

Optimisation des propriétés pharmacologiques des substances naturelles par la méthode numérique Volsurf

Samah DJEDDI ^{a b *}, Anastasia KARIOTI ^a, Caterina KOUKOULITSA ^a, Costas DIMAS ^c, Helen SKALITSA ^a

^a Département de Pharmacognosie et Chimie des Produits Naturels, Faculté de Pharmacie, Université d'Athènes, Grèce.

^b Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'Annaba, Algérie.

^c Foundation pour les Recherches Biomédicales, Académie d'Athènes, Grèce

ARTICLE INFO

Article history :

Received September 2014

Accepted January 2015

Keywords :

Extraction ;

Identification ;

Substances secondaires ;

Activités biologiques ;

Propriété pharmacologique ;

Volsurf.

ABSTRACT

L'expérience a montré que le maintien de la richesse de la biodiversité végétale ainsi que la connaissance des thérapeutiques traditionnelles, sont susceptibles de mener à bien la recherche de nouvelles molécules aux activités biologiques.

Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à étudier de manière approfondie l'extraction et l'identification des substances secondaires actives isolées de *Centaurea pullata* L. (Asteraceae) utilisée en médecine traditionnelle algérienne récoltée à Blida.

Après l'identification des différentes substances secondaires (huiles essentielles, flavonoïdes, sesquiterpènes lactones), les substances nouvelles isolées et identifiées ont été investiguées pour leurs pouvoirs antimicrobiens (antibactérien et antifongique) et anticancéreux.

Sachant que les propriétés clés pour la découverte des médicaments sont l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME), nous avons alors réalisé la prédiction des propriétés pharmacologiques de quelques substances nouvelles via la méthode computationnelle Volsurf.

©2015 LESI. All right reserved.

1. Introduction

Les composés naturels d'origine végétale ou animale constituent traditionnellement une source majeure dans la découverte de médicaments [1,2], alors que selon [3] et [4] plus de 50% de ces substances promises pour l'industrie pharmaceutique sont rejetées à cause de leur profil pharmacocinétique insuffisant et leur grande toxicité.

Sachant que les propriétés clés pour la découverte des médicaments sont l'absorption,

*Email : samah.djeddi@univ-annaba.org

la distribution, le métabolisme et l'excrétion (ADME), ces dernières doivent être préciser et optimiser. Il est nécessaire de filtrer ces paramètres par un criblage virtuel, pour pouvoir les optimiser [5].

Récemment, dans le domaine de la computation, les efforts établis ont été réalisés dans le but d'obtenir des modèles, qui décrivent et prévoient le comportement pharmacocinétique d'un composé [6,7].

Dans la littérature la méthode computationnelle la plus utilisée est la méthode Volsurf [8-13]

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

En continuation dans nos travaux d'investigations des plantes médicinales et comestibles [14], nous avons choisi d'étudier *Centaurea pullata* récoltée dans la région de Blida. La partie aérienne de la plante a été extraite avec cyclohexane, DCM, MeOH et MeOH-H₂O 5 :1 successivement. La chromatographie sur colonne des différents extraits étudiés (cen 1-17) a permis d'isoler plusieurs composés : lactones sesquiterpéniques (1-10) et flavonoïdes. Les composés isolés ont été identifiés à l'aide des méthodes spectroscopiques (UV, 1D, 2D-RMN).

2.2. La méthode VOLSURF

Volsurf est une méthode computationnelle, qui a été désignée spécifiquement pour produire des descripteurs relatifs aux propriétés pharmacocinétiques des substances étudiées [9].

Nous avons commencé par un créer fichier de la carte de la molécule (en 3D), dans la procédure standard GRID (interactions de champs) [15]. Ces descripteurs ont été calculés autour de la molécule.

La molécule est mise ensuite théoriquement à l'intérieur d'une sonde (sous forme de cube). On calcule l'énergie totale entre les atomes de la molécule et du probe choisi [eau (OH₂)/ hydrophobique (DRY) / H-liaison carbonyle] à un point précis par ses coordonnées x,y, z.

