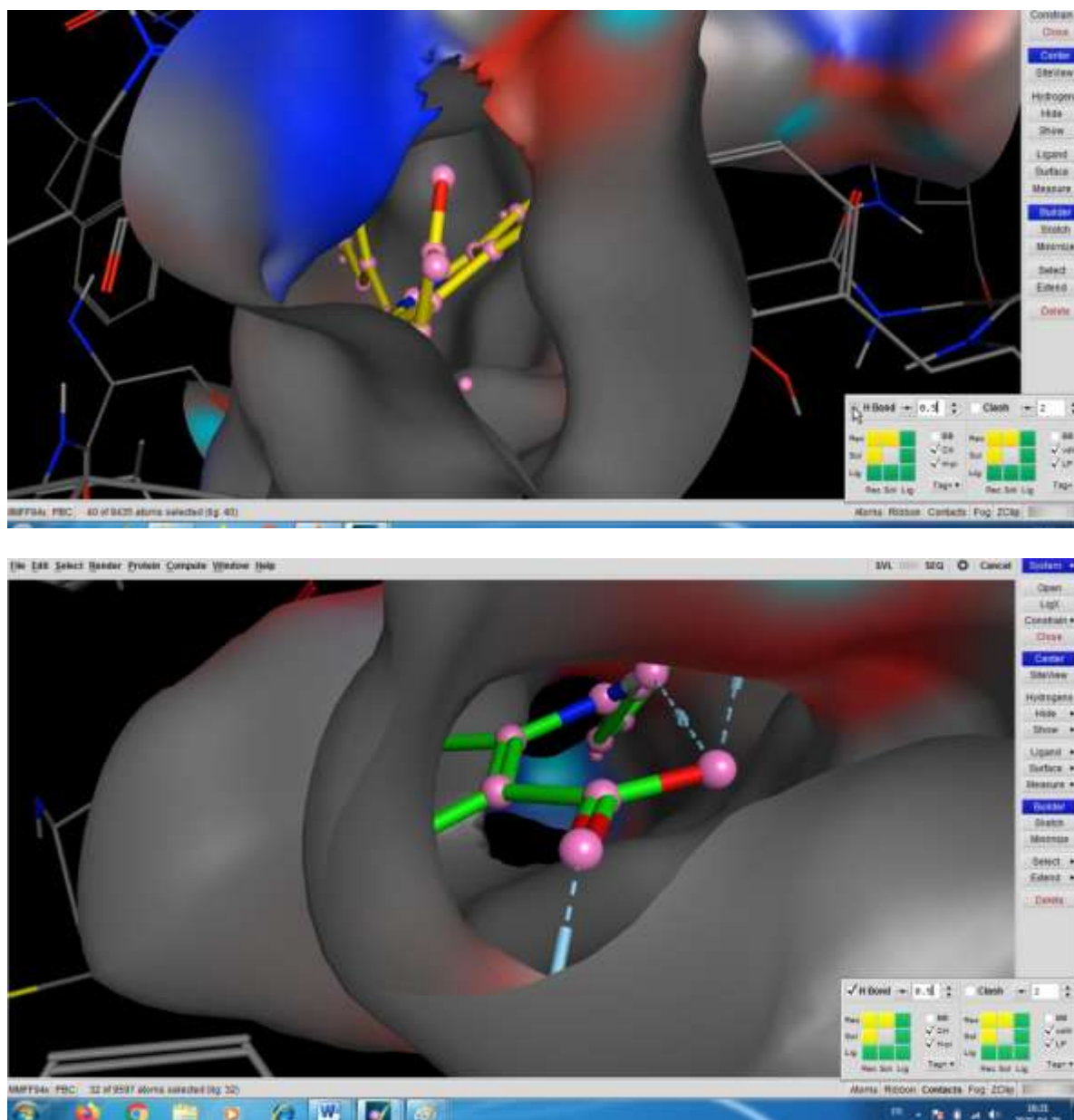
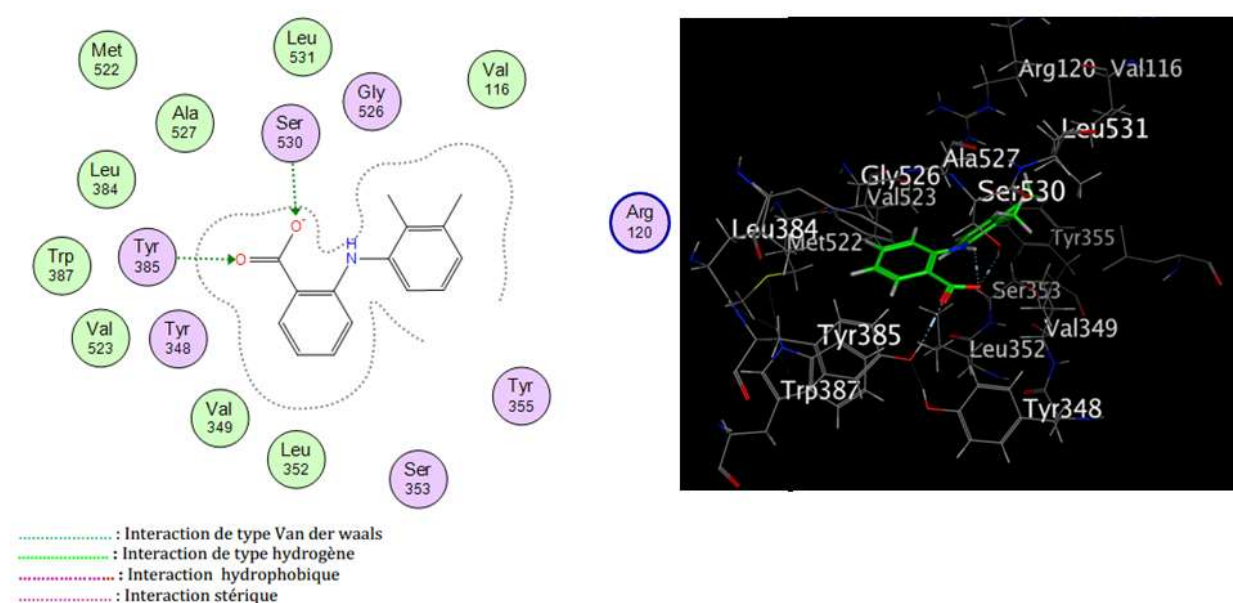


Figure37 : Cartographie maps du site de fixation du ligand co cristallisé avec 5IKR, acide mefanamique montrant la pochette de docking

3.4 ANALYSE DES INTERACTIONS ENTRE L'ACIDE MEFANAMIQUE (LIGAND CO-CRISTALLISE) ET LA CHAÎNE A DE LA COX-2 (PDB : 5IKR) :

L'analyse structurale du complexe entre l'acide mefanamique et la cyclooxygénase-2 (COX-2), à partir de la structure cristallographique 5IKR et visualisée à l'aide du logiciel MOE, révèle une stabilisation efficace du ligand au sein du site actif de l'enzyme (**Figure38**).



Move : interaction stérique : Interactions hydrophobiques de type π - π entre les cycles benzéniques de ligand et les acides aminés (à l'intérieur de cycle benzène et Aa).

Figure38 : Représentation des interactions de l'acide mefanamique (ligand co-cristallisé) avec le site actif de la chaîne A de la COX-2 (PDB : 5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Le score de docking obtenu est de $-6,5605$ kcal/mol, indiquant une forte affinité globale entre le ligand et la protéine. Ce score reflète l'énergie totale de liaison, incluant l'ensemble des interactions stabilisantes (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, hydrophobes, etc.). Il s'apparente à une estimation de l'énergie libre de Gibbs (ΔG) de la liaison, qui intègre à la fois les contributions enthalpiques (ΔH) et entropiques ($-T\Delta S$)

Ligand	Receptor	Interaction	Distance	E (kcal/mol)
O16	OH TYR 385	(A) H-acceptor	2.82	-2.9
O15	OG SER 530	(A) H-acceptor	2.77	-1.3

Deux interactions hydrogène (H-acceptor) :

-Avec le résidu TYR 385 (OH) : l'atome d'oxygène (O16) de l'acide mefanamique établit une liaison avec l'hydrogène portée par le groupe hydroxyle phénolique (-OH) de la tyrosine 385 de la chaîne A de la5IKR (**Figure38**). Cette interaction se produit à une distance de 2,82 Å, avec une énergie de -2,9 kcal/mol.

-Avec le résidu SER 530 (OG) : l'atome d'oxygène (O15) du ligand interagit avec l'atome d'oxygène du groupe hydroxyle (OG) de la chaîne latérale de la sérine de la chaîne A de la5IKR. Cette liaison H est observée à une distance de 2,77 Å, avec une énergie de -1,3 kcal/mol.

Les énergies de liaison individuelles (E en kcal/mol) fournissent une estimation quantitative de la contribution de chaque interaction spécifique à la stabilité du complexe. Plus la valeur est négative, plus l'interaction est stabilisante. Ainsi, la liaison avec TYR 385 apparaît comme la plus stabilisante, bien qu'elle soit légèrement plus longue que celle observée avec SER 530.

Deux liaisons hydrogène majeures assurent l'ancrage du ligand. La première implique le groupement carboxylique de l'acide mefanamique et la chaîne latérale hydroxylée de Ser530, un résidu catalytique essentiel de COX-2. Ce dernier est localisé dans la poche active et participe à la reconnaissance du ligand. La liaison hydrogène formée avec Ser530 contribue ainsi à l'orientation précise du ligand dans le site catalytique, augmentant sa spécificité et son affinité inhibitrice (Kurumbail et al., 1996 ; Luong et al., 1996).

La seconde liaison hydrogène est établie avec le résidu Tyr385, également impliqué dans l'activité catalytique, notamment dans la réaction de peroxydation de l'acide arachidonique. L'interaction avec Tyr385 peut perturber sa fonction enzymatique, contribuant directement à l'effet inhibiteur du ligand (Kurumbail et al., 1996 ; Grosser et al., 2011).

En plus de ces interactions polaires, la visualisation dans MOE met en évidence plusieurs interactions hydrophobes et aromatiques. Des contours en pointillés noirs illustrent des contacts étroits entre les cycles aromatiques du ligand et des résidus voisins tels que Tyr355 et Trp387, traduisant des interactions π - π (stacking) qui renforcent l'orientation plane et la stabilité conformationnelle du ligand. D'autres interactions hydrophobes sont observées avec des résidus non polaires comme Leu352, Val523, Ala527 et Met522, participant également à la stabilisation du complexe ligand-enzyme.

