



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences, de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Thème :

Les inhibiteurs de CYP24A1 pour un maintien Spontané du niveau de 1.25(OH) 2D

Présenté par :

Mr: BELABBACI MOHAMMED EL AMINE

Jury :

Encadré par **Dr. CHERRAK** Université De Tlemcen

Président **Pr. SAHI-DALI YUCEF Majda** Université De Tlemcen

Examineur **Pr. Bouanane Samira** Université De Tlemcen

Année universitaire : 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

- (1) الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ (2) الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ (3)
مَالِكِ يَوْمِ الدِّينِ (4) إِيَّاكَ نَعْبُدُ وَإِيَّاكَ نَسْتَعِينُ (5)
اهْدِنَا الصِّرَاطَ الْمُسْتَقِيمَ (6) صِرَاطَ الَّذِينَ أَنْعَمْتَ
عَلَيْهِمْ غَيْرِ الْمَغْضُوبِ عَلَيْهِمْ وَلَا الضَّالِّينَ (7)

قيل عن العلم :

لا يزال المرء عالمًا ما دام في طلب العلم، فإذا ظن أنه قد علم، فقد بدأ جهله.

- ما من تُقدم علمي كبير إلا وناتج عن جرأة جديدة للخيال.

Remerciements

Avant tout je remercie " **Allah** " le tout puissant qui m'a aidé et m'a donnée la force et la volonté

Pour réaliser ce modeste travail.

Je tiens à remercier mon encadrant, monsieur Dr. **CHERRAK Ahmed Sabri**, pour son soutien, sa grande disponibilité, ses encouragements, ses précieux conseils.

Je tiens également à remercier, **Madame Dali Madjda**, d'avoir accepté d'examiner ce travail, leurs remarques et critiques me seront précieuses et enrichissantes.

Je tiens à exprimer également toute ma reconnaissance à **Mr CHERRAK Sabri** pour m'avoir

Guidé durant la réalisation du travail avec une disponibilité permanente et de m'avoir fait

Bénéficiaire de ses connaissances dans le domaine de docking moléculaire.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes enseignants du département de biologie à la

Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, des sciences de la Terre et de l'Univers, Université

Abou-BakrBelkaid Tlemcen.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes chers parents les plus proches de mon cœur, pour

Leur sacrifice et leurs encouragements tout au long de mes études

À la bougie qui est la source de la lumière de ma vie, et qui font toujours pour

Éclairer mon chemin, à mon cher père **Abdelkader**, je dédie ce travail et lui

Souhaite une longue et bonne vie

À la fleur qui adoucit et parfume mes journées, qui soutiennent les nuits

Jusqu'au sommeil, à ma chère maman **Khalida**, je dédie ce travail et lui

Souhaite une longue et heureuse vie.

À toute ma famille

À toute personne qui a participé de loin ou de près dans la réalisation de ce

Travail

- **Titre**

Les inhibiteurs de CYP24A1 pour un maintien Spontané du niveau de 1.25(OH) 2D. Présenté pour l'obtention du diplôme de Master Par: **Mr:** BELABBACI MOHAMMED EL AMINE

- **Mots Clés :**

- Vitamine D
- CYP24A1
- 25-hydroxyvitamine D-24-hydroxylase
- Voie d'oxydation C24
- Voie d'hydroxylation C23
- 24,25- dihydroxyvitamine D
- Hypercalcémie infantile idiopathique
- Les suppléments
- ostéopénie,
- ostéoporose.

Résumé

L'enzyme CYP24A1 appartient à une famille d'enzymes appelées enzymes du cytochrome P450, qui joue un rôle important dans le métabolisme de la vitamine D3. Il est responsable de la conversion de la forme biologiquement active de la vitamine D, la 1,25-dihydroxyvitamine D3, en une forme inactive qui peut être excrétée par l'organisme.

Cette étude a pour but de présenter des inhibiteurs efficaces de cette enzyme afin de réduire son effet et d'empêcher la conversion de la vitamine D active en sa forme inactive.

Pour atteindre notre objectif, nous avons eu recours à l'approche par le docking moléculaire à l'aide du logiciel UCSF Chimera pour étudier in silico les interactions de 8 analogues de CTA09 ; un inhibiteur reconnu de notre cytochrome CYP24A1. Enfin, le serveur Swiss ADME a été utilisé pour prédire les propriétés pharmacocinétiques de ces analogues.

Il en ressort que les composantes portant les codes Pubchem 9890238, 9957646 et 9982688 sont les meilleurs candidats potentiels actifs envers le CYP24A1.

Abstract

The CYP24A1 enzyme belongs to a family of enzymes called cytochrome P450 enzymes, which plays an important role in vitamin D3 metabolism. It is responsible for converting the biologically active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D3, into an inactive form that can be excreted from the body.

This study aims to present effective inhibitors of this enzyme in order to reduce its effect and to prevent the conversion of active vitamin D into its inactive form.

To achieve our goal, we used the molecular docking approach using the UCSF Chimera software to study in silico the interactions of 8 analogs of CTA09; a recognized inhibitor of our cytochrome CYP24A1. Finally, the Swiss ADME server has been used to predict the pharmacokinetic properties of these analogues.

It appears that the components bearing the Pubchem codes 9890238, 9957646 and 9982688 are the best potential candidate's active against CYP24A1

الملخص

ينتمي إنزيم CYP24A1 إلى عائلة من الإنزيمات تسمى إنزيمات السيتوكروم P450 ، والتي تلعب دورًا مهمًا في استقلاب فيتامين D3. وهي مسؤولة عن تحويل الشكل النشط بيولوجيًا لفيتامين د ، 1،25-ديهيدروكسي فيتامين د 3 ، إلى شكل غير نشط يمكن إفرازه من الجسم.

تهدف هذه الدراسة إلى تقديم مثبطات فعالة لهذا الإنزيم لتقليل تأثيره ومنع تحويل فيتامين د النشط إلى شكله غير النشط.

لتحقيق هدفنا ، استخدمنا نهج الالتحام الجزيئي باستخدام برنامج UCSF Chimera لدراسة تفاعلات 8 نظائر CTA09 في silico ؛ مثبت معترف به للسيتوكروم لدينا CYP24A1. أخيرًا ، تم استخدام خادم ADME السويسري للتنبؤ بخصائص الحرائك الدوائية لهذه النظائر.

يبدو أن المكونات التي تحمل رموز Pubchem 9890238 و 9957646 و 9982688 هي أفضل المرشحين المحتملين النشطين تجاه CYP24A1.

TABLE DES MATIERES

<u>TABLE DES MATIERES</u>	08
<u>Liste des abréviations et des acronymes</u>	09
<u>Table des figures</u>	10
<u>Liste des tableaux</u>	10
<u>Synthèse Bibliographique</u>	11
<u>CHIPITRE 1 : Vitamine D</u>	12
<u>Introduction</u>	13
1. Présentation de la vitamine D	14
2. Origine de la vitamine D.....	15
2.1. Sources alimentaires.....	15
2.2. Synthèse cutanée du cholécalciférol.....	17
3. Métabolisme de la vitamine D.....	18
4. Catabolisme de la vitamine D.....	22
5. Mécanisme d'action de la vitamine D.....	23
6. Effets de la vitamine D.....	24
6.1. Effets « classiques ».....	24
6.2. Effets « non classiques ».....	24
<u>CHIPITRE II : CYP24A1</u>	26
1. Mécanisme	27
2. Cyp24A1 et la vitamine D.....	30
3. Les inhibiteurs de la CYP24A1.....	31
<u>Matériels et Méthodes</u>	33
1. Préparation de la protéine.....	34
2. Téléchargement de ligands « inhibiteurs»	34
3. L'amarrage moléculaire	35
4. Identification des interactions.....	35

5. Détermination des paramètres pharmacocinétique.....	35
Résultats et Discussion	36
Conclusion	48
Liste des Références	49

Liste des abréviations et symboles :

- TLR2 Toll-like receptor 2
- 1, 25(OH) 2 1, 25 di-hydroxy vitamine D ou calcitriol
- 25OHD 25 hydroxy-vitamine D ou calcidiol
- CYP24a1 Cytochrome P450 famille 24, sous famille A, polypeptide 1
- CYP450 Cytochrome P450
- DBP Vitamine D Binding Protein
- ADME les propriétés pharmacocinétiques,
- UV ultraviolet
- 7DHC le 7 dehydrocholesterol

Table des figures

- *Figure1 : structure chimique de la vitamine D₂ et d₃*_____14
- *Figure2 : la formation de la prévitamine D₃ dans la peau exposée au soleil* ____18
- *Figure3 : Résumé du métabolisme de la vitamine D* _____21
- *Figure4 : schéma résumant le métabolisme global de la vitamine D*_____22
- *Figure5 : Structure de protéine CYP24A1*_____27
- *Figure6 Voies enzymatiques catalysées par le CYP24A1*_____29
- *Figure7 : Activation de la vitamine D et l'inactivation de la vitamine D*_____30
- *Figure8 : la protéine CYP24A1 téléchargée à partir de la PDB(A)* _____34
- *Figure9 : Interaction 2D de composé portant le code 9890238 avec la protéine 3K9V(-7.9 kcal/mol)*_____42
- *Figure 10 : Interaction 2D de composé portant le code 9957646 avec la protéine 3K9V(-7.9 kcal/mol)*_____43
- *Figure 11 : Interaction 2D de composé portant le code 9982688 avec la protéine 3K9V(-7.9 kcal/mol)*_____44
- *Figure 12 : les propriétés ADME de ligand 9890238*_____45
- *Figure 13 : les propriétés ADME de ligand 9957646*_____46
- *Figure 14: les propriétés ADME de ligand 9982688*_____46

Liste des tableaux

- *Tableau 01 : principales sources naturelles des vitamines D₂ ou D₃*_____17
- *Tableau 02 : Teneur en équivalents vitamine D (µg / 100 g) en incorporant la 25 (OH) D ayant une activité estimée à cinq fois celle de la vitamine D [25]*_____17
- *Tableau 03 : Coordonnées et énergies de liaison des huit analogues de CTA091*_____39
- *Tableau 04 : Interactions des 8 ligands les mieux ancrés contre le site actif de la protéine 3K9V*_____40
- *Tableau 05 : Propriétés pharmacocinétiques des 3 principaux ligands*_____48



Synthèse
Bibliographique

Introduction

Introduction

La vitamine D est l'une des plus anciennes hormones fabriquées par les premières formes de vie pendant longtemps. La vitamine D est d'une importance capitale pour le développement, la croissance et le maintien d'un squelette sain de la naissance et pendant la vie jusqu'à la mort. La vitamine D agit sur de nombreux paramètres biologiques, fonctions et phénomènes physiopathologiques, au niveau osseux mais également extra-osseux.

La vitamine D a toujours eu une place à part dans l'histoire de la vitaminologie. Synthétisée majoritairement au niveau de la peau sous l'influence des rayons ultraviolets, mais peu présente dans l'alimentation, elle a été – et reste certainement – l'objet de nombreuses carences dans les pays où l'exposition solaire est insuffisante. Les suppléments aux âges précoces et avancés de la vie sont des recommandations classiques qui ont permis de lutter contre les maladies osseuses : rachitisme, ostéomalacie, ostéopénie, ostéoporose. Ces faits, unanimement reconnus, ne justifient d'aucune discussion, et le problème des carences en vitamine D semble être résolu en recommandant une supplémentation pharmacologique et une meilleure exposition solaire chez les jeunes enfants et les sujets âgés.