Les modèles ADME inclus dans le logiciel Volsurf prédisent :

- les absorptions des cellules Caco-2 (ligné de cellules épithéliales obtenues d'un cancer colorectal) [9].
- liaison protéinique [10].
- la perméabilité barrière-sang-cerveau (Barrière Hémato-Encéphale ou BHE) [8].
- la solubilité de la substance dans l'eau [16].
- la solubilité de la substance dans le DMSO.
- la stabilité métabolique [8].
- hERG (human Ether-a-go-go Related Gene) inhibition.
- volume de distribution des hERG [12].

2.2.1. Base de données

La base de données a été constituée de 10 sesquiterpène lactones isolées de *C. pullata*, celles isolées de *C. griesebachii* ssp. *griesebachii* n'ont pas fait l'objet d'étude car elles ont déjà fait partie d'une étude antérieure [12].

2.2.2. Génération de la structure en 3D

Les structures ont été générées en utilisant un logiciel de modelage moléculaire SYBYL (Sybyl Molecular Modeling System, version 6.8), qui fonctionne dans un poste de travail Linux sur un système d'opération Fedora. Leurs énergies ont été optimisées en utilisant la méthode Powell avec critère de convergence fourni par les forces du fichier Tripos [17].

2.2.3. Méthode computationnelle

La perméabilité des cellules Caco-2, l'affinité plasma-protéines, la perméabilité BHE, ainsi que la solubilité thermodynamique des composés étudiés ont été prédit en utilisant Volsurf version 4 (www.moldiscovery.com). Nous avons utilisé les sondes (sous formes de cubes) suivantes : eau (H₂O), hydrophobique (DRY) et H-liaison carbonyle (O) à fin de générer l'énergie de l'interaction en 3D dans un espace grille de 0.5 Å. Le système graphique moléculaire Gview (www.moldiscovery.com) a été utilisé pour visualiser la projection de la molécule étudiée dans les différents modèles.

3. Résultats et discussion

Les sesquiterpène lactones sont des composés naturels rencontrés chez plusieurs familles végétales, et plus précisément chez les Asteraceae, les principales exigences pour l'expression de leurs activités biologiques sont :

- La présence d'un méthylène exocyclique conjugué à un γ -lactone.
- La présence d'un groupe fonctionnel : hydroxyle, époxyde ou encore un acétyle adjacents au α -CH₂ qui peut augmenter l'activité du lactone envers les nucléophiles [18].
- La présence de groupe α -/ β - carbonyle qui induit l'alkylation des nucléophiles comme la cystéine et le glutathione [19] et des systèmes qui contiennent des groupes sulfhydryles [des enzymes etc] [20,21]. La réaction est de type Michael sur le centre d'alkylation de la lactone.

En tenant compte des résultats microbiologiques obtenus au paravant, nous avons focalisé notre étude chimiométrique dans la ritualisation des propriétés pharmaco-cinétiques des sesquiterpènes lactones avec une projection des modèles précalculés : l'absorption des cellules Caco-2, la perméabilité BHE, ainsi que la solubilité thermodynamique.

Nous avons étudié le profile de la bio viabilité des 10 sesquiterpènes lactones isolées de *C. pullata*, ces substances (Figure 1) appartiennent aux groupes des germacronolides, élémanolides et des eudesmanolides de type α -méthyl γ -lactone.

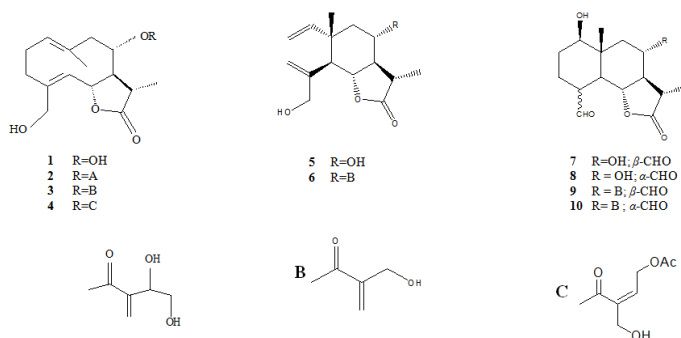


Fig. 1. Structures des substances isolées de *C. pullata*.