Afin d'évaluer la fiabilité de MOE pour l'analyse des interactions ligand-récepteur, les résultats obtenus ont été comparés à ceux issus de la base de données PDBsum, spécialisée dans l'annotation structurale des complexes protéine-ligand. Cette comparaison a confirmé la présence des deux interactions hydrogène clés (Ser530 et Tyr385), ainsi que des interactions hydrophobes similaires, notamment avec Val523, Leu352, Leu531, Val349 et Met522 (**Figure39**).

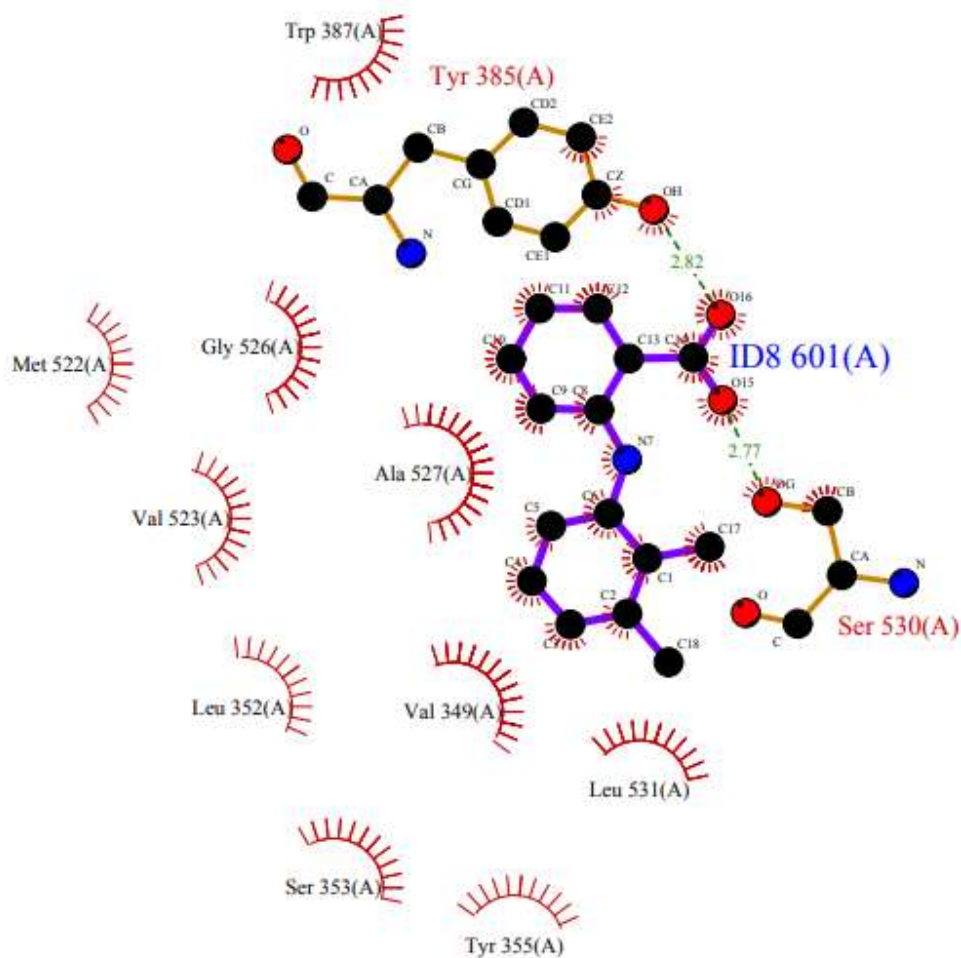


Figure39: Le ligand co-cristallisé (ID8) (- 2-[(2,3-Dimethylphenyl) amino] benzoic acid: Mefenamic acid) visualisé via LigPlot (PDBsum)

Dans PDBsum, ces contacts hydrophobes sont représentés par des demi-cercles rouges (**Figure39**) (via LigPlot), tandis que dans MOE, ils apparaissent sous forme de contours en pointillés colorés. Cette concordance entre les deux approches atteste de la capacité de MOE à reproduire fidèlement les interactions expérimentales (liaisons hydrogène, hydrophobes et aromatiques), soulignant sa pertinence pour les études de docking moléculaire.

3.5 ANALYSE DES INTERACTIONS DES FLAVONOÏDES AVEC LA CHAÎNE A DE LA COX-2 (PDB : 5IKR) :

Le docking moléculaire de neuf composés flavonoïdes a été réalisé avec la cyclooxygénase-2 (COX-2), en utilisant la structure cristallographique 5IKR co-cristallisée avec l'acide niflumique. Les simulations, effectuées à l'aide du logiciel MOE, ont permis d'obtenir les scores d'affinité (exprimés en kcal/mol) ainsi que les valeurs de RMSD (Root Mean Square Deviation, en Ångström) pour chaque composé. Pour chaque ligand, dix conformations ont été générées, et les cinq meilleures poses ont été sélectionnées en fonction de leur score d'interaction.

Le score d'affinité permet d'évaluer la probabilité et la stabilité de la liaison entre le ligand et la cible protéique. Plus ce score est négatif, plus l'interaction est favorable sur le plan énergétique, ce qui suggère une affinité élevée et une stabilité renforcée du complexe formé. À l'inverse, un score positif indique une interaction défavorable et une faible stabilité.

Les valeurs de RMSD ont été utilisées pour comparer les conformations obtenues par docking à celle du ligand co-cristallisé. Un RMSD inférieur à 2,0 Å est généralement considéré comme indicatif d'un bon alignement structural et d'un amarrage réussi. Des valeurs faibles de RMSD témoignent d'une bonne superposition entre la conformation prédite et la conformation expérimentale, ce qui renforce la viabilité des résultats obtenus.

L'analyse a principalement porté sur les composés présentant les scores d'affinité les plus élevés, tout en tenant compte de la combinaison entre un score favorable et un RMSD faible, critères qui reflètent une interaction stable et précise avec le site actif de la COX-2.

La visualisation des interactions moléculaires entre les flavonoïdes et la COX-2 a été réalisée à l'aide de MOE, permettant d'identifier les types d'interactions impliqués, notamment les liaisons hydrogène, les interactions hydrophobes et les interactions π - π . Pour chaque interaction, le logiciel fournit des informations détaillées : nature de l'interaction, acides aminés impliqués, distances de liaison et énergies associées.

Un tableau récapitulatif (**Tableau 12**) présente les principales interactions observées pour les flavonoïdes ayant obtenu les meilleurs scores de docking, ainsi que ceux combinant une forte affinité et un faible RMSD, indicateurs d'un potentiel inhibiteur significatif vis-à-vis de la COX-2.

Tableau12 : Analyse des résultats de docking moléculaire sur la COX-2 (5IKR)

Molécule	Score (Kcal/mol)	RMSD (Å°)	Liaison	Résidus A.a (5IKR)	Distance (Å°)	E (kcal/mol)
acide mefanamique (co cristallisé avec 5IKR)	- 6.5605		Hydrogène Hydrogène	TYR 385 SER 530	2.82 2.77	-2.9 -1.3
Myrécetine	-7,1405	2.577	Hydrogène	HIS 39	2.95	-4.1
Myrécetine	-6.7851	0,847	pi-H	GLN 42	4.35	-0.7
Myrécetine	-6.8047	1.237	Hydrogène pi-H	ALA 151 GLN 42	3.46 4.29	-0.7 -0.6
Quercetine	-6.8823	1.036	Hydrogène	ALA 151	3.36	-1.3
Quercetine	-6.7212	1.195	Hydrogène Hydrogène pi-H pi-cation	GLU 465 ALA 151 ARG 44 ARG 44	2.88 3.02 4.63 3.62	-3.2 -2.2 -1.0 -1.3
Naringenine	-6.8499	2.15	Hydrogène pi-cation	ASP 125 ARG 44	2.76 3.64	-4.6 -1.2
Naringenine	-6.6113	0.96	Hydrogène pi-H pi-H	TYR 130 ARG 44 CYS 47	2.89 4.48 4.07	-0.7 -0.6 -0.6
Naringenine	-6.4323	0.92	Hydrogène pi-H pi-H	GLN 42 GLN 42 ARG 44	3.02 4.25 4.52	-1.1 -0.7 -0.7
Luteoline	-6.6020	1.31	Hydrogène Hydrogène pi-H pi-cation	GLU 465 ALA 151 ARG 44 ARG 44	2.89 3.04 4.59 3.61	-3.4 -2.1 -1.0 -1.4
Fisetin	-6.7285	1.098	Hydrogène Hydrogène pi-H pi-cation	ARG 44 ASP 125 ARG 44 ARG 44	2.99 2.72 4.55 3.56	-2.0 -5.2 -1.2 -1.7
Fisetin	-6.4445	1.25	Hydrogène Hydrogène pi-H	GLY 135 PRO 154 CYS 47	3.02 3.00 4.24	-1.0 -3.0 -0.6
Kaempferol	-6.6555	2.78	pi-H pi-cation	ARG 44 ARG 44	4.59 3.61	-1.2 -2.0
Kaempferol	-6.1083	0.92	pi-H	CYS 47	4.20	-0.6
Apigenine	-6.5698	1.81	Hydrogène Hydrogène pi-cation	GLU 465 ASP 125 ARG 44	2.88 2.76 3.67	-5.5 -4.4 -1.4
Apigenine	-6.1354	1.56	Hydrogène pi-H	TYR 130 CYS 47	3.01 4.00	-0.8 -0.6
Galangine	-6.4867	3.43	Hydrogène pi-H pi-cation	GLU 465 ARG 44 ARG 44	2.98 4.53 3.64	-3.5 -0.9 -1.8

Tableau12(suite) : Analyse des résultats de docking moléculaire sur la COX-2 (5IKR)

Molécule	Score (Kcal/mol)	RMSD (Å°)	Liaison	Résidus A.a (5IKR)	Distance (Å°)	E (kcal/mol)
Galangine	-6.1785	1.97	Hydrogène	GLY 135	2.98	-1.5
			Hydrogène	CYS 41	3.04	-0.7
			Hydrogène	HIS 39	3.32	-0.7
			pi-H	CYS 47	3.84	-0.6
Chrysine	-6.3795	2.06	pi-H	ARG 44	4.45	-1.3
			pi-cation	ARG 44	3.61	-1.7
Chrysine	-6.0484	1.28	Hydrogène	CYS 41	3.06	-1.3
			pi-H	CYS 47	4.03	-0.6
			pi-H	CYS 47	3.96	-1.0

L'étude de docking moléculaire réalisée à l'aide du logiciel MOE (Molecular Operating Environment) a permis d'évaluer la capacité de neuf flavonoïdes à interagir avec la cyclooxygénase-2 (COX-2), en comparaison avec l'acide méfénamique, ligand de référence co-cristallisé dans la structure PDB : 5IKR (score : -6.56 kcal/mol).