De plus, il convient de souligner que la vitamine D n'est pas une substance anodine, et que des suppléments excessives peuvent s'avérer dangereuses en provoquant des hypercalcémies ou des hypercalciuries, ces dernières pouvant conduire à la précipitation de calcium dans les tissus mous ou dans les voies excrétrices de certains organes qui, normalement, sont exemptes de dépôts calciques (parois artérielles, pancréas, parenchyme rénal, cavités pyéliqués). (1)

Chapitre I : Vitamine D



1) Présentation de la vitamine D

Le nom de vitamine D est classiquement donné à deux stéroïdes ayant une activité antirachitique, « **l'ergocalciférol, ou vitamine D₂** », et « **le cholécalciférol, ou vitamine D₃** ». Ces stéroïdes, dérivés du noyau cyclophénantrénique, sont des sécostéroïdes (la liaison 9,10 du cycle B est rompue) et diffèrent par leur chaîne latérale fixée en C17 : saturée dans le cas de la vitamine D₃, insaturée entre les carbones 22 et 23, et méthylée sur le carbone 24 dans le cas de la vitamine D₂. De très nombreux métabolites dérivés de la vitamine D₂, et de la vitamine D₃, ont été isolés, mais deux seulement jouent un rôle physiologique : la 25 - hydroxyvitamine D [25 (OH) D] et la 1,25 dihydroxyvitamine D [1.25 (OH) , D].

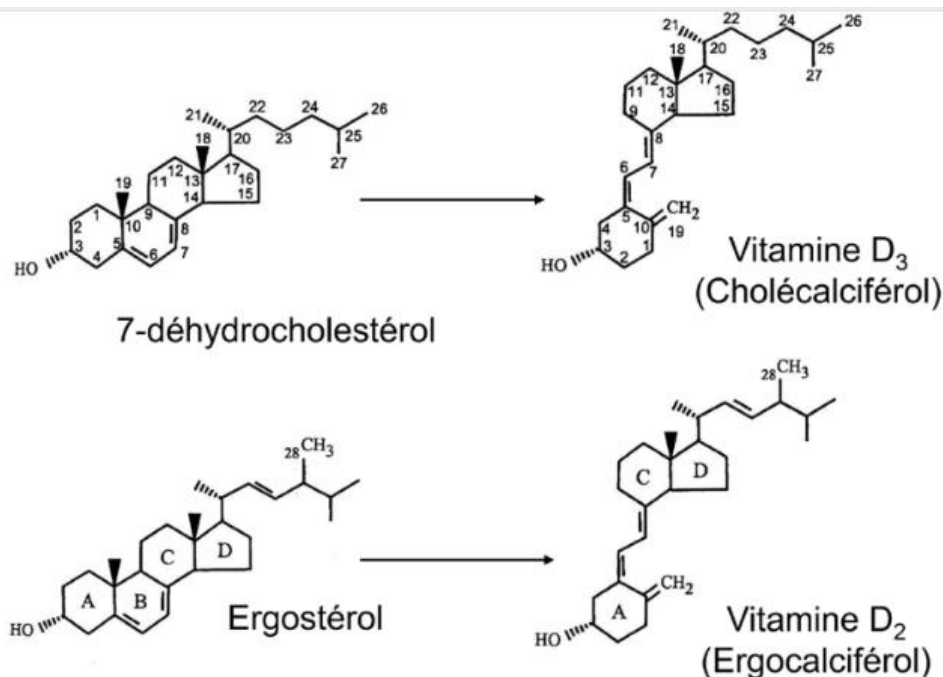


Figure 01 : Structure chimique de la vitamine D₃, de la vitamine et d₂ et de leurs précurseurs, le 7 dehydrocholesterol (7DHC) et l'ergostérol. La seule différence entre les vitamines D₃ et D₂ se situe au niveau de leur chaîne latérale. A la différence de la vitamine D₃, la chaîne de la vitamine D₂ comporte une double liaison entre les carbones 22 et 23 et un groupe méthyle sur le carbone 24.

La vitamine D₂, a été isolée à partir de l'ergot de seigle et se trouve dans un nombre restreint d'aliments d'origine végétale.

La vitamine D₃, a une double origine : endogène (synthèse cutanée à partir du 7 - dehydrocholesterol) et alimentaire. La plus grande partie des besoins de l'homme en vitamine D. évalués à 10-30 µg / jour selon les différents comités d'experts, doit être couverte par la synthèse cutanée du cholécaciférol du fait de l'insuffisance des apports alimentaires. (2)

2) Origines de vitamine D

La vitamine D a deux origines : **l'alimentation** (vitamines D₂ et D₃) et **la synthèse cutanée** (vitamine D₃ uniquement).

2-1) Sources alimentaires

Un nombre restreint d'aliments contient de la vitamine D en quantité significative. La vitamine D₂ n'est présente que dans quelques aliments d'origine végétale, dont les champignons et les levures. Seuls quelques aliments d'origine animale peuvent être considérés comme des sources suffisamment riches en vitamine D₃ (l'huile de foie de morue, les poissons, le jaune d'œuf). Du fait de son caractère liposoluble, la vitamine D₃ est présente dans la chair des poissons gras (sardines, harengs, maquereaux). Chez les poissons maigres (morue, thon), elle est concentrée dans le foie, d'où la richesse des huiles de foie de ces poissons.

Dans les produits animaux, la vitamine D₃ est associée à son métabolite monohydroxylé, la 25 (OH) D₃. Comme ce dernier est actif biologiquement, il semble justifié de prendre en compte ce métabolite. En fait, la 25 (OH) D₃ pourrait avoir une activité biologique cinq fois plus importante que celle de la vitamine D₃, mais ce résultat n'a pas été confirmé par tous les chercheurs. D'autres métabolites de la vitamine D₃ sont présents sous forme de traces et ne contribuent pas de ce fait à l'activité vitaminique D des aliments.

Tableau 01 : principales sources naturelles des vitamines D₂ ou D₃

Sources	Teneurs en vitamine D
Saumon, frais, sauvage (/100 g)	600-1 000 UI vitamine D ₃
Saumon, frais, d'élevage (/100 g)	100-250 UI vitamine D ₃ ou D ₂
Saumon, en boîte (/100 g)	300-600 UI vitamine D ₃
Sardines, en boîte (/100 g)	300 UI vitamine D ₃
Maquereau, en boîte (/100 g)	250 UI vitamine D ₃
Thon, en boîte (/100 g)	230 UI vitamine D ₃
Huile de foie de morue (/1 cuillère à café)	400-1 000 UI vitamine D ₃
Champignons Shiitake, frais (/100 g)	100 UI vitamine D ₂
Champignons Shiitake, séchés au soleil (/100 g)	1 600 UI vitamine D ₂
Jaune d'œuf entier	20 UI vitamine D ₃
Exposition au soleil en été ^a	1 000-3 000 UI vitamine D ₃

^a Correspondant à l'exposition des jambes et des bras pendant 5 à 10 minutes au soleil (dépend de l'heure de la journée, de la saison, de la latitude et de la pigmentation de la peau).

Tableau 02 : Teneur en équivalents vitamine D (µg / 100 g) en incorporant la 25 (OH) D ayant une activité estimée à cinq fois celle de la

Aliments	Vitamine D ₃	25(OH)D	Total en équivalents vitamine D
Filet de porc	0,18	0,14	0,88
Poulet	0,29	0,25	1,54
Rôti de porc	0,04	0,10	0,54
Agneau	0,10	0,20	1,10
Saumon	7,6	0,14	8,30
Margarine enrichie	7,25	0	7,25
Lait entier	0,01	0,007	0,045
Lait enrichi	1	0,007	1,035
Jaune d'œuf	6,70	1,20	12,70
Beurre	0,20	0,10	0,70
Champignons	(vitamine D ₂)	0	0,21 à 29,82

La valeur de la teneur en vitamine D, d'un aliment varie considérablement. C'est par exemple le cas des poissons et des huiles de foie de poisson, les sources alimentaires les plus riches en vitamine D₃,

2-2) Synthèse cutanée du cholécalciférol

Le cholécalciférol (vitamine D₃) est synthétisé à partir du 7 - dehydrocholestérol (7-DHC), un dérivé du cholestérol. Le 7 - DHC, principalement présent dans les couches profondes de l'épiderme, possède la structure tétracyclique et la chaîne latérale du cholestérol et deux doubles liaisons sur le cycle B, en 5-6 et 7-8. L'action des rayons UV - B sur le cycle B provoque son ouverture par rupture de la liaison 9-10 ; cette rupture est suivie d'une rotation de 180 ° du cycle A conduisant à la prévitamine D₃.

Les deux étapes de la synthèse endogène de la vitamine D₃ sont autorégulées par un système de rétrocontrôle négatif : la prévitamine D₃ est inactivée par photo - isomérisation en lumistérol et tachystérol et la vitamine D₃ est dégradée en 5,6 - transvitamine D₃ et en suprastérols 1 et 2. Cette voie de dégradation constitue un facteur limitant la capacité de synthèse de la vitamine D₃ en cas d'exposition solaire prolongée. La formation de lumistérol et de tachystérol est réversible et ces deux composés peuvent être convertis en prévitamine D, lorsque la concentration locale de celle - ci diminue.

La vitamine D₃ provient en majeure partie de sa synthèse endogène dans les couches profondes de la peau. Les rayons UV - B sont présents avec une intensité suffisante entre les mois de juin et d'octobre. Sur la base d'études sur volontaires sains, on estime que l'exposition du torse, des bras et des jambes pendant 20 à 30 minutes en été, à midi, dans un endroit non pollué et un jour sans nuage permet à un sujet dont la peau est très claire de synthétiser 250 à 375 µg (10 000 à 15 000 UI) de vitamine D₃. (3)