L'étude a été réalisée à l'aide du logiciel Silicon Graphics O2 R12000 270 MHz ; les molécules ont été dessinées à l'aide du programme Sybyl 6.7 et la minimisation de leur énergie a été effectuée par la méthode Powell.

Les trois sondes qui ont été utilisées pour l'évaluation des paramètres, étaient les suivants : H₂O, DRY et O pour chacune des substances isolées. Aux Figures 2 et 3, sont présentées, comme exemple, les régions hydrophiles et hydrophobes de la substance 4, respectivement.

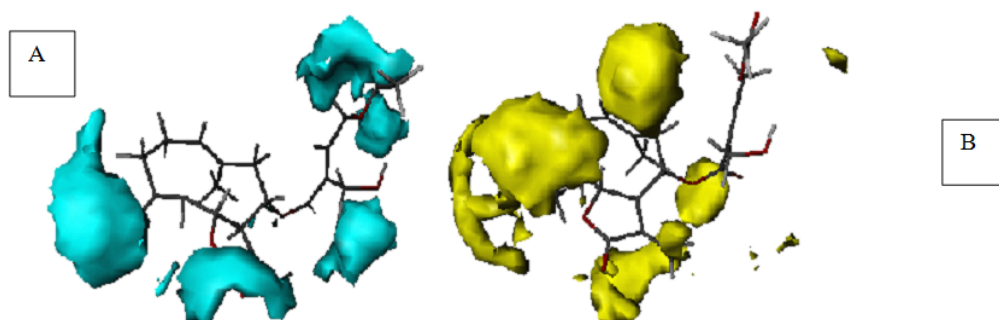


Fig. 2. Régions hydrophiles du composé 4 (Calcul du champ moléculaire 3D avec la sonde H₂O). A : interactions attractives de la molécule avec le probe H₂O à : -3.0 Kcal/mole. B : interactions expulsives de la molécule avec le probe H₂O à + 0.2 Kcal/mole.

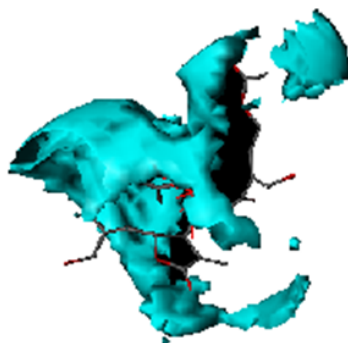


Fig. 3. Région hydrophobe du composé 4 à : -3.0 Kcal/mole (Calcul du champ moléculaire 3D avec la sonde DRY)

Les projections des composés 1-10 dans les différents modèles précalculés Volsurf sont présentés dans les Figures 4 à 7. Les substances sont présentées en couleur jaune et l'antibiotique en couleur verte.

3.1. Modèle de perméabilité des cellules de la lignée Caco-2

Lors de la fabrication de nouveaux médicaments, l'administration par voie orale reste la plus privilégiée à cause de sa convenance et sa meilleure conformité [22]. Pour qu'une substance soit développée en un médicament, qui s'administre par voie orale, elle doit avoir en plus d'un potentiel pharmacologique important, une structure adéquate pour sa perméabilité par les membranes intestinales.

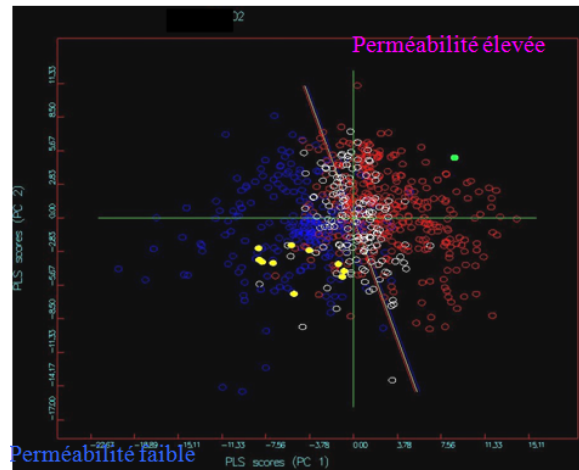


Fig. 4. Projection des substances sur le modèle des cellules Caco-2 (absorption passive).

in vitro des médicaments chez l'homme [23].