Les résultats montrent que plusieurs flavonoïdes affichent une énergie de liaison plus négative que l'acide méfénamique, traduisant une meilleure affinité potentielle pour le site actif ou des sites alternatifs de la COX-2. La myricétine se distingue avec une énergie de liaison de -7.14 kcal/mol, suivie de la quercétine (-6.88 kcal/mol), de la naringénine (-6.85 kcal/mol) et de la fisétine (-6.74 kcal/mol). Ces valeurs suggèrent une interaction thermodynamiquement plus stable, comparable voire supérieure à celle observée pour certains AINS non sélectifs

Myricétine (–7.14 kcal/mol) :

Établit des liaisons hydrogène avec HIS39 (2.95 Å) et forme plusieurs interactions hydrophobes et π -cation avec ARG44, TYR130 et GLN42 (**Figure40**).

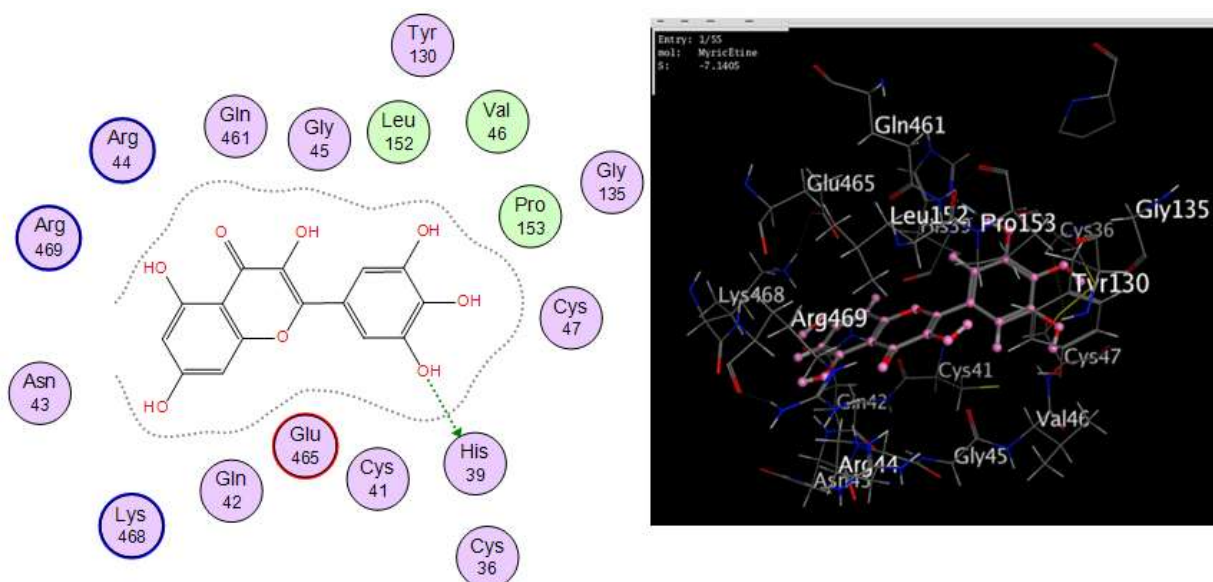


Figure40 : Représentation de l'interaction entre la myricétine et la chaîne A de la COX-2(PDB : 5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

.Le score de docking obtenu est de –7,1405 kcal/mol, ce qui indique une forte affinité globale entre la myricétine et le site actif de l'enzyme. La valeur du RMSD (Root Mean Square Deviation), égale à 2,577 Å, reflète la proximité structurale entre la conformation dockée de la myricétine et la position de référence du ligand. (**Tableau12**).

Ligand	Receptor	Interaction	Distance	E (kcal/mol)
O 13	ND1 HIS 39	(A) H-donor	2.95	-4.1

Liaison hydrogène (H-donor) :

Intéraction O13 – ND1 HIS 39 (chaîne A) : une liaison hydrogène de type donneur (H-donor) est formée entre l'atome d'oxygène O13 de la myricétine et l'atome d'azote du cycle imidazole (ND1) de l'histidine 39 (**Figure40**). Cette liaison se produit à une distance de 2,95 Å, avec une énergie de –4,1 kcal/mol, ce qui en fait une interaction fortement stabilisante au sein du complexe.

Myricétine (–6,80 kcal/mol) :

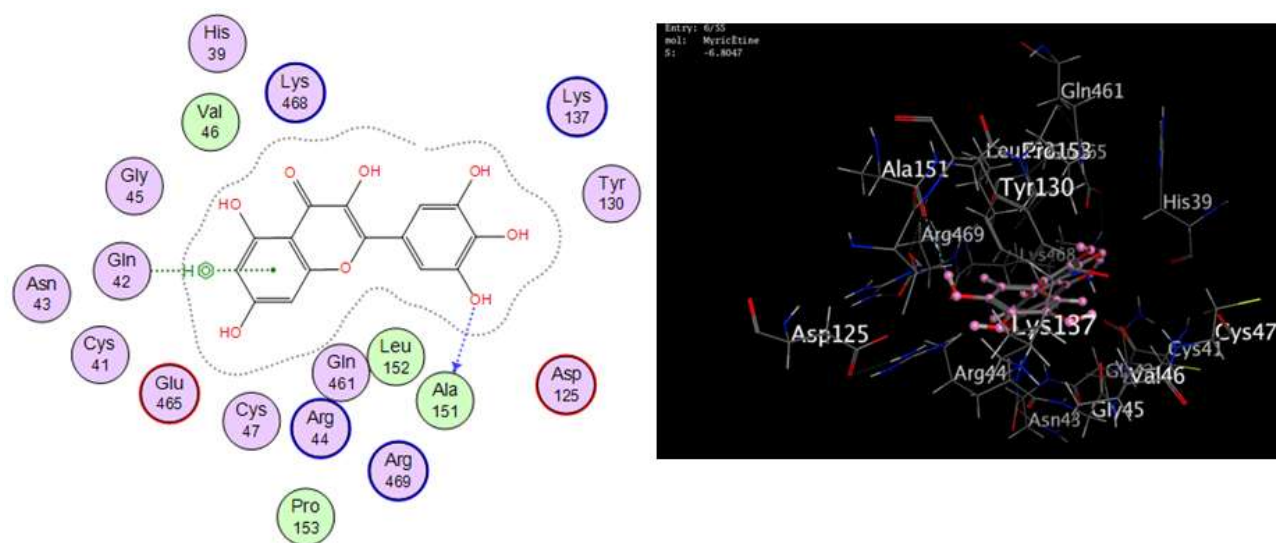


Figure41 : Interaction entre la myrecétine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Le score représente l'énergie d'interaction entre le ligand et le récepteur, qui est de l'ordre de –6,8047 kcal/mol, traduisant une affinité favorable. Le RMSD (Root Mean Square Deviation), qui indique le degré d'alignement de la conformation du ligand par rapport à une pose de référence, est de l'ordre de 1,237 Å inférieur à 2 Å, reflète une pose de liaison bien alignée par rapport à la conformation de référence. (**Tableau12**).

Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)	E (kcal/mol)
O 13	O ALA 151	(A) H-donor	3.46	-0.7
6-ring	CA GLN 42	(A) pi-H	4.29	-0.6

- Interaction hydrogène (H-donor):

L'atome d'oxygène de la myricétine interagit avec l'atome d'oxygène carbonyle (O) du résidu ALA 151 (**Figure41**). Cette liaison hydrogène se forme à une distance de 3,46 Å, avec une énergie de –0,7 kcal/mol.

-Interaction π -H :

Le cycle aromatique de la myricétine interagit avec le carbone alpha (CA) du résidu GLN 42. Cette interaction de type π -H résulte d'une attraction entre le nuage π du cycle aromatique et l'hydrogène lié au carbone alpha. Cette liaison se forme à une distance de 4,29 Å, avec une énergie de –0,6 kcal/mol.

- Quercétine (–6.88 kcal/mol) :

Interagit avec GLU465 et ASP125/ALA151 à des distances de 2.7–3.12.8-3.1 Å, via ses groupements hydroxyles en position 3',4' et 5. (**Figure42**)

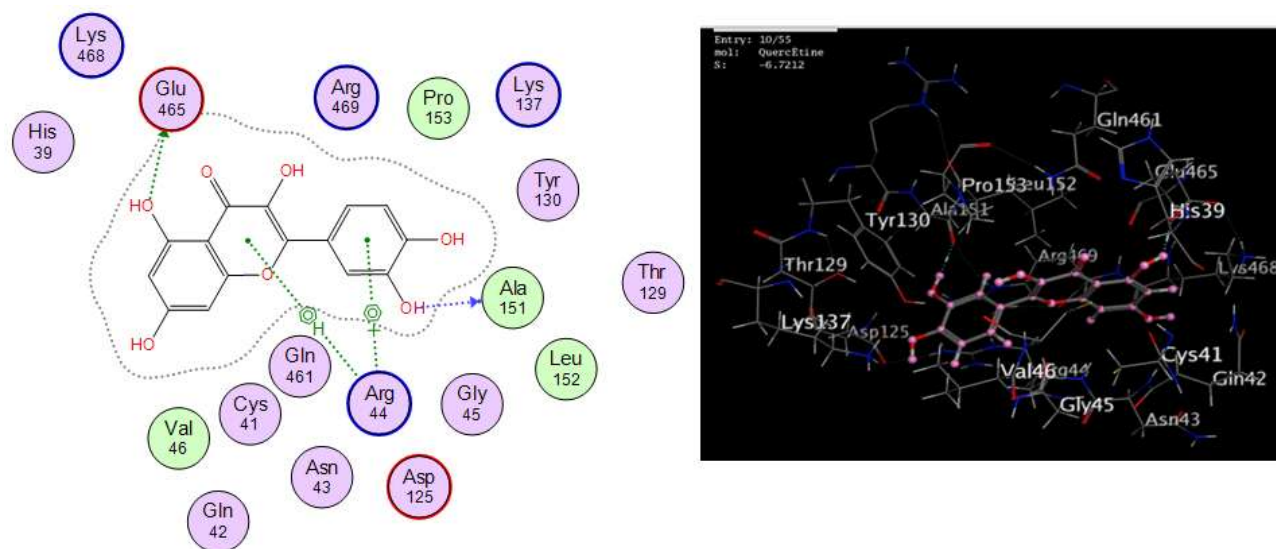


Figure42 : Interaction entre la quercétine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Avec un Score : -6.7212 kcal/mol et un RMSD ; 1.195 Å°

Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)	E (kcal/mol)
O 25	OE1 GLU 465	(A) H-donor	2.88	-3.2
O 29	O ALA 151	(A) H-donor	3.02	-2.2
6-ring	CA ARG 44	(A) pi-H	4.63	-1.0
6-ring	NE ARG 44	(A) pi-cation	3.62	-1.3

-Deux liaisons hydrogène :

La première s'effectue avec le résidu GLU 465, par l'atome OE1 de la chaîne latérale carboxylate du glutamate, jouant le rôle d'accepteur d'hydrogène (**Figure42**). La liaison s'établit à une distance de 2,88 Å avec une énergie favorable de –3,2 kcal/mol.

La seconde implique le résidu ALA 151, par l'atome d'oxygène du groupement carbonyle (O), situé dans la liaison peptidique. Cette interaction H-donneur est formée à une distance de 3,02 Å, avec une énergie de -2,2 kcal/mol.

Une interaction π -H :

Le cycle aromatique de la quercétine interagit avec le carbone alpha (CA) du résidu ARG 44. Cette interaction de type π -H s'établit par une attraction entre le nuage π du cycle aromatique de la quercétine et l'hydrogène porté par le le carbone alpha (CA) de Arg44, à une distance de 4,63 Å, avec une énergie de -1,0 kcal/mol

Interaction π -cation :

Le nuage électronique π du cycle aromatique de la quercétine interagit avec le groupe guanidinium du résidu ARG 44, l'atome d'azote NE, chargé positivement. Cette interaction électrostatique de type π -cation se forme à une distance de 3,62 Å, avec une énergie de -1,3 kcal/mol.

-Naringenine (-6.43 kcal/mol) :

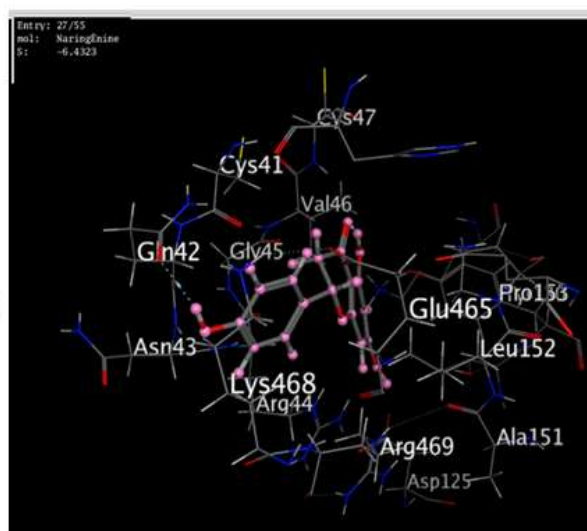
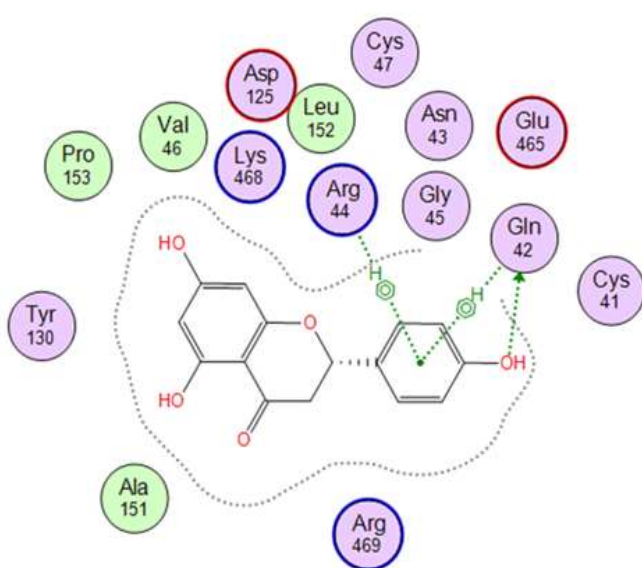


Figure43 : Interaction entre la Naringenine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : :
visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Score : -6.4323 kcal/mol : ce score de docking entre la naringénine et le site de liaison de la COX-2.

Un RMSD très faible de 0.92 Å indique une grande cohérence entre les différentes poses (orientations) du ligand prédit par le logiciel de docking. Cela suggère une position bien définie et stable de la naringénine dans le site de liaison.

Ligand	Receptor	Interaction	Distance(Å)	E (kcal/mol)
O 31	OE1 GLN 42	(A) H-donor	3.02	-1.1
6-ring	CA GLN 42	(A) pi-H	4.25	-0.7
6-ring	N ARG 44	(A) pi-H	4.52	-0.7

- Liaison Hydrogène (H-donor):

Un atome d'oxygène (31) de la naringénine agit comme un accepteur de liaison hydrogène avec atome d'oxygène du groupe carboxamide de la Glutamine de lachaine A de la 5IKR (OE1 GLN 42 (A) (**Figure43**), a une distance de liaison de 3.02 Å et avec une énergie de liaison de -1.1 kcal/mol

Interaction Pi-H :

Le cycle aromatique de la naringénine interagit avec le carbone alpha (CA) du résidu

De GLN 42 (A). Cette interaction de type π -H s'établit par une attraction entre le nuage π du cycle aromatique de la naringénine et l'hydrogène porté par le le carbone alpha (CA) de GLN 42 (**Figure43**), à une distance de 4.25 Å, avec une énergie de -0.7 kcal/mol

Interaction Pi-H :

Le cycle aromatique de la naringénine interagit avec l'atome d'azote de la chaîne du résidu Arginine 44. Cette interaction de type π -H s'établit par une attraction entre le nuage π du cycle aromatique de la naringénine et l'azote de la chaîne du résidu Arginine 44 (**Figure43**), à une distance de 4.52 Å, avec une énergie de -0.7 kcal/mol

- Fisetine (−6.73 kcal/mol) :

Interagit efficacement avec ASP125 (2.72 Å) et ARG44 (2.99 Å), combinant liaisons hydrogène et hydrophobes (**Tableau12 ; Figure44**).

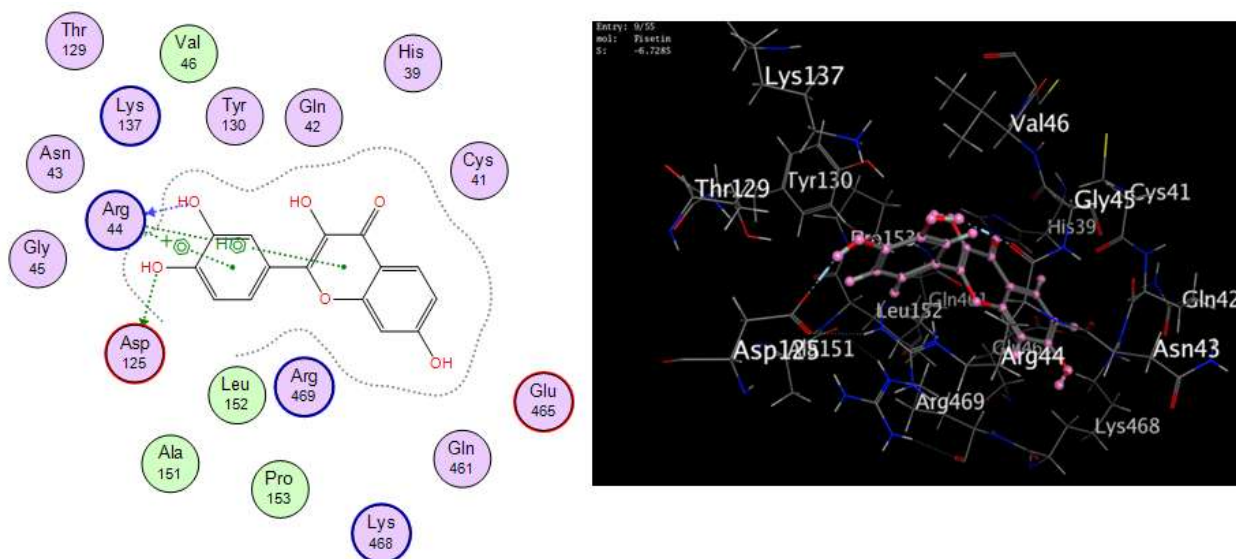


Figure44 : Interaction entre la FISETIN et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Avec un Score : SCORE -6.7285 kcal/mol ; RMSD 1.098 Å°, indiquant une affinité favorable et une bonne superposition avec le ligand de référence

Ligand	Receptor	Interaction	Distance(Å)	E (kcal/mol)
O 28	O ARG 44	(A) H-donor	2.99	-2.0
O 30	OD2 ASP 125	(A) H-donor	2.72	-5.2
6-ring	CA ARG 44	(A) pi-H	4.55	-1.2
6-ring	NE ARG 44	(A) pi-cation	3.56	-1.7

La stabilisation du complexe repose sur plusieurs interactions non covalentes impliquant des résidus clés du site actif :

-Deux liaisons hydrogène (H-donneur) sont observées entre les atomes O28 et O30 de la fistétine et respectivement les résidus ARG 44 (chaîne A) (**Figure44**) à 2,99 Å ($E = -2,0$ kcal/mol) et ASP 125 (chaîne A) à 2,72 Å ($E = -5,2$ kcal/mol).