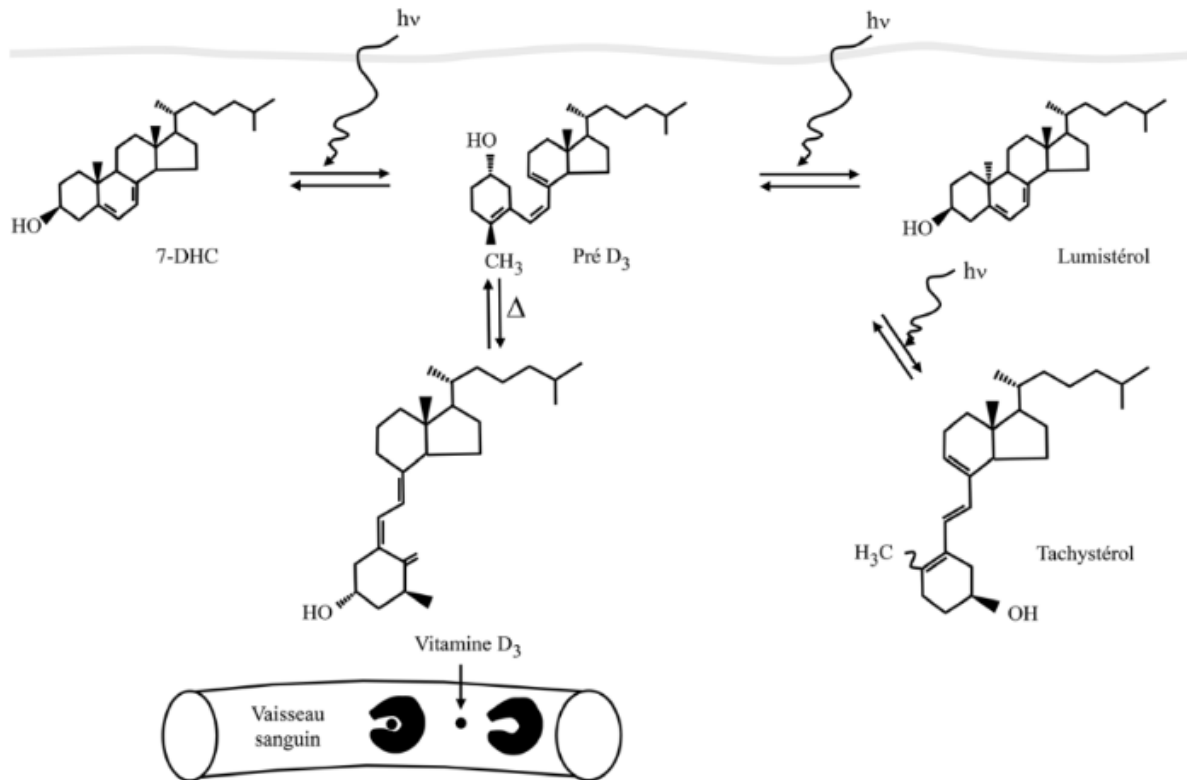


Figure 02 : Représentation schématique de la formation de la prévitamine D₃ dans la peau exposée au soleil et de l'isomérisation thermique de celle-ci en vitamine D₃ qui passe dans la circulation sanguine, ou elle est transportée par la vitamine D-Binding Protein (DBP). Lors d'une exposition solaire prolongée de la peau, la prévitamine D₃ s'isomérisent en lumistérol et tachystérol.

3) Métabolisme de la vitamine D

La vitamine D est très importante pour la croissance et la santé osseuse. À côté de ses effets classiques bien connus sur le métabolisme phospho-calcique et osseux, la vitamine D a des effets de mieux en mieux documentés sur bien d'autres fonctions de l'organisme.

La vitamine D (D₂ ou D₃) doit être transformée au niveau hépatique puis au niveau rénal pour devenir pleinement active en se liant à un récepteur présent dans des tissus cibles qu'elle atteint via la circulation sanguine. Elle peut donc être considérée plutôt comme une « pré-pro-hormone » que comme une vitamine.

La vitamine D (D₂ ou D₃) est transportée dans le sang par la « vitamin D binding protein » (DBP) et est hydroxylée dans le foie pour former la 25-hydroxy vitamine D

(25OHD). Cette hydroxylation hépatique est très peu régulée et, plus on ingère ou plus on synthétise de la vitamine D, plus on fait de la 25OHD. La demi-vie de la 25OHD est de l'ordre de trois semaines et sa concentration sérique représente le statut vitaminique D d'un individu.

Cette 25OHD est de nouveau hydroxylée sous l'action d'une enzyme, la 1α -hydroxylase, pour faire de la 1,25 dihydroxy vitamine D ($1,25\text{OH}_2\text{D}$) ou calcitriol, le métabolite actif de la vitamine D dont la demi-vie est courte (environ 4 h). Cette seconde hydroxylation se fait classiquement dans les cellules du tubule proximal rénal, mais on sait aujourd'hui qu'elle est possible dans de très nombreux autres tissus. L'hydroxylation par la 1α -hydroxylase rénale est très étroitement régulée par les hormones du métabolisme phospho-calcique. Elle est stimulée en particulier par la PTH et inhibée par le FGF23 et le calcitriol lui-même. Elle permet de produire la $1,25\text{OH}_2\text{D}$ « hormone » qui va passer dans le sang et aller agir sur des tissus cibles où elle se lie au récepteur de la vitamine D (VDR) situé dans le cytosol de ces cellules.

Ce mécanisme hormonal est la base des effets « classiques » phospho-calciques et osseux de la vitamine D. Il s'agit d'effets génomiques où, une fois qu'il a lié le calcitriol, le VDR s'associe à une autre protéine, le récepteur de l'acide rétinoïque (RXR) et se lie ensuite à l'ADN en des sites spécifiques appelés éléments de réponse à la vitamine D (VDRE), stimulant (ou inhibant) ainsi la synthèse de protéines. Les principaux tissus cibles du calcitriol circulant sont la cellule intestinale où il stimule l'absorption du calcium et du phosphate, l'ostéoblaste où il stimule la synthèse du RANKL, une cytokine dont le rôle dans la résorption osseuse est fondamental, le rein où il contrôle l'expression dans le tubule distal de la protéine TRPV5 nécessaire à la réabsorption du calcium, et les parathyroïdes où il contrôle la sécrétion de PTH.

On peut noter qu'il existe par ailleurs une voie d'inactivation de la vitamine D *via* la formation de composés hydroxylés sur le carbone 24 grâce à une 24-hydroxylase. L'expression de la 24-hydroxylase dans le tubule proximal est stimulée par le FGF23 et le calcitriol. Son importance a été récemment mise en exergue avec la démonstration que des mutations inactivatrices du gène codant pour cette enzyme

(CYP24A1) étaient responsables d'une « hypersensibilité à la vitamine D » avec hypercalcémie néonatale sévère.

De très nombreux tissus n'ayant rien à voir avec le métabolisme phospho-calcique et osseux expriment le VDR, la 1-alpha-hydroxylase et la 24-hydroxylase. La 25OHD pénètre dans ces tissus où elle est transformée en calcitriol qui agit localement après liaison au VDR, hétérodimérisation avec le RXR et liaison à des VDRE. Ce calcitriol produit localement ne ressort pas de la cellule et ne participe donc pas au métabolisme phospho-calcique. Cette production « périphérique » de calcitriol ne semble pas régulée par les hormones calciotropes (la PTH, le FGF23...) mais dépend d'une concentration suffisante de 25OHD dans le liquide extra-cellulaire de ces tissus. C'est la base des effets génomiques « non-classiques » de la vitamine D qu'on peut qualifier d'intracrines, par opposition aux effets classiques endocrine. On sait maintenant que le calcitriol circulant peut exercer aussi des effets non génomiques sur certains tissus (activation de tyrosines kinases, modification du flux de calcium intracellulaire...) après liaison à des protéines membranaires mal identifiées, probablement un (ou des) variant(s) du VDR. (4)

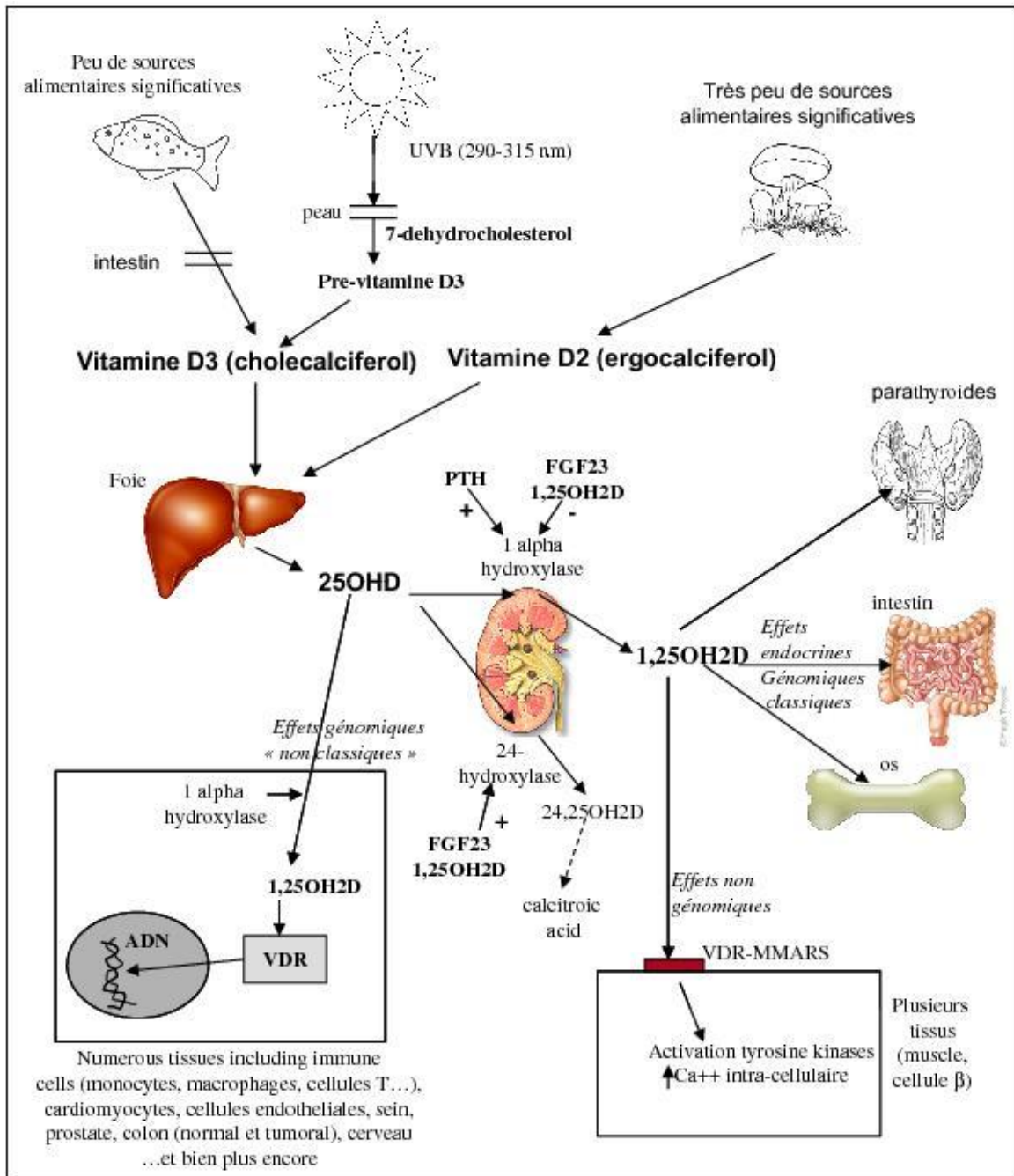


Figure 03 : Résumé du métabolisme de la vitamine D.