L'analyse partielle des grilles (Partial Least Squares, PLS) a été utilisée pour faire le modèle statistique, qui se réfère à la diffusion passive des substances. Les points rouges correspondent à une perméabilité élevée ($P_{app} > 8 \cdot 10^{-6}$ cm/s, score +1) et les points bleus correspondent à une perméabilité faible ($P_{app} < 4 \cdot 10^{-6}$ cm/s, score -1). La prédiction à la région centrale où il y a des points rouges et bleus est moins fiable. ($4 \cdot 10^{-6} < P_{app} < 8 \cdot 10^{-6}$ cm/s, score 0). P_{app} : permeation.

3.2. Modèle d'affinité aux plasma-protéines (protein binding model)

La prédiction de l'affinité au sérum albumine humaine (SAH) est très utile lors de la phase initiale de la découverte des médicaments, car certaines protéines plasmatiques (comme l'albumine) jouent un rôle dans la fixation des médicaments en se liant avec les substances et les rendant inertes.

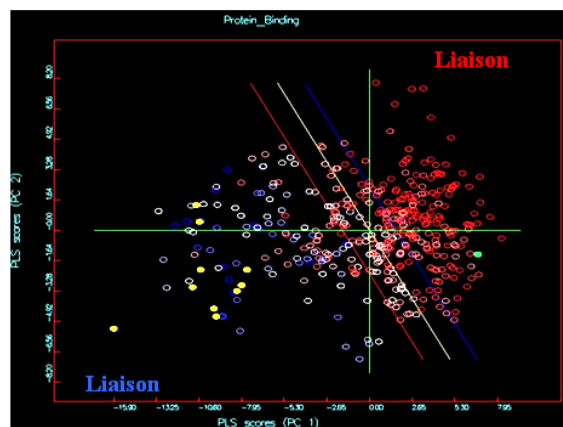


Fig. 5. Projection des substances sur le modèle de l'affinité plasma-protéines (liaison aux protéines).

La prédiction de l'affinité des substances à la sérum albumine humaine (SAH) est très utile lors de la phase initiale de la découverte des médicaments, parce que la sérum albumine humaine en se reliant avec les substances les rend inertes.

L'analyse partielle des grilles (Partial Least Squares, PLS) a été utilisée pour faire le modèle statistique. Ce modèle distingue les substances qui se lient aux protéines fortement (entre 90% et 100%), faiblement (dès 10% à 50%).

Points rouges : liaison forte, Points bleus : liaison faible.

3.3. Modèle de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

La barrière hémato-encéphalique (BHE) joue un rôle prépondérant dans la protection du cerveau. Une augmentation de sa perméabilité peut avoir des conséquences néfastes pour les cellules nerveuses. La barrière hémato-encéphalique (BHE), aussi appelée barrière sang-cerveau, est une «membrane» séparant les vaisseaux sanguins (capillaires, essentiellement) des neurones cérébraux [cellules nerveuses]. La BHE existe dans presque toutes les régions du cerveau. Elle a comme particularité d'être quasi imperméable aux différentes molécules et substances circulant dans l'organisme. Une altération de la BHE par augmentation de sa perméabilité est susceptible de laisser passer au niveau des cellules nerveuses des substances telle l'albumine, les ions, les métaux, les substances chimiques, les virus [24].

Pour le modèle statistique, l'analyse PLS a été utilisée. Elle se réfère à une perméabilité passive de la barrière hémato-encéphalique.

Les points rouges correspondent aux substances, qui peuvent passer la BHE (BB score + 1), tandis que les points bleus correspondent aux substances qui ne peuvent passer le BHE ($BB \pm score$ 0); les point blancs représentent une perméabilité modérée des substances (BB- score -1).