-Une interaction π -H est détectée entre le cycle aromatique de la fistétine et l'atome CA du résidu ARG 44 (chaîne A), à une distance de 4,55 Å, avec une énergie de $-1,2$ kcal/mol.

-Une interaction π -cation est également notée entre le même cycle aromatique et l'atome NE d'ARG 44, à une distance de 3,56 Å, avec une énergie de $-1,7$ kcal/mol.

- Apigénine (-6.56 kcal/mol) et lutéoline (-6.60 kcal/mol) :

Présentent également des distances de liaison optimales (< 3.0 Å) avec GLN465, et des résidus hydrophobes. (**Tableau12**)

-Apigénine :

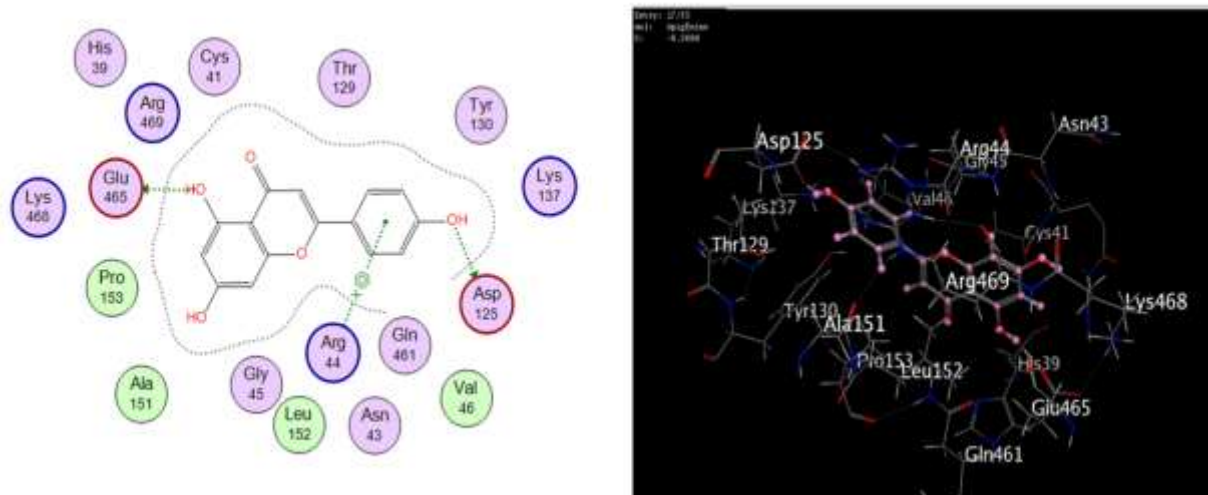


Figure45 : Interaction entre l'apigenine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Score : -6.5698 kcal/mol : ce score de docking entre l'apigenine et le site de liaison de la COX-2.

Un RMSD très faible de 1.81 Å° indique une grande cohérence entre les différentes poses (orientations) du ligand prédit par le logiciel de docking. Cela suggère une position bien définie et stable de l'apigenine dans le site de liaison.

Ligand	Receptor	Interaction	Distance (Å)	E (kcal/mol)
O 27	OE1 GLU 465	(A) H-donor	2.88	-5.5
O 29	OD2 ASP 125	(A) H-donor	2.76	-4.4
6-ring	NE ARG 44	(A) pi-cation	3.67	-1.4

Deux liaisons hydrogène (H-donneur) sont observées entre les atomes O27 et O29 de l'apégénine et respectivement les résidus GLU 465 (chaîne A) (**Figure45**) à 2,88 Å (E = -5,5 kcal/mol) et ASP 125 (chaîne A) à 2,76 Å (E = -4,4 kcal/mol).

Interaction π -cation :

Le nuage électronique π du cycle aromatique de l'apégénine interagit avec le groupe guanidinium du résidu ARG 44, l'atome d'azote NE, chargé positivement. Cette interaction électrostatique de type π -cation se forme à une distance de 3.67 Å, avec une énergie de -1.4 kcal/mol.

Lutéoline :

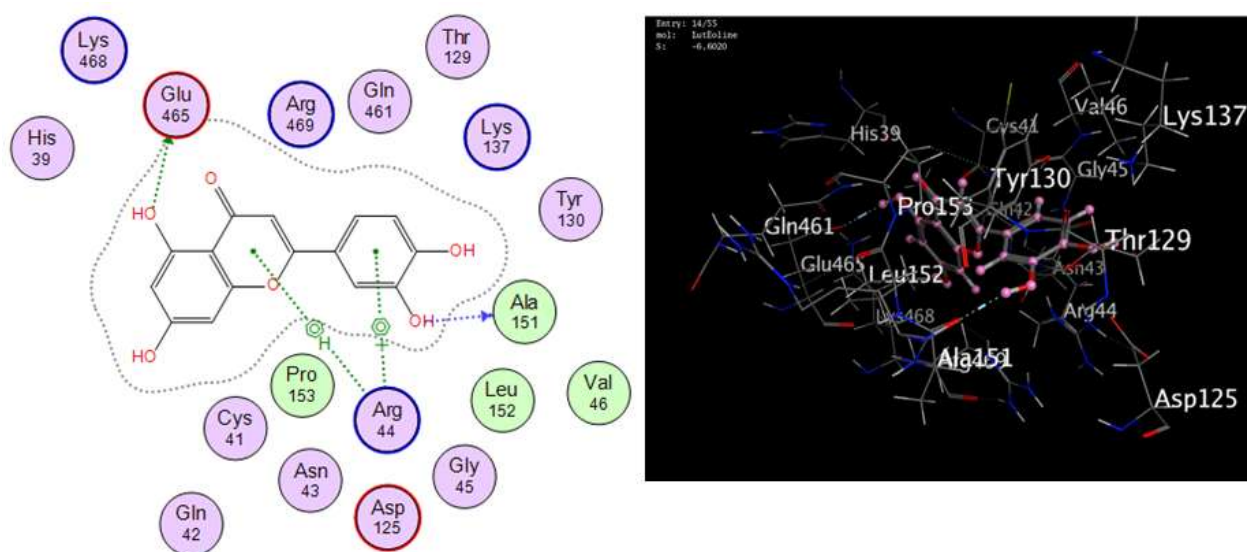


Figure46 : Interaction entre la luteonine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite).

Avec un Score : **score** : -6.6020 kcal/mol ; RMSD :1.31 Å°

Score : -6.6020 kcal/mol. Ce score de docking entre la lutéonine et la COX-2,

RMSD : 1.31 Å. Un RMSD relativement faible suggère une bonne convergence des poses du ligand dans le site de liaison, indiquant une position stable prédite

Ligand	Receptor	Interaction	Distance(Å)	E (kcal/mol)
O 26	OE1 GLU 465	(A) H-donor	2.89	-3.4
O 28	O ALA 151	(A) H-donor	3.04	-2.1
6-ring	CA ARG 44	(A) pi-H	4.59	-1.0
6-ring	NE ARG 44	(A) pi-cation	3.61	-1.4

Deux Liaisons Hydrogène (H-donor) :

- Atome d'oxygène du groupe carboxyle (OE1) de LUTEONINE établit une liaison hydrogène avec la GLU 465 de la chaîne A de la 5IKR (**Figure46**), avec une distance de 2.89 Å et une énergie de liaison de -3.4 kcal/mol.

- Atome d'oxygène (O) de LUTEONINE établit une liaison hydrogène avec ALA 151 de la chaîne A de la 5IKR, avec une distance de 3.04 Å et une énergie de liaison de -2.1 kcal/mol.

Interaction Pi-H :

Le cycle aromatique de la LUTEONINE interagit avec l'atome carbone alpha (CA) de la chaîne du résidu Arginine 44. Cette interaction de type π -H s'établit par une attraction entre le nuage π du cycle aromatique de la naringénine et l'azote de la chaîne du résidu Arginine 44, à une distance de 4.59 Å, avec une énergie de -1.0 kcal/mol

Interaction Pi-Cation :

Le cycle aromatique de la LUTEONINE interagit avec d'azote du groupe guanidinium chargé positivement de l'Arginine 44 de la chaîne A. Cette interaction de type π -H s'établit par une attraction entre le nuage π du cycle aromatique de la LUTEONINE et l'azote de la chaîne du résidu Arginine 44, à une distance de 3.61 Å, avec une énergie de -1.4 kcal/mol

Chrysine (-6.05 kcal/mol):

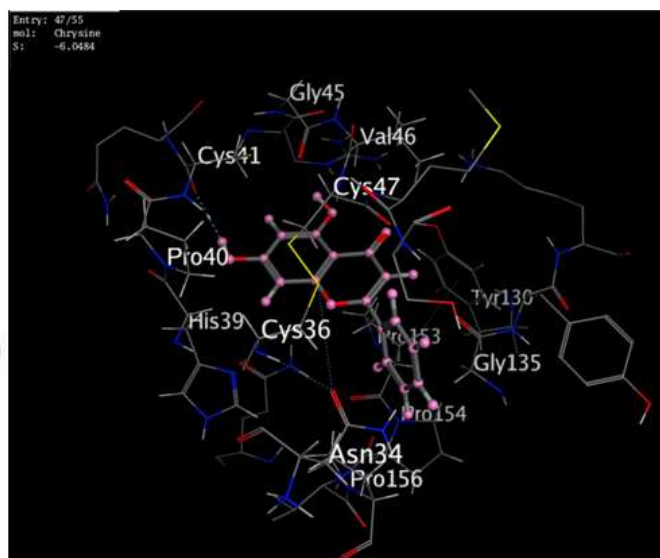
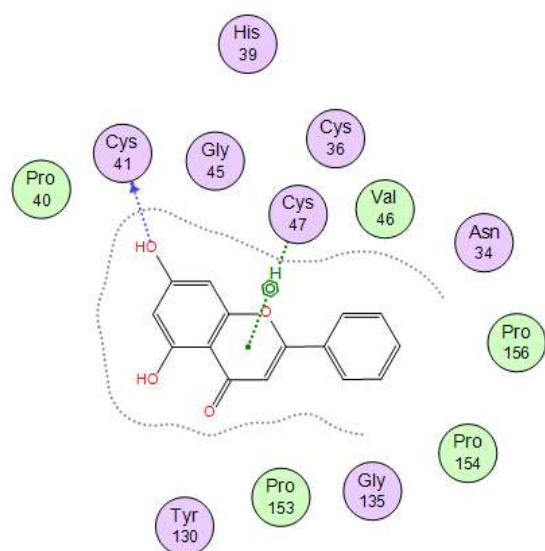


Figure47 : Interaction entre la chrysine et la chaîne A de la COX-2 (5IKR) : visualisation en 2D (à gauche) et en 3D (à droite)

Avec un Score : -6.0484 kcal/mol ; RMSD 1.28Å°

Ligand	Receptor	Interaction	Distance(Å)	E (kcal/mol)
O 26	O CYS 41	(A) H-donor	3.06	-1.3
6-ring	N CYS 47	(A) pi-H	4.03	-0.6
6-ring	CB CYS 47	(A) pi-H	3.96	-1.0

La stabilisation du complexe repose sur des interactions non covalentes, notamment une liaison hydrogène et deux interactions π -H impliquant des résidus du site actif :

Une liaison hydrogène (H-donneur) est observée entre l'atome O26 de la chrysine et l'atome O du résidu CYS 41 (chaîne A), à une distance de 3,06 Å, avec une énergie de -1,3 kcal/mol.