La vitamine D₂ et la vitamine D₃ sont transportées dans le sang par la DBP. La vitamine D (D₂ ou D₃) est hydroxylée dans le foie pour former de la 25OH D dont la concentration sérique représente le statut vitaminique d'un individu. Cette hydroxylation hépatique est très peu régulée et, plus on ingère ou plus on synthétise de la vitamine D, plus on produit de la 25OH D. Cette 25OH D est de nouveau hydroxylée pour faire de la 1,25OH₂D, le métabolite actif de la vitamine D. Cette seconde hydroxylation peut se faire soit dans les cellules tubule proximal rénal, soit

dans de très nombreux autres tissus. L'hydroxylation rénale, qui est très étroitement régulée par des hormones du métabolisme phospho-calcique comme la PTH ou le FGF23, permet de produire la 1,25OHD « hormone » (c'est-à-dire qui va passer dans le sang et aller agir sur des tissus cibles où elle se lie au VDR), alors que l'hydroxylation « périphérique » est indépendante de la régulation phospho-calcique et produit de la 1,25OH₂D qui agit localement (de manière « intracrine ») et ne participe pas au métabolisme phospho-calcique. De manière intéressante, la production rénale proximale de 1,25OH₂D est inversement proportionnelle à la concentration de 25OHD circulante du fait d'une hyperparathyroïdie secondaire lorsqu'il existe une « insuffisance » en vitamine D (sauf si il y a trop peu de 25OHD auquel cas la production de 1,25OH₂D diminue), alors que la production « périphérique » est, elle, proportionnelle à la concentration de 25OHD circulante.

4) Catabolisme de la vitamine D :

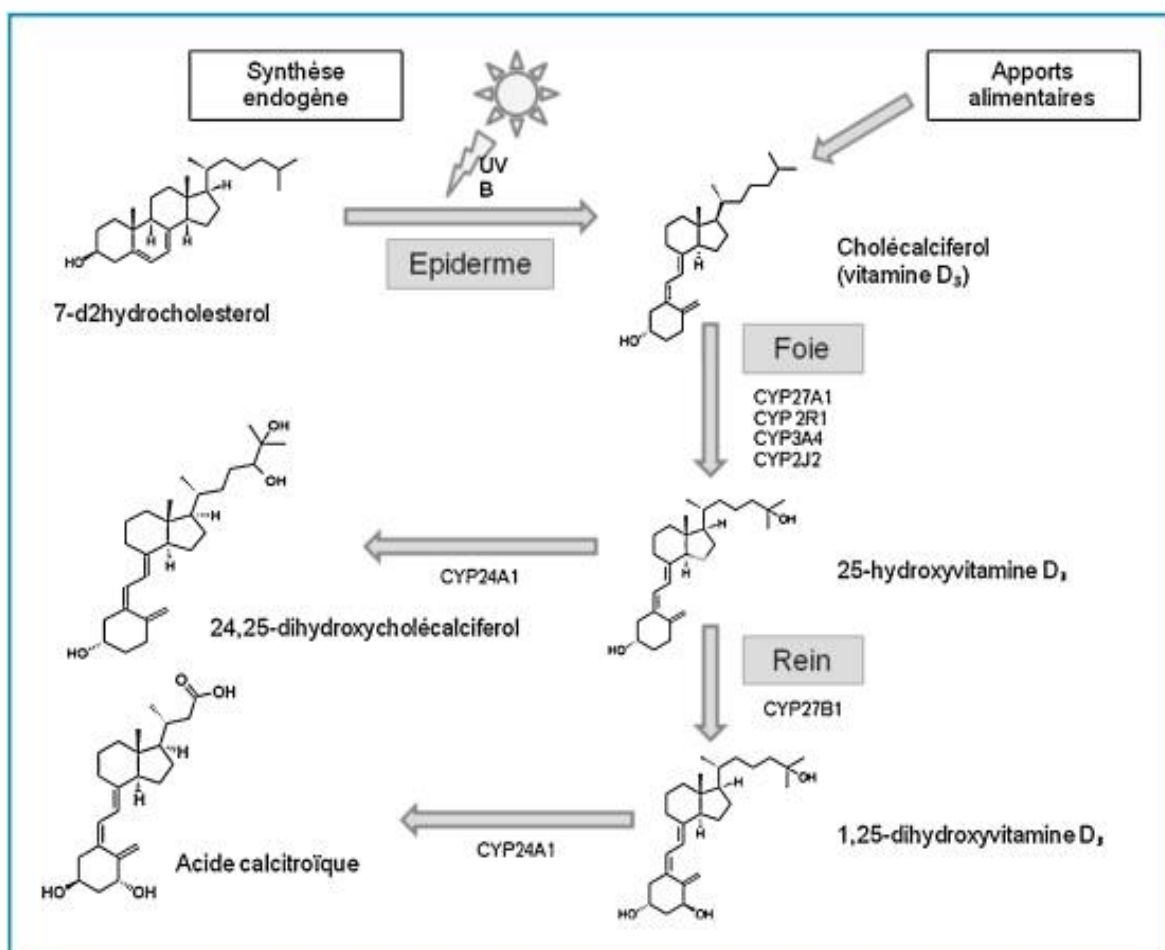


Figure 04 : schéma résumant le métabolisme global de la vitamine D.

Le catabolisme de la vitamine D s'effectue via la CYP24A1, une enzyme Ubiquitaire Localisée dans la majorité des tissus de l'organisme. Celle-ci catalyse l'hydroxylation de La 1,25(OH)₂D et de la 25(OH) D en 1, 24,25-trihydroxyvitamine D. Suite à une cascade de Réactions, on Aboutit à la production de l'acide calcitroïque, forme inactive de la Vitamine D.

La CYP24A1 est ainsi responsable du maintien du taux des métabolites Actifs de la vitamine D dans l'organisme.

5) **Mécanisme d'action de la vitamine D**

La vitamine D, par l'intermédiaire de son métabolite actif, la 1,25 (OH)₂D, régule l'expression de près de 500 gènes. La 1,25(OH)₂D peut être considérée comme une véritable hormone stéroïdienne dérivant d'une prohormone qui est la vitamine D.

En raison de sa nature stéroïdienne, la 1,25(OH)₂D agit au niveau des tissus par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique intranucléaire (le VDR, pour Vitamin D Receptor). La vitamine D n'interagit pas avec ce récepteur. Pour la 25(OH) D, l'interaction reste très faible. Ainsi, pour que la vitamine D et la 25(OH) D deviennent actives, il est indispensable qu'elles soient transformées en 1,25(OH)₂D.

La majorité de la 1,25(OH)₂D est fabriquée dans l'organisme au niveau du rein. Elle est ensuite déversée dans le torrent circulatoire. À l'instar d'une hormone, elle va agir à distance sur les organes cibles, qui sont extrêmement nombreux. En effet, la majorité des tissus expriment le récepteur de la 1,25(OH)₂D. En dehors de l'os, du cartilage et de l'intestin, qui sont les cibles privilégiées de la 1,25(OH)₂D, de nombreux autres tissus sont concernés.

Parmi les actions physiologiques de la 1,25(OH)₂D qui ne sont pas en relation avec le métabolisme calcique, il faut citer celles qui concernent la stimulation de l'insulinosécrétion, la modulation de l'activation des lymphocytes T et B, et les effets sur la contractilité des fibres myocardiques.

C'est ainsi que la vitamine D a été proposée dans la prévention de certains cancers, de certaines maladies cardiaques, et de certaines affections auto-immunes,

parmi lesquelles il convient de citer le diabète de type 1, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn.

La majorité de la 1,25 (OH)₂D qui agit dans les tissus provient de la 1,25 (OH)₂D synthétisée au niveau des reins et qui est ensuite distribuée par voie sanguine. Toutefois, certains tissus sont capables de synthétiser de la 1,25 (OH)₂D in situ, à condition que les taux de 25(OH) D soient élevés. C'est le cas pour le colon, les glandes mammaires, la prostate, le poumon, les macrophages, et les cellules parathyroïdiennes. (5)

6) Effets « classiques et non-classiques » de la vitamine D

6-1) Effets « classiques »

Les différents effets endocrins de la vitamine D sont nécessaires à la minéralisation osseuse. Un déficit profond en vitamine D peut causer des pathologies caractérisées par un défaut de minéralisation osseuse, le rachitisme chez l'enfant et l'ostéomalacie chez l'adulte. Un déficit moins profond n'entraînera pas de défaut de minéralisation évident mais pourra favoriser une ostéoporose, surtout au niveau de l'os cortical. Dans des études observationnelles, le déficit en vitamine D est associé à des densités minérales osseuses basses et à une augmentation du risque relatif de fractures ostéoporotiques. La supplémentation en vitamine D (le plus souvent associée à du calcium), réduit le risque de fractures non vertébrales chez les sujets de plus de 65 ans à condition que les doses de vitamine D soient d'au moins 800 UI par jour.

6-2) Effets « non-classiques »

De très nombreuses études ont rapporté une association entre déficit en vitamine D et de nombreuses maladies ou anomalies.

À la sarcopénie chez le sujet âgé. La vitamine D a une action démontrée sur le muscle et un traitement par vitamine D (800 UI/j au moins) associé à du calcium réduit le risque relatif de chute chez les sujets âgés.

Associé à un risque accru d'évènements cardio-vasculaires mais aussi de mortalité cardio-vasculaire.

Les mécanismes sont complexes et concernent des effets directs de la vitamine D sur les cellules endothéliales vasculaires, mais aussi des effets indirects car la vitamine D contrôle la sécrétion de l'insuline et la sensibilité à l'insuline, diminue l'inflammation, contrôle des protéines impliquées dans la formation de calcifications vasculaires, réduit la sécrétion d'hormone parathyroïdienne, et contrôle le gène de la rénine ce qui lui confère des propriétés anti-hypertensives.

La vitamine D est un immunomodulateur. Globalement, de nombreuses études expérimentales sont en faveur d'une inhibition de l'immunité acquise et d'une stimulation de l'immunité innée par la vitamine D. Cette inhibition de l'immunité acquise par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ semble bénéfique dans un certain nombre de pathologies auto-immunes comme la sclérose en plaques, le diabète de type 1...

La modulation de l'immunité innée suggère des propriétés anti-infectieuses de la vitamine D. On sait que les macrophages ou les monocytes exposés à un agent infectieux surexpriment le « Toll-like receptor 2 », le VDR et la 1-alpha hydroxylase. À condition que la concentration de 25OHD dans le liquide extra-cellulaire de ces cellules soit suffisante, elles vont former de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ qui va induire la production de peptides « antimicrobiens », en particulier la cathélicidine, que l'on peut considérer comme des antibiotiques naturels, et qui vont contribuer à détruire l'agent infectieux. (6)

***Chapitre II : Inhibition de
CYP24A1***

1. Mécanisme de CYP24A1

Le CYP24A1 (**Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1**) est une enzyme mitochondriale du cytochrome P450 de la membrane interne qui décompose la vitamine D. La vitamine D 24-Hydroxylase codée par le gène CYP24A1 (20q13.2), et présente plusieurs fonctionnalités : il est capable d'hydroxyler les carbones de la chaîne latérale C23 ou C24 de 25(OH) D ou 1,25(OH) D.