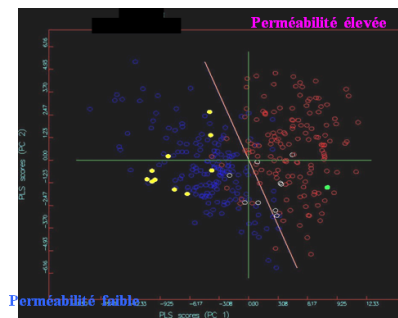


Fig. 6. Projection des substances sur le modèle de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.

3.4. Modèle de la solubilité thermodynamique (Soly)

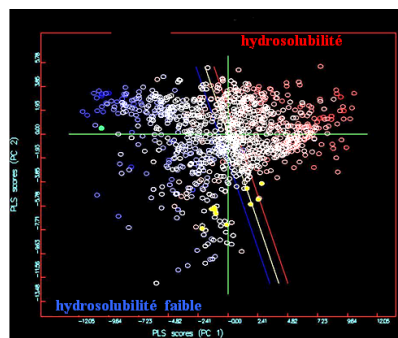


Fig. 7. Projection des substances sur le modèle de la solubilité thermodynamique.

La solubilité d'une substance est une propriété physico-chimique qui détermine son absorption per os (voie orale).

L'analyse PLS a été utilisée pour corrélérer les structures chimiques et la hydrosolubilité (l'affinité pour l'eau).

Par la projection des substances sur le modèle de la solubilité, il est évident qu'il y a une différenciation entre faible/modérée/forte/très forte hydrosolubilité (à partir de la région bleue vers la région rouge). Les valeurs de solubilité sont exprimées a : $-\log[\text{Soly}]$, où Soly correspond à des unités mol/l à 25°C.

4. Conclusion

Nous pouvons conclure que bien que les substances 1-10 possèdent une activité antimicrobienne (bactéricide & fongicide) meilleure que celles des contrôles (antibiotiques de commerce), il a été prédit qu'ils ne peuvent pas être transporté par les cellules intestinales épithéliales, ils ont une faible affinité avec le plasma-protéine, ils ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ils sont faiblement solubles dans l'eau.

Selon les résultats, ces composés n'ont pas un profil pharmacocinétique optimale, leur faible perméabilité et leur solubilité limitée suggèrent que leur administration par voie orale ne peut être efficace. Une application locale pourrait avoir des bons résultats.

Par contre, la faible pénétration par la BHE suggère une faible toxicité au système nerveux central.

Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Koukoulitsa [12] effectuée sur des sesquiterpène lactones similaires, isolées par d'autres espèces de centaurees grecques.

Il faut noter que les sesquiterpènes lactones isolées de *C. pullata* ne portent pas à leur anneau lactonique un méthylène exocyclique, alors sont de type α -methyl γ -lactones (Fig. 2), tandis que toutes les sesquiterpène lactones isolées des centaurees grecques sont de type α -méthylène γ -lactones. Par comparaison des résultats présents avec les résultats antérieurs de Koukoulitsa [12], il semble que l'absence de la double liaison exocyclique peu différencie les paramètres pharmacocinétiques et par conséquence leur comportement biologique.

REFERENCES

- [1] K. U. Bindseil, J. Jakupovic, D. Wolf, J. Lavayre, J. Leboul, Pyl D. Van Der, *Pure compound libraries : a new perspective for natural product based*, Drug Discov Today. 6, 840-847, 2001.
- [2] M. L. Lee, G. Schneider, *Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs : application in the design of natural product product-based combinatorial libraries*, J. Comb. Chem. 3, 284-489, 2001.
- [3] T. Kennedy, *Managing the drug discovery/development interface*, Drug Discov. Today. 2, 10, 436-444, 1997.
- [4] R. A. Prentis, Y. Lis, S. R. Walker, *Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical compagnies*, Br. J. Clin. Pharmacol. 25, 3, 387-396, 1998.
- [5] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug delivery Rev.* 23, 3, 1997.
- [6] S. Ekins, C. L. Waller, P. W. Swaan, G. Cruciani, S. A. Wrighton, J. H. Wikel, *Progress*