Deux interactions π -H sont détectées entre le cycle aromatique de la chrysine et les atomes N et CB du résidu CYS 47 (chaîne A), à des distances respectives de 4,03 Å et 3,96 Å, avec des énergies de -0,6 kcal/mol et -1,0 kcal/mol. (**Figure47**)

L'analyse des distances de liaison confirme la corrélation entre la proximité géométrique et la stabilité du complexe ligand-protéine. Des liaisons hydrogène fortes ont été observées pour des distances comprises entre 2.7 et 3.0 Å, notamment dans les complexes avec la fisétine,

l'apigénine et la quercétine, impliquant des résidus tels que GLU465, ASP125, ALA151 ou GLN42. Ces distances optimales renforcent la stabilité de l'ancrage du ligand dans le site actif ou des poches adjacentes.

En revanche, des distances supérieures à 3.5–4.0 Å, comme celles observées pour les interactions π -H ou π -cation (avec GLN42, CYS47, ARG44), montrant des liaisons secondaires qui participent au maintien du complexe, notamment dans des cas d'inhibition allostérique ou non compétitive.

Il ressort des résultats obtenus, l'acide méfénamique forme des liaisons hydrogène classiques avec TYR385 et SER530, deux résidus catalytiques majeurs du site actif. Cependant, aucun des flavonoïdes testés ne reproduit exactement cette configuration, bien que certains établissent des contacts avec des résidus importants situés dans la poche active.

L'analyse structure-activité (SAR) met en lumière le rôle déterminant des groupements hydroxyles dans l'affinité de liaison. Les flavonoïdes fortement hydroxylés (myricétine, quercétine, fisétine) présentent les scores de liaison les plus favorables, en raison de leur capacité à former un plus grand nombre de liaisons hydrogène stabilisatrices avec les résidus polaires de la COX-2. Ce qui suggère que ces groupes contribuent à des interactions stabilisatrices. À l'inverse, des composés moins hydroxylés comme la galangine (–6.37 kcal/mol), la kaempférol (–6.33 kcal/mol) ou la chrysine (score le plus faible), présente une affinité plus faible, ce qui confirme l'importance de la substitution en hydroxyles dans la stabilité des complexes. Par ailleurs, la présence généralisée de cycles aromatiques permet des interactions π - π stacking avec des résidus aromatiques (ex. TYR355, PHE518) et des interactions π -cation avec des résidus chargés (ex. ARG44, TYR130), renforçant l'ancrage du ligand dans la poche catalytique.

3.6 DISCUSSION GENERALE :

L'ensemble des résultats obtenus par docking moléculaire suggère que plusieurs flavonoïdes, notamment la myricétine (-7.14 kcal/mol), la quercétine (-6.7212 kcal/mol), la fisétine (-6.7285 kcal/mol) et la lutéoline (-6.60 kcal/mol), présentent une affinité de liaison significative pour la cyclooxygénase-2 (COX-2), avec des énergies de liaison souvent comparables voire supérieures à celle de l'acide méfénamique (-6.56 kcal/mol), un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) de référence. Cependant, leur mode de fixation ne semble pas reproduire celui des inhibiteurs compétitifs classiques de la COX-2, tels que l'aspirine, en raison de l'absence fréquente d'interactions directes avec les résidus catalytiques clés TYR385 et SER530, essentiels pour l'activité enzymatique via l'acétylation de SER530.

Il est important de noter qu'aucun des flavonoïdes testés ne présente les mêmes interactions observées avec le ligand co-cristallisé de la COX-2 (PDB 5IKR du ligand co-cristallisé, acide méfénamique). L'absence de contacts directs avec TYR385, impliqué dans l'abstraction du proton lors de la catalyse, et SER530, site de l'acétylation par l'aspirine et point d'ancrage pour de nombreux inhibiteurs, pourrait potentiellement limiter leur efficacité en tant qu'inhibiteurs compétitifs directs ciblant le centre catalytique principal. Cette observation nous mène à supposer l'hypothèse d'un mécanisme d'inhibition de type non compétitif, où les flavonoïdes se fixeraient sur un site distinct de Tyr385 et Ser530, possiblement en interagissant avec des sites secondaires de l'enzyme.

Cette hypothèse est fortement corrélée à la topologie particulière du site actif de la COX-2, qui présente un volume plus important que celui de la COX-1 et se distingue par la présence d'une poche latérale élargie. Cette caractéristique structurale est principalement due à la substitution d'une isoleucine en position 523 dans la COX-1 par une valine correspondante en position 509 dans la COX-2 (Picot et al., 1994). Cette différence conformationnelle confère à la COX-2 la capacité de fixer des inhibiteurs sélectifs plus volumineux, tels que les coxibs (célécoxib, rofécoxib), qui interagissent spécifiquement avec cette poche secondaire et présentent des énergies de liaison souvent nettement plus faibles (inférieures à -9,0 kcal/mol) (Kurumbail et al., 1996 ; Gierse et al., 2005), induisant des changements conformationnels qui altèrent l'accès au site catalytique ou la progression de la réaction.

Parmi les composés étudiés, la myricétine, la quercétine et la fisétine se distinguent par leurs scores d'interaction élevés et leurs interactions multiples avec des résidus clés du site actif de la COX-2 tels que HIS39 (impliqué dans l'orientation du substrat), GLN42 (participant à la liaison du substrat et des inhibiteurs), ASP125 (jouant un rôle dans la catalyse via l'activation de la base catalytique) et, dans certains cas, des interactions indirectes ou à distance avec TYR385. Ces résidus sont reconnus pour leur rôle essentiel dans la reconnaissance et la liaison des inhibiteurs au site actif de l'enzyme [Orlando et al., 2014]. La présence de multiples groupes hydroxyles dans la structure des flavonoïdes comme la myricétine et la quercétine favorise la formation de liaisons hydrogène stables avec ces résidus polaires, contribuant significativement à l'augmentation de l'affinité pour la cible.

En plus, la disposition plane des cycles aromatiques dans ces flavonoïdes permet la formation d'interactions de type π - π stacking avec des résidus aromatiques du site actif, tels que TYR385 (même en l'absence de contact direct avec son groupe hydroxyle catalytique) ou PHE518 (situé à l'entrée du canal hydrophobe menant au site actif). Ces interactions aromatiques jouent un rôle particulièrement important dans la liaison de l'acide méfénamique et du célécoxib, où la présence de noyaux aromatiques volumineux contribue à la stabilité du complexe enzyme-ligand [Grosser et al., 2017]. Ce même type d'interaction est observé avec certains flavonoïdes comme la galangine et la myricétine, renforçant leur potentiel inhibiteur par des mécanismes complémentaires.

Il est important de souligner que la sélectivité et l'affinité des flavonoïdes pour la COX-2 semblent être fortement modulées par des facteurs structuraux tels que le nombre et la position des groupes hydroxyles et méthoxyles, la coplanarité de la molécule et la présence de systèmes aromatiques étendus, autant de déterminants bien établis dans la relation structure-activité (SAR) des inhibiteurs de COX-2 [Cao et al., 2020]. Les flavonoïdes étudiés se distinguent par la diversité de leurs interactions moléculaires, incluant des liaisons hydrogène avec des résidus comme ARG44, GLN42, GLU465, CYS47, ALA151 ou TYR130 (résidus situés à proximité du centre catalytique et potentiellement impliqués dans des interactions allostériques ou la modulation de l'accès au site actif), ainsi que des interactions π - π stacking et π -cation avec des résidus aromatiques chargés comme ARG44 et TYR385. Ce mode de fixation indirect, privilégiant des interactions avec des régions adjacentes au site catalytique principal, renforce l'hypothèse d'une inhibition non compétitive

Ces résultats suggèrent un profil de liaison favorable de ces flavonoïdes à la COX-2. Ces observations s'alignent avec les données de la littérature indiquant que certains flavonoïdes peuvent inhiber sélectivement la COX-2 que la COX-1, ce qui leur confère un intérêt pharmacologique significatif dans le développement d'agents anti-inflammatoires plus sûrs avec un profil d'effets secondaires potentiellement réduit (Kim et al., 2004 ; Garcia-Lafuente et al., 2009).

Ces résultats prometteurs justifient pleinement d'entreprendre des approches de modélisation quantitative structure-activité (QSAR) afin d'optimiser les structures des flavonoïdes pour une meilleure affinité et sélectivité, ainsi que des validations expérimentales rigoureuses *in vitro* et *in vivo* pour élucider leur mécanisme d'action précis et évaluer leur potentiel thérapeutique.

CONCLUSION :

Le docking moléculaire, une approche computationnelle *in silico* essentielle dans le processus de découverte de médicaments, a été appliqué dans cette étude afin d'explorer les interactions potentielles entre une série de neuf composés flavonoïdes bioactifs (appartenant aux classes des flavones, flavonols et flavanones) et la cyclooxygénase-2 (COX-2), une cible thérapeutique clé impliquée dans la réponse inflammatoire. L'objectif principal était d'identifier de nouveaux candidats médicaments d'origine naturelle susceptibles d'inhiber la COX-2, offrant ainsi une alternative potentiellement plus sûre aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) conventionnels, connus pour leurs effets secondaires parfois limitants. La structure cristallographique de la COX-2 utilisée (PDB : 5IKR), un complexe tétramérique co-cristallisé avec l'acide méfénamique, a servi de modèle moléculaire pour le site de liaison, et les simulations de docking ont été ciblées sur la chaîne A de cette enzyme, constituée de 551 résidus d'acides aminés.