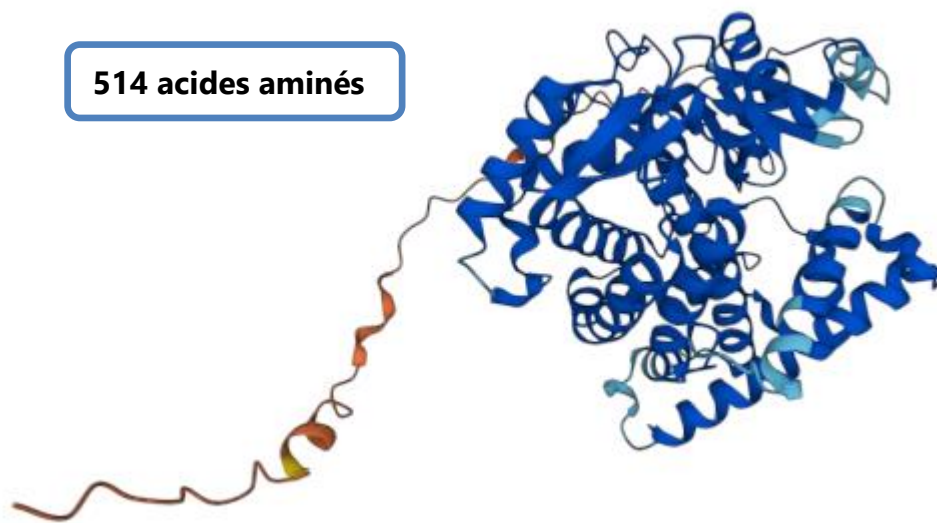


Figure05 : Structure de protéine CYP24A1 (7)

Les principaux substrats des réactions d'hydroxylation catalysées par le CYP24A1 sont le 25(OH) D et le 1,25(OH)₂D. Dans le premier cas, la réaction conduit à la formation de 24,25(OH)₂D, un métabolite qui circule dans le sang. Dans le second cas, le produit enzymatique initial à vie courte est le 1,24,25(OH)₃D. Pour l'hydroxylation dépendante du CYP24A1, les électrons sont dérivés du NADPH et transférés en séquence via la NADPH-adrénodoxine réductase et l'adrénodoxine vers la molécule d'hème dans le centre actif de l'enzyme où l'oxygène moléculaire est lié, puis divisés en un centre oxyferryl réactif qui est dirigé vers la cible. substrat et ensuite réduit en un groupe hydroxyle. L'enzyme est appelée oxydase à fonction mixte car l'autre atome d'oxygène est réduit en H₂O.

La spécificité de cette réaction catalytique est déterminée par l'orientation du substrat dans le site actif de l'enzyme, où l'atome de carbone cible doit être à proximité immédiate du centre héméoxyferryle. Fait intéressant, l'enzyme CYP24A1 est capable d'hydroxyler les carbones de la chaîne latérale C23 ou C24 du 25(OH) D ou du 1,25(OH)₂D.

Le degré relatif d'activité C23- et C24-hydroxylase semble spécifique à l'espèce, et la base structurelle de cette spécificité altérée a été examinée à l'aide de l'alignement de séquences et de la mutagenèse dirigée et sera décrite dans «Relations structure-fonction». L'hydroxylation en C24 conduit au clivage de la chaîne latérale et à l'oxydation en un acide carboxylique (voie d'oxydation en C24), tandis que l'hydroxylation au niveau du carbone 23 entraîne la formation de lactone (voie d'hydroxylation en C23). (8)

CYP24A1 est exprimé dans les reins mais également dans de nombreux tissus (os, cœur, poumons, intestins, pancréas, rate, ...) avec une augmentation de l'expression lors d'un traitement avec 1,25-(OH)₂D

Les mutations de CYP24A1 provoquent des hypercalcémies, qui peuvent entraîner une hypercalciurie, une néphrolithiase et une néphrocalcinose chez les enfants et les adultes.

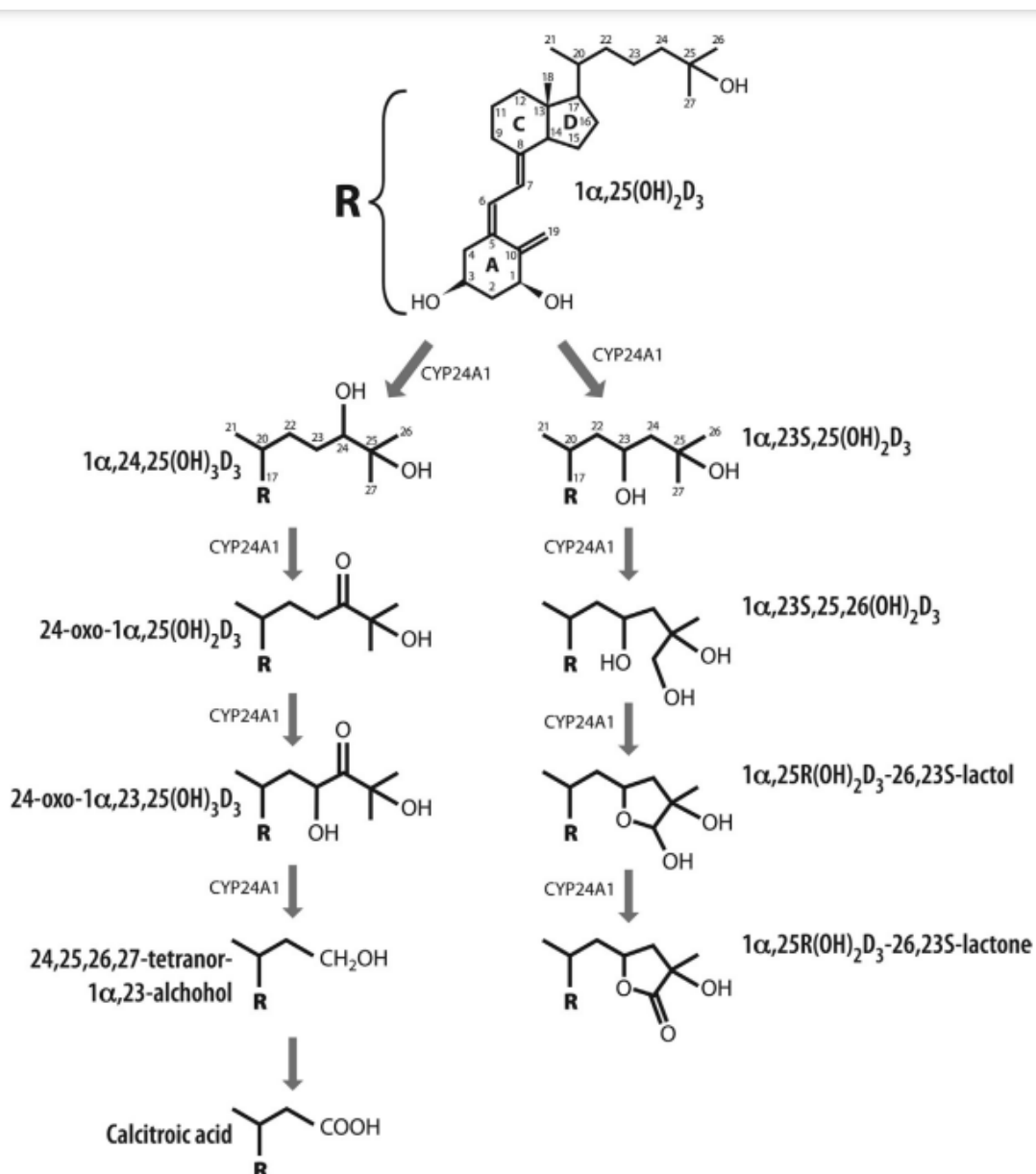


Figure06: Voies enzymatiques catalysées par le CYP24A1. Les produits de la voie d'oxydation C24 sont présentés à gauche ; les produits d'hydroxylation en C23 sont représentés à droite. Seuls les produits du $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sont représentés. (9)

2. CYP24A1 et la voie de la vitamine D

Le rôle crucial de la vitamine D dans l'homéostasie du calcium et du phosphate signifie que des niveaux excessifs de sa forme active peuvent précipiter une hypercalcémie symptomatique. L'activation de la vitamine D se déroule en deux étapes. La première étape se déroule dans le foie : la vitamine D₃ est convertie en 25-hydroxyvitamine D₃, une réaction catalysée par la 25-hydroxylase (CYP2R1). La deuxième étape se produit dans le rein, lorsque la 25-hydroxyvitamine D₃ est hydroxylée en 1,25-dihydroxyvitamine D₃, la forme active. Cette étape est catalysée par la 1 α -hydroxylase, une enzyme codée par le CYP27B1.

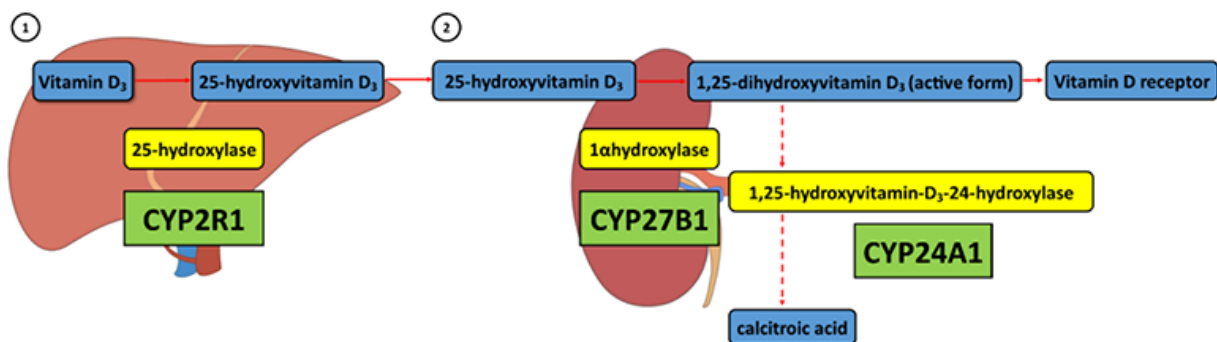


Figure 07 : Voie du métabolisme de la vitamine D. Activation de la vitamine D : 1. L'étape 1 se produit dans le foie. La vitamine D₃ est convertie en 25-hydroxyvitamine D₃ par l'enzyme 25-hydroxylase. Le CYP2R1Le gène code pour la 25-hydroxylase. 2. Le stade 2 se produit dans le rein. La 25-hydroxyvitamine D₃ est convertie en 1,25-dihydroxyvitamine D₃ par l'enzyme 1 α -hydroxylase. Le CYP27B1Le gène code pour la 1 α -hydroxylase. La 1,25-dihydroxyvitamine D₃ est la forme physiologiquement la plus active de la vitamine D₃ qui se lie au récepteur de la vitamine D. Inactivation de la vitamine D : Plusieurs étapes d'hydroxylation se produisent dans le catabolisme de la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ en acide calcitroïque. La première de ces étapes est catalysée par l'enzyme 1,25-hydroxyvitamine-D₃-24-hydroxylase, qui est codée par le CYP24A1gène.

L'inactivation des métabolites de la vitamine D repose sur deux voies qui comprennent toutes deux des étapes catalysées par la 1,25-hydroxyvitamine-D₃-24-hydroxylase ;CYP24A1code pour cette enzyme mitochondriale qui fait partie du système du cytochrome P450. L'enzyme est présente dans les cellules cibles de la vitamine D, principalement situées dans l'intestin et les reins (Figure 6). (10)

3. Inhibiteurs du CYP24A1

On a longtemps supposé que l'inhibition du CYP24A1 l'activité pourrait être bénéfique pour améliorer l'action $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. La justification d'un tel traitement inhibiteur était évidente lorsqu'on pense à améliorer l'efficacité de l'hormone de la vitamine D et des analogues D dans le traitement du cancer et dans le traitement des maladies hyperprolifératives telles que le psoriasis. De nouvelles découvertes suggèrent que les inhibiteurs du CYP24A1 pourraient également aider à la gestion clinique de l'IRC.