- in predicting human ADME parameters in silico*. J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 44, 251-272, 2000.
- [7] H. Van De Waterbeemd, G. Camenisch, G. Folkers, O. A. Raevsky, *Estimation of Caco-2 cell permeability using calculated molecular descriptors*. Quant. Struct.-Act. Relat., 15, 480-490, 1996.
- [8] P. Crivori, G. Cruciani, P. A. Carrupt, B. Testa, *Predicting blood-brain barrier permeation from three-dimensional molecular structure*. J. Med. Chem. 43, 2204-2216, 2000.
- [9] G. Cruciani, M. Pastor, W. Guba, *A new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds*. European J. Pharm. Sci. 11(Suppl 2), S29-S39, 2000a.
- [10] G. Cruciani, P. Crivori, P. A. Carrupt, B. Testa, *Molecular fields in quantitative structure-permeation relationships : The VolSurf approach*, J. Mol. Struct. (Theochem) 503, 17-30, 2000b.
- [11] X. Hu, *In silico modelling of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors with cellular activity*, Bioorg & Med. Chem. Lett. 16, 6321-6327, 2006.
- [12] E. Koukoulitsa, G. D. Geromichalos, H. Skaltsa, *Volserf analysis of pharmacokinetic properties for several antifungal sesquiterpene lactones isolated from Greek Centaurea sp*, J. Comput-Aid Molec. Desig. 45-51, 2005.
- [13] I. R. A. Menezes, J. C. D. Lopez, C. A. Montanari, G. Olivia, F. S. Marcelo, P. C. Vieira, M. T. Pupo, *3D QSAR studies on binding affinities of coumarin natural product for glycosomal GAPDH of Trypanosoma cruzi*, J. Comp-Aided Molecu Desig. 17, 277-290, 2003.
- [14] S. Djeddi, A. Karioti, M. Sokovic, C. Koukoulitsa, H. Skaltsa, *A novel sesquiterpene lactone from Centaurea pullata : Structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties*, Bioorganic & Medicinal Chemistry. 16 :7, 3725-3731, 2008.
- [15] P. J. Goodford, *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules*, J. Med. Chem., 28, 849-857, 1985.
- [16] G. Cruciani, M. Meniconi, E. Carosati, I. Zamora, R. Mannhold, In Watterbeemd H., Lemnernas H. and Artursson P. (Eds.) *Volsurf : A tool for a drug ADME properties prediction*, WILEY-VCH, Weinheim, Germany, 406-419, 2003.
- [17] J. G. Vinter, A. Davis, M. R. Saunders, *Strategic approaches to drug design. I. An integrated software framework for molecular modelling*, J. Comput Aided Mol. Des. 1, 1, 31-51, 1987.
- [18] E. Rodriguez, G. H. N. Towers, J. C. Mitchell, *Review biological activities of sesquiterpene lactones*, Phytochemistry. 15, 1573-1580, 1976.
- [19] S. M. Kupchan, N. Y. Trans, Acad. Scien. 32, 85, 1970 .
- [20] R. L. Hanson, H. A. Lardy, S. M. Kupchan, *Inhibition of phosphofructokinase by quinone methide and alpha-methylene lactone tumor inhibitors*, Science. 168, 929, 378-380, 1970.
- [21] C. H. Smith, J. Lancer, A. M. Thomas, S. M. Kupchan, *Inactivation of glycogen synthetase by the tumor inhibitor vernolepin*, Biophys. Biochim.Acta. 276, 94-104, 1972.
- [22] L. Zhang, V. Balimne, S. R. Jonson, S. Chong, *Developpement of an in silico model for*

- prediction efflux substrates in Caco-2 cells*, International Journal of Pharmaceutique, 2007.
- [23] M. Wessel, P. Jurs, J. Tolan, S. Muskal, *Prediscition of humain intestinal absorption of drug compounds*, J. Chem. Inf. Comput. Sci., 38, 726-735, 1998.
- [24] R. S. Quock, *Microwave facilitation of domperidone antagonism of apomorphine-induced stereotypic climbing in mice*, Bioelectromagnetics. 8, 45-55, 1987.