Les résultats de nos simulations de docking révèlent que plusieurs flavonoïdes, notamment la myricétine, la quercétine et la fisétine, présentent une affinité de liaison modérée à prometteuse pour la COX-2, avec des scores d'interaction comparables, voire dans certains cas légèrement supérieurs, à celui de l'acide méfénamique (-6.56 kcal/mol), un AINS non sélectif couramment utilisé. Néanmoins, l'analyse détaillée des modes d'interaction met en lumière une distinction significative par rapport aux AINS classiques. Contrairement à l'acide méfénamique, qui établit des contacts directs avec les résidus catalytiques cruciaux TYR385 (impliqué dans l'abstraction de l'hydrogène lors de la catalyse) et SER530 (site de l'acétylation par l'aspirine et point d'ancrage pour de nombreux inhibiteurs compétitifs), les flavonoïdes étudiés interagissent préférentiellement avec des résidus situés à la périphérie du site actif, tels qu'ARG44 (impliqué dans la liaison des substrats carboxylates), GLN42 (participant à l'orientation du substrat), GLU465 (potentiellement impliqué dans la modulation allostérique), CYS47 (proche du site hémique), ALA151 et TYR130 (situés dans des régions adjacentes du site de liaison). Cette observation suggère un mécanisme d'inhibition potentiellement distinct, orientant vers un mode non compétitif, où la liaison du flavonoïde pourrait induire des changements conformationnels affectant l'activité enzymatique *cox2*.

L'examen des relations structure-activité (RSA) au sein de la série de flavonoïdes étudiée indique une corrélation entre la présence et le positionnement des groupements hydroxyle sur le squelette flavonoïdique et l'affinité de liaison prédite. L'augmentation du nombre de groupes hydroxyle, notamment en positions favorisant la formation de liaisons hydrogène stables avec les résidus du site de liaison, semble influencer positivement l'affinité. Ces résultats préliminaires, issus d'une approche *in silico*, ouvrent des perspectives intéressantes pour l'exploration et le développement de nouveaux agents anti-inflammatoires d'origine naturelle, potentiellement dotés d'un profil pharmacologique plus favorable.

En termes de perspectives, il serait intéressant de réaliser des études de dynamique moléculaire pour explorer la stabilité des complexes flavonoïde-COX-2 et les changements conformationnels induits. De plus, des essais *in vitro* d'inhibition enzymatique sont nécessaires pour valider les résultats du docking et déterminer l'activité inhibitrice réelle de ces composés.

Enfin, l'optimisation de la structure des flavonoïdes, guidée par les informations sur les RSA, pourrait conduire à la découverte de nouveaux inhibiteurs de la COX-2 plus puissants et sélectifs, avec un profil de sécurité potentiellement amélioré.

RÉFÉRENCES :

- Arrault, A. (2007), Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma [Thèse de doctorat, Université d'Orléans].
- Attiq, A., Jalil, J., Husain, K., et Ahmad, W. (2018). Raging the War Against Inflammation with Natural Products. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 976.
- Bahar I, Atilgan A R, Erman B. (1997), Direct Evaluation of Thermal Fluctuations in Proteins Using a Single Parameter Harmonic Potential. *Fold. Des.*, Vol. 2, pp. 173-181.
- Barkema G T, Mousseau N. (1996), Event-Based Relaxation of Continuous Disordered Systems. *Phys. Rev. Lett.*, Vol. 77, pp. 4358-4361.
- Beziere, N. (2010). Optimisation du concept d'inhibition de Cyclooxygénase dans le traitement du cancer de la prostate. UNIVERSITE DE LILLE 2 – DROIT ET SANTE.
- Boo, H. J., Yoon, D., Choi, Y., Kim, Y., Cha, J. S., et Yoo, J. (2025). Quercetin: Molecular Insights into Its Biological Roles.
- B.S.J. Winkel. (2007), The Biosynthesis of Flavonoids. In *The Science of Flavonoids*, E. Grotewold, Ed. Springer.
- Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., et Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*.
- Brodowska, K. M. (2017). Natural flavonoids: Classification, potential role, and application of flavonoid analogues. *European Journal of Biological Research*.
- Calderon-Montano, J. M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., & Lopez-Lazaro, M. (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry*.
- Cavillon, F. (2008). Caractérisation de la liaison hydrogène dans des systèmes moléculaires d'intérêt biologique par diffusion de neutrons.
- Charrière, K., Schneider, V., Perrignon-Sommet, M., Lizard, G., Benani, A., Jacquin-Piques, A., et Vejux, A. (2024). Exploring the Role of Apigenin in Neuroinflammation: Insights and Implications. *Int. J. Mol. Sci*.
- Chen, C. Y., Peng, W. H., Tsai, K. D., et Hsu, S. L. (2007). Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- κ B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life Sciences*.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., et Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*.
- Chen, X., et al. (2018). Flavonoids as anti-inflammatory agents: Mechanisms of action. *Current Medicinal Chemistry*.

Christ-Crain, M., et Müller, B. (2007). Procalcitonin in bacterial infections--hype, hope, more or less? *Swiss Medical Weekly*.

Ciz, M., Pavelkova, M., Gallova, L., Kralova, J., Kubala, L., et Lojek, A. (2012). The influence of wine polyphenols on reactive oxygen and nitrogen species production by murine macrophages RAW 264.7. *Physiological Research*, 61(2), 145-153.

Clark, J. (2009). *Edexcel IGCSE CHEMISTRY Syllabus*. s.l.: Pearson.

Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., et Zarzuelo, A. (2005). In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *European Journal of Immunology*.

Danesh, J., Lewington, S., Thompson, S. G., Lowe, G. D. O., Collins, R., Kostis, J. B., Wilson, A. C., Folsom, A. R., Wu, K., Lavi, S., Lamas, G. A., et Yusuf, S. (2005). Plasma fibrinogen level and the risk of major cardiovascular diseases and nonvascular mortality: An individual participant meta-analysis. *JAMA*.

Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., & Lipsky, P. E. (1998). Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB Journal*.

Dinarello, C. A. (2010). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*.

Dixon, R. A., et Pasinetti, G. M. (2010). Flavonoids and isoflavonoids: From plant biology to agriculture and neuroscience. *Plant Physiology*.

Dougherty, D. A. (2013). Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*.

Dudev, T., et Lim, C. (2014). TUNing metal–ligand interactions in metalloproteins. *Chemical Reviews*.

Dumond, S. (2021). La prise d'Anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) dans le cadre sportif : enquête auprès des milieux amateurs et professionnels [Thèse d'exercice, Université de Bordeaux].

FitzGerald, G. A., & Patrono, C. (2001). The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *New England Journal of Medicine*.

Fox, S.; Wang, H.; Sopchak, L.; Khoury, R. (2001), High throughput screening: early successes indicate a promising future. *J. Biomol. Screen*.

Gaillard, T. (2018). Docking ligands into flexible and/or large receptors. *Molecular Informatics*.

Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*.162-169. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>

García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537-552. <https://doi.org/10.1007/s00011-009-0037-3>

Gierse JK, Hauser SD, Creely DP, Koboldt CM, Rangwala SH, Isakson PC, Seibert K. (2005). Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclooxygenase. *Biochem J*.

Gierse, J. K., McDonald, J. J., Hauser, S. D., Rangwala, S. H., Koboldt, C. M., et Seibert, K. (1996). A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and-2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*.

Grandin, F. (2013). Pharmacologie des anti-inflammatoires non stéroïdiens. EMC - Pharmacologie.

Grandin, M. (2013). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens, utilisation et conseils dans la pratique officinale quotidienne. Document étayé par une analyse d'ordonnances d'une pharmacie rurale [Thèse d'exercice, Université d'Angers].

Grosser, T., Fries, S., & FitzGerald, G. A. (2006). Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *Journal of Clinical Investigation*.

Grosser, T., Theken, K. N., et FitzGerald, G. A. (2017). Cyclooxygenase inhibition: pain, inflammation, and the cardiovascular system. *Clinical Pharmacology et Therapeutics*.

Grosser, T., Smyth, E., & FitzGerald, G. A. (2011). Anti-inflammatory, antipyretic, and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. In: Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th Ed.

Harizi, H., Corcuff, J. B., et Gualde, N. (2008). Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine*.

Haroun, M., Fesatidou, M., Petrou, A., Tratat, C., Zagaliotis, P., Gavalas, A., Venugopala, K. N., Kochkar, H., Emeka, P. M., Younis, N. S., Elmaghraby, D. A., Almostafa, M. M., Chohan, M. S., Vizirianakis, I. S., Papadimitriou-Tsantarliotou, A., et Geronikaki, A. (2023). Identification of Novel Cyclooxygenase-1 Selective Inhibitors of Thiadiazole-Based Scaffold as Potent Anti-Inflammatory Agents with Safety Gastric and Cytotoxic Profile. *Molecules*.

Haute Autorité de Santé (HAS). (2013, Février). Bon usage des médicaments antalgiques : alternatives aux AINS chez l'adulte dans les douleurs nociceptives aiguës et chroniques. Consulté le 7 avril 2025, à l'adresse https://www.has-sante.fr/jcms/c_1365794/fr/bon-usage-des-medicaments-antalgiques-alternatives-aux-ains-chez-l-adulte-dans-les-douleurs-nociceptives-aigues-et-chroniques.