Les premiers inhibiteurs identifiés étaient des dérivés d'imidazole antifongiques, tels que le kétoconazole et le liarazole. Ils manquent de spécificité car ils inhibent la stéroïdogénèse en interférant largement avec les systèmes enzymatiques du cytochrome P450, bien que cette caractéristique puisse s'avérer bénéfique dans le traitement du cancer de la prostate.

Il a été démontré que le principal phytoestrogène du soja, la génistéine, inhibe le CYP24A1 dans les cellules en culture ainsi que dans le côlon de souris in vivo. Il semble agir par plusieurs mécanismes car il a été démontré qu'il inhibe à la fois l'expression du CYP24A1 (au niveau transcriptionnel) et l'activité de la protéine CYP24A1. Les phytoestrogènes ont un effet bénéfique sur les cancers, et la découverte de leur action sur les voies métaboliques de la vitamine D suggère qu'une partie de leurs effets antitumorigènes pourrait être médiée par la vitamine D. Cela soulève également la possibilité que l'inhibition du CYP24A1 puisse être obtenue en partie par des moyens nutritionnels.

Dans le cadre des efforts visant à synthétiser chimiquement des analogues de la vitamine D à faible activité calcémique, de puissants inhibiteurs du CYP24A1 basés sur la structure des secostéroïdes $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ont été identifiés. Ceux-ci incluent les dérivés sulfone et sulfoximine de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. L'analogue 16,23-diène-25 sulfone (composé CTA018/MT2832) est particulièrement intéressant d'un point de vue thérapeutique car il présente un double mécanisme d'action. Il agit comme un inhibiteur puissant et faiblement calcémique du CYP24A1 et, en outre, il s'est avéré être un puissant activateur de la transcription médiée par le VDR. Il a été démontré que le composé présentait des profils pharmacocinétiques et pharmacodynamiques adéquats et supprimait efficacement une PTH élevée sans affecter la calcémie ou la

phosphatémie dans un modèle préclinique de CKD chez le rongeur. Cette nouvelle classe d'analogues avec un double mécanisme d'action peut être en mesure d'obtenir la réponse thérapeutique souhaitée de prévention de la SHPT dans l'IRC au dernier stade sans conduire à une résistance acquise à la thérapie par analogue de la vitamine D causée par l'induction du CYP24A1. Il est possible qu'un raffinement supplémentaire des stratégies pharmacologiques inhibitrices du CYP24A1 puisse être réalisé grâce au développement de médicaments biorationnels basés sur la structure cristalline résolue de l'enzyme. En effet, l'inhibiteur du CYP24A1 récemment décrit CTA102 présente une puissance élevée (IC₅₀ 8,5 nM) et une sélectivité entre le CYP24A1 et le CYP27B1. Des modèles précliniques d'états hypophosphatémiques avec perte de phosphate rénal ont démontré le potentiel de l'inhibition pharmacologique du CYP24A1 comme complément thérapeutique à leur traitement.[\(11\)](#)

Matériels et méthodes

1. Préparation de la protéine :

La structure cristallographique de la CYP24A1 a été obtenue du site research collaboratory of structure bioinformatics RCBS (12) ; la base des données de la banque des protéines (protein data bank PDB) et a été téléchargée sous forme PDB avec le code ID : 3K9V.

La protéine a ensuite été préparée en gardant une seule chaîne polypeptidique et en supprimant les ligands co-cristallisés ainsi que les molécules d'eau.

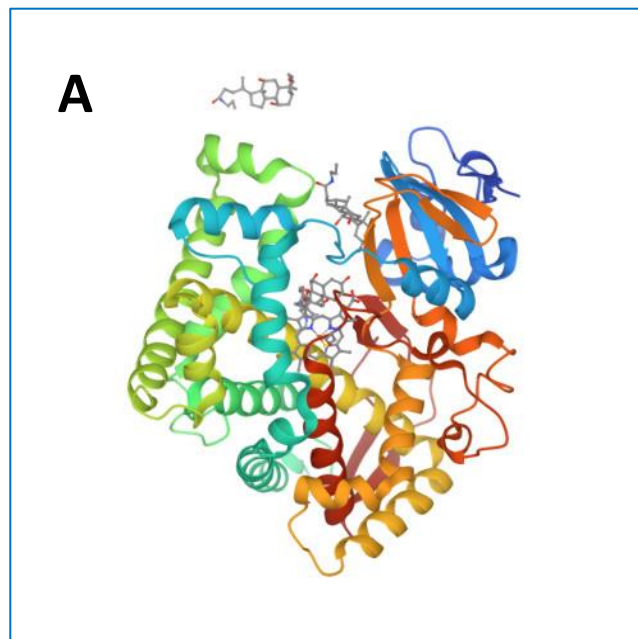


Figure 08 : la protéine CYP24A1 téléchargée à partir de la PDB(A).

2. Téléchargement de ligands « inhibiteurs » :

Les structures tridimensionnelles des analogues de CTA091 ont été téléchargées à partir de la base de données PubChem (13) sous le format de fichier SDF.

Une banque de molécules a été constituée, contenant des molécules dont la structure de base est celle de l'inhibiteur CTA091.

3. L'amarrage moléculaire :

Avant les simulations d'amarrage, la structure de la protéine doit être préparée par l'outil Dock prep du programme « **ChimeraUCSF** » (**Pettersen, E.F., et al ;2004**), Ensuite, les Huit molécules ont été ajoutées pour la préparation de l'amarrage moléculaire, à savoir la détermination du degré d'affinités de liaison des différents ligands avec la protéine principale.

Pour l'étude des interactions entre la protéine 3K9V et ses inhibiteurs à l'aide de docking moléculaire, le logiciel « **Chimera UCSF** » va enregistrer la meilleure interaction avec le ligand tandis que les meilleurs conformères ont été représentés avec la plus faible énergie de liaison (kcal /mol) sur le site actif.

4. Identification des interactions :

Les résultats de l'amarrage moléculaire présentant une conformation énergétique minimale ont servi à étudier les interactions ligand-protéine.

Les huit ligands sont chargés directement l'un après l'autre dans le logiciel « Discovery Studio visualizeur » (**version 21.1**); c'est un logiciel qui permet de modifier des structures moléculaires, et d'étudier les acides aminés impliqués dans le site de liaison ; et qui a été développé et distribué par « Dassault Systemes BIOVIA ».

Les liaisons hydrogène et les liaisons hydrophobes sont visualisé en 2D.

5. Détermination des paramètres pharmacocinétique :

Les ligands sélectionnés ont été soumis à une analyse online sur le site « SwissADME » ;c'est un site web qui permet le calcul de descripteurs physico-chimiques ainsi que la prédiction des paramètres ADME, les propriétés pharmacocinétiques, la nature médicamenteuse et la facilité d'utilisation en chimie médicinale d'une ou plusieurs petites molécules afin de faciliter la découverte de médicaments. (14)

Résultats et discussion

Résultats et discussion

On a tout d'abord examiné l'inhibition de la protéine 3K9V par les analogues de CAT091 à l'aide du Docking moléculaire qui est une des méthodes de modélisation moléculaire les plus répandues actuellement.

Des détails sur huit analogues de CTA091 sont listés dans le **Tableau 03**. Le Docking de ces ligands permet de dégager plusieurs configurations retenues comme définissant des formes de liaisons avantageuses et favorables énergétiquement parlant.

Les ligands sont maintenus dans le site actif par une énergie de liaison. Plus celle-ci est réduite, plus l'efficacité de la liaison est élevée, résultant en une inhibition accrue. Dans la présente étude, la meilleure affinité obtenue (énergie de liaison) avec la protéine 3K9V était de -7.9 kcal/mol présente chez les trois composés portant les codes **9890238** et **9957646** et **9982688**.

Résultats et discussion

Tableau-03 : Coordonnées et énergies de liaison des huit analogues de CTA091.

composés	Pubchem ID	Formules moléculaire	Masse moléculaire (g/mol)	ΔG (Kcal/mol)
(1R,3S,5Z)-5-[(2E)-2-[(1R,7aR)-1-[(E,2R,5S)-5-cyclopropyl-5-hydroxypent-3-en-2-yl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene]-4-methylidenecyclohexane-1,3-diol	6436131	C ₂₇ H ₄₀ O ₃	412.6	-7.4
(25S)-26,26,26-trifluoro-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3/(25S)-26,26,26-trifluoro-1alpha,25-dihydroxycholecalciferol	9547378	C ₂₇ H ₄₁ F ₃ O ₃	470.6	-7.6
(24S,25S)-25,26-epoxy-1alpha,24-dihydroxyvitamin D3/(24S,25S)-25,26-epoxy-1alpha,24-dihydroxycholecalciferol	9547402	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	430.6	-7.2
(24aE)-1alpha,25-dihydroxy-24a,24b-didehydro-24a,24b-dihomovitamin D3/(24aE)-1alpha,25-dihydroxy-24a,24b-didehydro-24a,24b-dihomocholecalciferol	9547691	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	442.7	-7.4
(1R,3S,5Z)-5-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-1-[(2R,6R)-6-hydroxy-6-(1,3-oxazol-4-yl)hexan-2-yl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene]-4-methylidenecyclohexane-1,3-diol	9890238	C ₂₈ H ₄₁ NO ₄	455.6	-7.9
propyl (E,3R,6R)-6-[(1R,3aS,4E,7aR)-4-[(2Z)-2-[(3S,5R)-3,5-dihydroxy-2-methylidenecyclohexylidene]ethylidene]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-1-yl]-3-hydroxy-2,2-dimethylhept-4-enoate	9957646	C ₃₁ H ₄₈ O ₅	500.7	-7.9
(1R,3S,5Z)-5-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-7a-methyl-1-[(E,2R)-4-(phenylsulfonimidoyl)but-3-en-2-yl]-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene]-4-methylidenecyclohexane-1,3-diol	9982688	C ₂₉ H ₃₉ NO ₃ S	481.7	-7.9
(1R,3S,5Z)-5-[(2E)-2-[(1R,3aS,7aR)-1-[(2R)-4-[(4-fluorophenyl)sulfonimidoyl]butan-2-yl]-7a-methyl-2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-ylidene]ethylidene]-4-	10006229	C ₂₉ H ₄₀ FNO ₃ S	501.7	-7.6

Résultats et discussion

methylenecyclohexane-1,3-diol				
-------------------------------	--	--	--	--

Le logiciel Discovery Studio visualizer a été utilisé pour identifier les résidus d'acides aminés impliqués dans les interactions entre le site actif de la protéine cible 3K9V et les différents analogues de CTA091 (**Tableau 04**). Ces interactions protéine-ligand se caractérisent en particulier à travers les liaisons hydrogène et les interactions hydrophobes, lesquelles jouent un rôle majeure dans la prévision et l'évaluation de la force de liaison entre ligand et protéines, sachant que plus le nombre de liaisons hydrogène est élevé, plus l'efficacité de la liaison et de l'inhibition est élevée.

Tableau-04 : Interactions des 8 ligands les mieux ancrés contre le site actif de la protéine 3K9V.

PubChem ID	Liaison	Intéraction
	ARG 128	2 Conventional Hydrogen Bond – pi-cation Carbon Hydrogen Bond
	ILE 131	Alky
	LEU 147	Alkyl
	MET 148	Alky
	ARG 159	Conventional Hydrogen Bond
	VAL 391	2 Alkyl
	ARG 460	Conventional Hydrogen Bond – Alkyl
	CYS 462	Alkyl
9957646	ARG 128	Unfavorable danor-danor-Carbon Hydrogen Bond

Résultats et discussion

	ILE 131	Alkyl
	MET 148	Alkyl
	ARG 159	Conventional Hydrogen Bond
	LEU 323	Alkyl
	ALA 326	Alkyl
	VAL 391	3 Alkyl
	ILE 463	Conventional Hydrogen Bond
9982688	ARG 128	Alky
	LEU 129	Alkyl
	ILE 131	Alkyl
	VAL 391	3 Alkyl
	PRO 392	2 Alky
	PHE. 393	Alky - pi-sulfur
	THR. 395	Conventional Hydrogen Bond
	ILE. 463	Unfavorable danor-danor
	HIS. 497	Alky
10006229	ARG 128	Carbon Hydrogen Bond
	MET 148	Pi-sulfur
	ALA 326	2 Alky
	VAL 391	2 Alky
	MET 461	Conventional Hydrogen Bond
	CYS 462	Alkyl
	GLY 499	Conventional Hydrogen Bond
	ILE 500	Alkyl
9547378	ARG 128	2 Conventional Hydrogen Bond

Résultats et discussion

	LEU 129	Conventional Hydrogen Bond -Halogen(fluorine)
	VAL 391	2 Alky
	PHE 393	Alky
	THR 395	Carbon Hydrogen Bon
	CYS 462	Alkyl
	HIS. 497	Alky
6436131	ARG 128	Conventional Hydrogen Bond
	ILE 131	Alky
	LEU 147	Alky
	MET 148	Alky
9547691	VAL 391	2 Alky
	PHE 393	2 Alky
9547402	ARG 128	Conventional Hydrogen Bond- Alky
	ILE 131	Alky
	ALA 326	Alky
	VAL 391	3 Alky
	ARG 460	Carbon Hydrogen Bon

Les interactions protéine-ligand en 2D des 3 meilleurs ligands portant les codes **9890238** ,**9957646** ,**9982688s** sont représentées dans **les figures 9, 10 et 11 respectivement.**

Résultats et discussion

Le composé **9890238** a présenté un score de liaison de -7.9 kcal/mol avec la création de deux liaisons hydrogène conventionnelle set d'une liaison hydrogène carbone et d'une liaison Pi- cation avec l'acide aminé ARG 128, deux liaisons hydrogènes conventionnelles avec les acides aminés (ARG 159 ,ARG 460), deux liaison Alkyl avec l'acide aminé VAL 391, 5 liaisons Alkyl avec les acides aminés (ILE 131,LEU 147,MET 148 ,ARG 460 ,CYS 462).

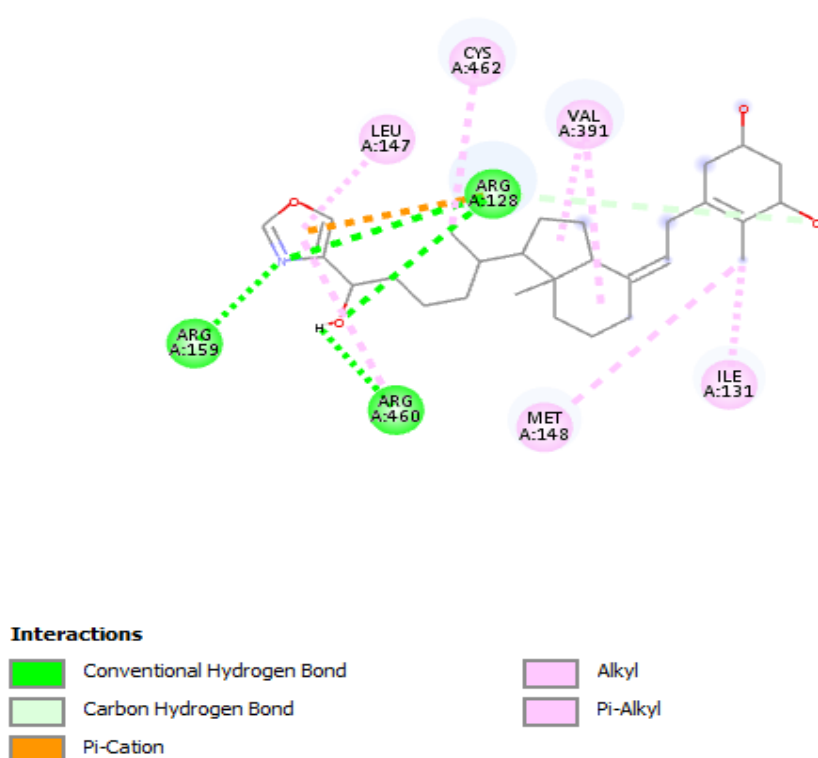
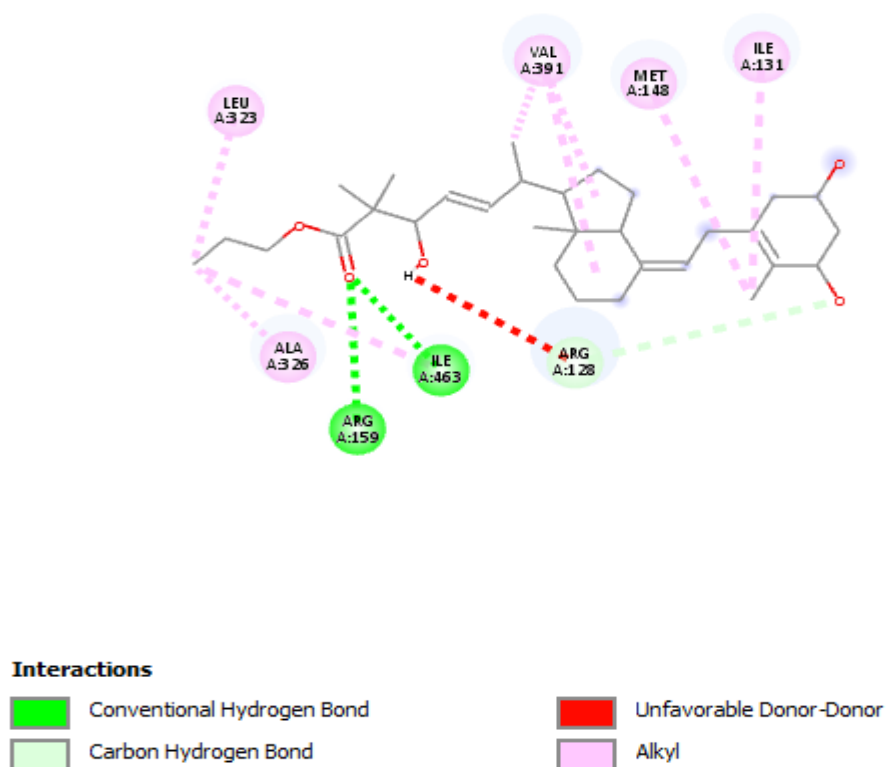


Figure-09 : Interaction 2D de composé portant le code 9890238 avec la protéine 3K9V
(-7.9 kcal/mol)

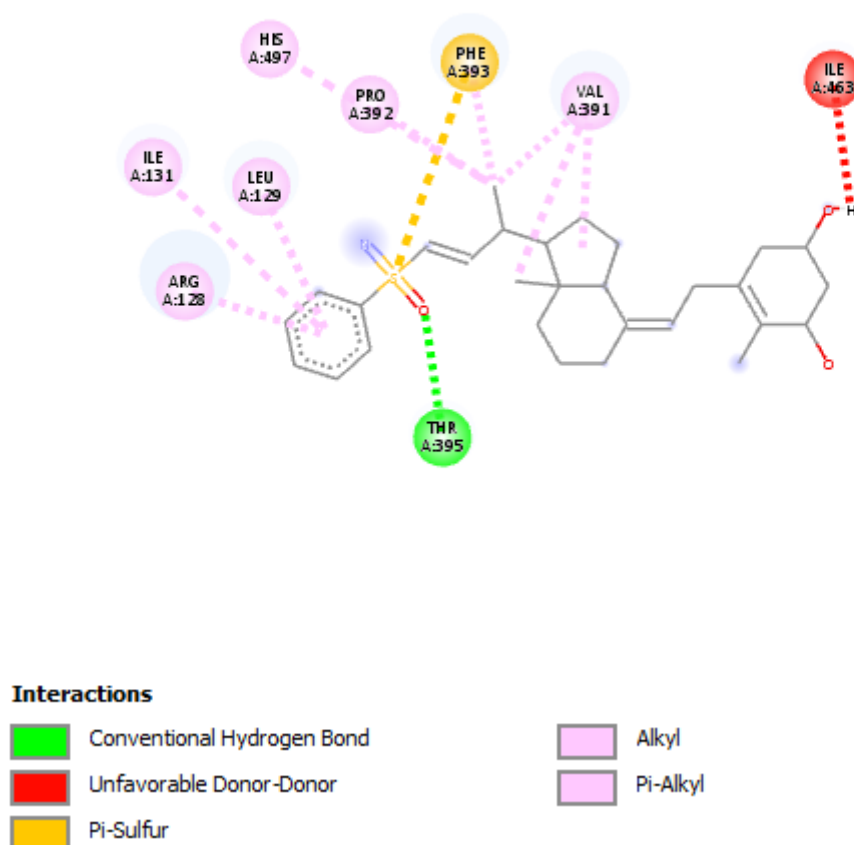
Le composé **9957646** a présenté un score de liaison de -7.9 kcal/mol avec la création d'une liaison Hydrogène carbone et d'une liaison défavorable danor-danor avec l'acide aminé ARG 128, deux liaisons hydrogènes convontionele avec les acides aminés (ARG 159 ,ILE 463), troisliaisons Alkyl avec l'acide aminé VAL 391,



4 liaisons Alkyl avec les acides aminés (ILE 131 MET 148 ,LEU 323 ,ALA 326) (Figure-09) (Tableau-04).