Hawiger, J., et Zienkiewicz, J. (2019). Decoding inflammation, its causes, genomic responses, and emerging countermeasures. *Scandinavian Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1111/sji.12812>

- HAZHAZI, N. (2020). Evaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo des plantes médicinales (*Ruta tuberculata* Forssk. et *Pergularia tomentosa* L.). Université Mohamed Khider de Biskra.
- Herrmann, K. M., et Weaver, L. M. (1999). The Shikimate Pathway. *Annual Review of Plant Biology*.
- Hnewa, R., et Hassan, D. M. (s. d.). The Impact of Inflammation on Pathological Processes.
- Honig, B., et Nicholls, A. (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry science.
- Hsin, J., Arkhipov, A., Yin, Y., McCullough, M., Xu, J., et Schulten, K. (2008). Applications of molecular dynamics simulations in drug discovery. *Current Opinion in Structural Biology*.
<https://core.ac.uk/reader/39994140>
- Huang, S. M., Wu, C. H., et Yen, G. C. (2012). Effects of flavonoids on the expression of the pro-inflammatory response in human monocytes induced by ligation of the receptor for AGEs. *Molecular Nutrition et Food Research*.
- Hussain, A., et al. (2016). Flavonoids and inflammation: From chemistry to pharmacological activities. *Inflammopharmacology*.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., et Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.
- Hydrophobic interactions. (n.d.). In *Wikipedia*. Retrieved from
https://en.wikipedia.org/wiki/Hydrophobic_interactions
- Inflammation. Review *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, p 1-15.
- Jahn T R, Radford S E. (2008). Folding versus Aggregation: Polypeptide conformations on Competing Pathway. *Biochem. and Biophys.*, Vol. 468, pp. 100-117.
- J.P.J. Marais, B. Deavours, R.A. Dixon, D. Ferreira, (2007), The Stereochemistry of Flavonoids. In *The Science of Flavonoids*, E. Grotewold, Ed. Springer: 2007; pp 1-46.
- Jeffrey, G. A. (1997). An introduction to hydrogen bonding. Oxford University Press.
- Kearney, P. M., Baigent, C., Godwin, J., Halls, H., et Emberson, J. (2006). Do selective cyclooxygenase-2 inhibitors increase the risk of myocardial infarction? A meta-analysis of randomized trials. *The Lancet*.
- Khalil.M, (2016). Interactions et stabilité des protéines étudiées par spectroscopie infrarouge et Raman, thèse de doctorat, université de Strasbourg (France).
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3), 229-245. <https://doi.org/10.1254/jphs.CRJ04003X>

Kim, H., et Jobin, C. (2005). The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase complex activity. FEBS Letters.

Kumar, A., et Chaudhary, K. K. (2021). Molecular docking: principles, advances, and its applications in drug discovery. Journal of Future Medicine and Healthcare.

Kumar, S., et Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. The Scientific World Journal.

Kumar, V., Abbas, A. K., et Aster, J. C. (2021). Robbins et Cotran Pathologic Basis of Disease (10th ed.). Elsevier.

Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature. 1996;384(6610):644–648. doi:10.1038/384644a0

Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., et Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. Nutrients.

López-Blanco, J. P., Canosa-Valls, A. J., Querol, E., et Fernández-Recio, E. (2014). Protein-protein docking in the genomics era. Current Opinion in Structural Biology.

Lopez-Lazaro, M. (2009). Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.

Luong, C., et al. (1996). Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. Nature Structural Biology. <https://doi.org/10.1038/nsb1196-927>

M, Suresh Kumar S, (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in

Maeda, H., et Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. Annual Review of Plant Biology.

Mancini, J. A., et al. (1995). Differential inhibition of prostaglandin G/H synthase isozymes by anti-inflammatory drugs. The Journal of Biological Chemistry. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)51912-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)51912-6)

Orlando, B.J., Malkowski, M.G., Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone.(2016) J Biological Chem

Mann, J. (2012). Secondary Metabolism and Natural Product Biosynthesis. Oxford University Press.

Martina, S. D., Vesta, K. S., et Ripley, T. L. (2005). Etoricoxib: A Highly Selective COX-2 Inhibitor. Annals of Pharmacotherapy. <https://doi.org/10.1345/aph.1e543>

Materska, M. (2008). Quercetin and its derivatives: Chemical structure and bioactivity - A review. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. Nature.

- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*.
- Meng, X. Y., Zhang, H. X., Mezei, M., et Cui, M. (2011). Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*.
- middleton, e., kandaswami, c., & theoharides, t. c. (2000). the effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *pharmacological reviews*.
- Milburn D, Gerstein M. (2004). Conformational Changes Associated with Protein-Protein Interactions. Goh C S, *Curr. Op. Struct. Biol.*, Vol. 14, pp. 104-109.
- Mouffouk C. (2019). Evaluation des activités biologiques et étude de la composition
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Nair, M. P., Mahajan, S., Reynolds, J. L., Aalinkeel, R., Nair, H., Schwartz, S. A., et Kandaswami, C. (2006). The flavonoid quercetin inhibits proinflammatory cytokine (tumor necrosis factor alpha) gene expression in normal peripheral blood mononuclear cells via modulation of the NF-kappa beta system. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13(3), 319–328.
- Nathan, C., et Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6), 871–882.
- National center for biotechnology information (2025). Pubchem compound summary for cid 5280445, luteolin. Retrieved april 9, 2025 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/luteolin>.
- Nicholas, C., Batra, S., Vargo, M. A., Voss, O. H., Gavrillin, M. A., Wewers, M. D., Guttridge, D. C., Grotewold, E., et Doseff, A. I. (2007). Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced cytokine release through the inhibition of nuclear factor-kappaB activation. *The Journal of Nutrition*.
- Nuhrich, A. (2015). Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Université Numérique Francophone des Sciences de la Santé et du Sport (UNF3S).
- Nuhrich, A. (2015). Les AINS : efficacité et risques selon leur sélectivité COX. *Pharmactuel*.
- Pagadala, N. S., Syed, K., et Tuszynski, J. (2017). Software for molecular docking: a review. *Journal of Molecular Recognition*.
- Pairet, M., Van Ryn, J., Schierok, H., Mauz, A., Trummelitz, G., et Engelhardt, G. (1998). Differential inhibition of cyclooxygenases-1 and -2 by meloxicam and its 4'-isomer. *Inflammation Research*. <https://doi.org/10.1007/s000110050329>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., et Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*.

- Patrignani, P., et Patrono, C. (2015). Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*.
- Picot D, Loll PJ, Garavito RM. (1994), The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. doi:10.1038/367243a0
- Pichersky, E., et Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*.
- Procházková, D., Boušová, I., et Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*.
- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., et Kohli, K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation et Allergy-Drug Targets*.
- Rathee, P., et al. (2009). *Inhibition of COX-2* expression and the mechanism of action of flavonoids. *Phytochemistry Reviews*.
- Rayar, A.-M. (2017). In silico drug design et chimie médicinale : Développement de nouvelles molécules coumariniques, sélectives de la cyclooxygénase-2.
- Ricciotti, E., et FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*.
- Ricciotti, E., et FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., et Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*.
- Roe, K. (2021). An inflammation classification system using cytokine parameters. *Scandinavian Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1111/sji.12970>
- Rothwell, J. A., Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Medina-Remón, A., M'hiri, N., García-Lobato, P., Manach, C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D. S., et Scalbert, A. (2013). Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content.
- Schett, G., Dayer, J. M., et Manger, B. (2016). Interleukin-1 function and role in rheumatic disease. *Nature Reviews Rheumatology*.
- Schijlen, E., Ric de Vos, C. H., Jonker, H., van den Broeck, H., Molthoff, J., van Tunen, A., et Bovy, A. (2004). Pathway engineering for healthy phytochemicals in plants. *Phytochemistry Reviews*, 3, 5-18.
- Schuetz, P., Wirz, Y., Sager, R., Christ-Crain, M., Stolz, D., Tamm, M., Bouadma, L., Luyt, C. E., Wolff, M., Chastre, J., Tubach, F., Krishnan, J. A., Lemanske, R. F., et Gibbons, D. L. (2017). Effect of procalcitonin-guided antibiotic treatment on mortality in acute respiratory infections: a patient level meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*.

Serhan, C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*.

Shen, M., Tian, S., Dong, X., Liu, X., Wang, T., Huang, Z., et Hou, X. (2022). Molecular docking: a step-by-step protocol. *Current Protocols*.

Shukla, S., et Gupta, S. (2010). Apigenin: A promising molecule for cancer prevention. *Pharmaceutical Research*.

Smith, W. L., DeWitt, D. L., et Garavito, R. M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*.

Sproston, N. R., et Ashworth, J. J. (2018). Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*.

StatPearls [Internet]. 2021.

Su, M., Yang, Q., Du, Y., Feng, G., Liu, Z., Li, Y., et Wang, S. (2019). Knowledge-based scoring functions in virtual screening: successes, limitations, and future directions. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*.

Tanaka, T., Narazaki, M., et Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.

Tang, S. M., Deng, X. T., Zhou, J., Li, Q. P., Ge, X. X., et Miao, L. (2017). Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomedicine et Pharmacotherapy*.

Tishkowski, K., et Zubair, M. (2025). Erythrocyte Sedimentation Rate. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., et Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*.

Vane, J. R., et Botting, R. M. (2003). The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis research*.

Vidale, S., Consoli, A., Arnaboldi, M., et Consoli, D. (2017). Postischemic Inflammation in Acute Stroke. *Journal of Clinical Neurology*. <https://doi.org/10.3988/jcn.2017.13.1.1>

Vilar, S., Cozza, G., et Moro, S. (2008). Scoring functions for protein-ligand docking: current challenges and future directions. *Current Medicinal Chemistry*.

Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*.

Wallace, J. L., et Vong, L. (2008). NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. *Current Opinion in Investigational Drugs*.

Wang, L., Wu, Y., Deng, Y., Kim, B., Pierce, L., Krilov, D., et Friesner, R. A. (2015). Accurate and reliable prediction of relative ligand binding affinity in pharmaceutical drug discovery. *Journal of the American Chemical Society*.

Warner, T. D., et Mitchell, J. A. (2004). Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *The FASEB Journal*.

Winkel-Shirley, B. (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*.

Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Xiao, J. (2017). Inhibition of iNOS and inflammatory cytokine production by flavonoids: Potential implications for inflammatory disease management. Free Radical Biology and Medicine.

Xiao, X., Shi, D., Liu, L., Wang, J., Xie, X., Kang, T., et Deng, W. (2016). Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. *PLoS One*.

Zhang, H., Tsao, R. (2017). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.

Zhang, W., et al. (2017). Regulation of NF- κ B signaling in inflammation: A review of flavonoid action. *Journal of Inflammation*.

Yun M R, Lavery R, Mousseau N, Zakrzewska K, (2006). Derreumaux P ARTIST: An Activated Method in Internal Coordinate Space for Sampling Protein Energy Landscapes *Prot. Struct. Gen. Bioinfo.*, Vol. 63, pp. 967-975.