Figure-10 : Interaction 2D de composé portant le code **9957646** avec la protéine 3K9V (-7.9 kcal/mol)

Le composé **9982688** a présenté un score de liaison de -7.9 kcal/mol avec la création d'une liaison Hydrogène conventionelle avec l'acide aminé THR 395, unliaison Liaison défavorable danor-danor avec l'acide aminés ILE 463, un liaisons Alkyl et un liaison pi- sulfur avec l'acide aminé PHE 392, trois liaisons Alkyl avec l'acide aminés VAL 391 ,deux liaison Alkyl avec l'acide aminé PRO 392 ,4 liaisons



Alkyl avec les acides aminé (ARG 128 ,LEU 129 ,ILE 131 ,HIS 497) **(Figure-10)**
(Tableau-04)

Figure-11 : Interaction 2D de composé portant le code **9982688** avec la protéine 3K9V
(-7.9 kcal/mol)

La présence d'interactions hydrophobes et de liaisons hydrogène a été observée entre l'enzyme CYP24A1 et nos ligands. De plus, un grand nombre d'acides aminés sont impliqués dans ces interactions y compris les résidus clé ARG 128 , ILE 131 et

Résultats et discussion

VAL 391 de la protéine cible en accord avec les études précédentes (**Salvatore Ferla et al ;2014, Ismail M. Taban et al ;2017**). En fait, les interactions hydrophobes ont mis en évidence avec succès des groupes fonctionnels spécifiques qui pourraient être à l'origine de l'effet hydrophobe de ces composés, qui ont une forte affinité de liaison aux protéines cibles.

Pour valider ces composés comme médicaments potentiels, il est intéressant d'évaluer leurs paramètres pharmacocinétiques. Un bon candidat médicament doit être rapidement et complètement absorbé par voie gastro-intestinale, distribué spécifiquement vers son site d'action dans le corps, métabolisé d'une manière à ne pas altérer les fonctions de l'organisme, et éliminé de manière appropriée sans causer des dommages.

Dans ce contexte, les propriétés pharmacocinétiques (ADME) des 3 principaux ligands (**Figure-12, 13, 14**) ont été évaluées à l'aide de du site Web SwissADME (**figure-11**) en vue de déterminer le potentiel pharmacologique de chacun de ces composés sur la base de la règle de Lipinski (**Tableau 05**)

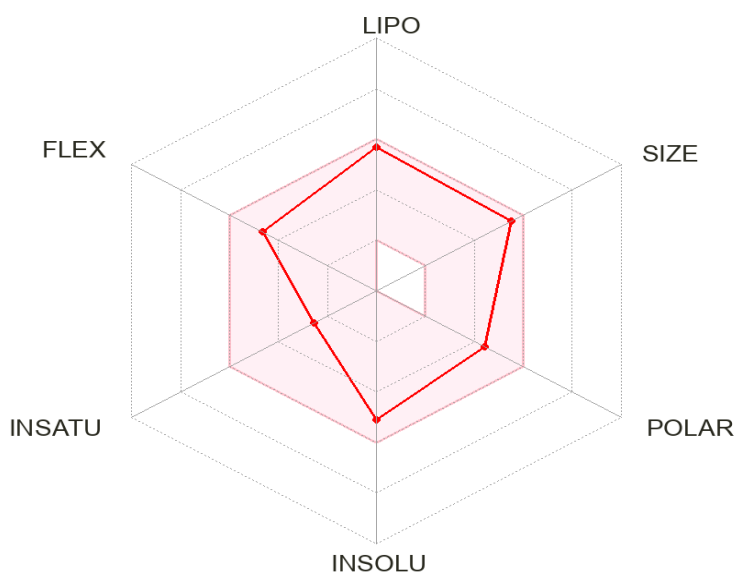


Figure 12 : les propriétés ADME de ligand 9890238

Résultats et discussion

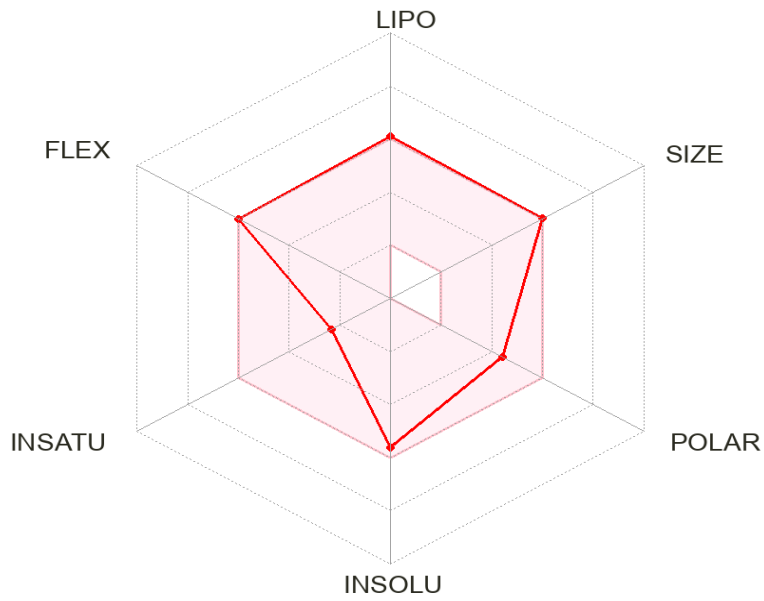


Figure 13 : les propriétés ADME de ligand 9957646

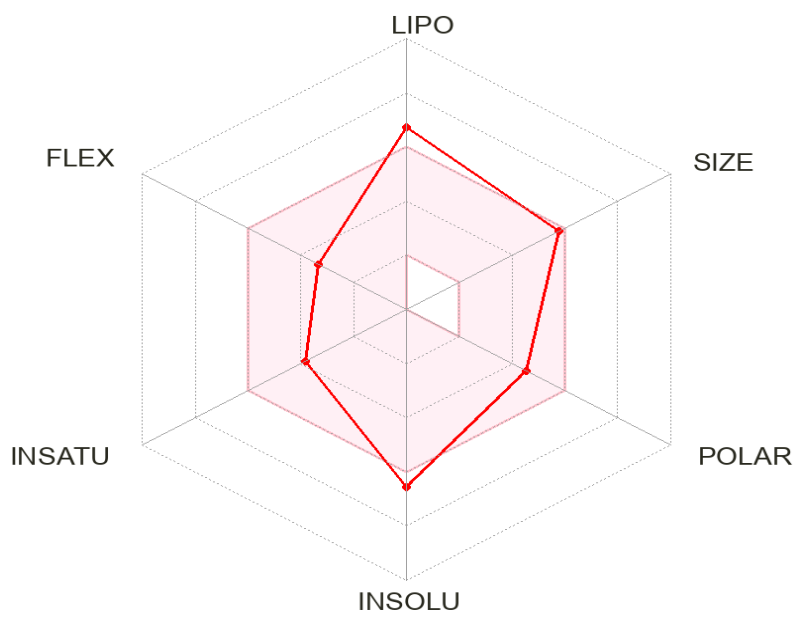


Figure 14: les propriétés ADME de ligand 9982688

Résultats et discussion

Tableau-05 : Propriétés pharmacocinétiques des 3 principaux ligands.

Composes	SIZE (g/mol)	XLOGP3 - 0.7<XLOGP3< +5.0	POLAR (Polarity)	INSOLU (Insolubility)	INSTATU (Insaturation)	FLEX (Flexibility)	Lipinski
9890238	455.6	4.43	86.72 Å ²	-5.11	0.68	7	Yes; 0 violation
9957646	500.7	5.19	86.99 Å ²	-5.62	0.71	9	Yes; 1 violation: MW>500
9982688	481.7	6.25	89.76 Å ²	-6.56	0.52	5	Yes; 1 violations: MLOGP>4.15

L'objectif de la règle de Lipinski est d'estimer la biodisponibilité par voie orale d'un composé par le biais de sa structure bidimensionnelle. Le composé qui ne répond pas à au moins trois des cinq critères est susceptible de poser des problèmes d'administration orale (**Lipinski et al, 1997**).

Le tableau 05 montre que parmi les trois composés, les trois ligands qui répondent aux règles de Lipinski, **9890238**, **9957646**, **9982688**.

Dans notre travail, nous avons constaté que les inhibiteurs **9890238**, **9957646**, **9982688** présente l'absorption gastro-intestinale la plus élevée, Ce qui indique que ces composés peuvent être pris par voie orale sans causer de problèmes.

Résultats et discussion

Conclusion :

La présente étude consistait à proposer et développer *in silico* des inhibiteurs potentiels qui agissent sur la protéine cible CYP24A1 ce qui permet de maintenir un bon niveau de vitamine D dans le corps humain. Pour la réalisation de cette étude nous avons utilisé l'approche *in silico* via le docking moléculaire.

Les résultats de docking basés sur l'énergie de liaison entre la protéine CYP24A1 et 8 analogues du composé CTA091; montrent que les composés **9890238**, **9957646** et **9982688**, sont les trois meilleurs inhibiteurs de la protéine CYP24A1. Ces inhibiteurs présentent la meilleure énergie de liaison (-7.9 kcal/mol), En formant des interactions de type hydrophobes avec les résidus clé ARG 128, ILE 131 et VAL 391 de la protéine cible, ainsi que des propriétés pharmaceutiques intéressantes ce qui indique que ces composés sont de bons candidats médicament pour maintenir le niveau de vitamine D nécessaire aux fonctions de l'organisme.

Les références

- 1) Monnier, L., & Colette, C. (2016). *La vitamine D dans les affections métaboliques et cardiovasculaires. Effet réel ou effet de mode ? Médecine Des Maladies Métaboliques.* [https://doi.org/10.1016/s1957-2557\(16\)30052-9](https://doi.org/10.1016/s1957-2557(16)30052-9)
- 2) Guillard, J. (2015). *La vitamine D (Coll. Professions santé).* (n.d.). Google Books. [ISBN 978-2-257-20614-5](https://doi.org/10.1016/s1957-2557(16)30052-9)
- 3) Guillard, J. (2015). *La vitamine D (Coll. Professions santé).* (n.d.). Google Books. [ISBN 978-2-257-20614-5](https://doi.org/10.1016/s1957-2557(16)30052-9)
- 4) Souberbielle, J. (2013). *Actualités sur la vitamine D. Oilseeds and Fats, Crops and Lipids,* 21(3), D304. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013059>
- 5) Monnier, L., & Colette, C. (2016b). *La vitamine D dans les affections métaboliques et cardiovasculaires. Effet réel ou effet de mode ? Médecine Des Maladies Métaboliques.* [https://doi.org/10.1016/s1957-2557\(16\)30052-9](https://doi.org/10.1016/s1957-2557(16)30052-9)
- 6) Souberbielle, J. (2013b). *Actualités sur la vitamine D. Oilseeds and Fats, Crops and Lipids,* 21(3), D304. <https://doi.org/10.1051/ocl/2013059>
- 7) <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP24A1>
- 8) St-Arnaud, R., & Jones, G. (2018). CYP24A1. In *Elsevier eBooks* (pp. 81–95). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809965-0.00006-9>
- 9) St-Arnaud, R., & Jones, G. (2018). CYP24A1. In *Elsevier eBooks* (pp. 81–95). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809965-0.00006-9>
- 10) Hill, F., & Sayer, J. A. (2017). *Clinical and Biochemical Features of Patients with CYP24A1 Mutations.* In *InTech eBooks.* <https://doi.org/10.5772/64503>
- 11) St-Arnaud, R., & Jones, G. (2018). CYP24A1. In *Elsevier eBooks* (pp. 81–95). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809965-0.00006-9>
- 12) Bank, R. P. D. (n.d.-b). *RCSB PDB: Homepage.* <https://www.rcsb.org/>
- 13) PubChem. (n.d.-c). *UNC926,1184136-10-4, UNC926,UNC-926,UNC 926.* PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/341102732>
- 14) SwissADME. (n.d.-b). <http://www.swissadme.ch/>