

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM
كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de BIOLOGIE



MÉMOIRE

Présenté par

YOUCEF TANI Abdelhafid

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Sciences Biologique

Option : *Biologie Moléculaire et Cellulaire*

Thème

Inhibition de la métalloprotéinase MT1-MMP pour la restriction de la croissance foetale

Soutenu devant le jury composé de :

| | | | |
|------------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Président | Mr CHERRAK Ahmed Sabri | MCA | Université de Tlemcen |
| Encadrant | Mme DALI YOUCEF SAHI Majda | Professeur | Université de Tlemcen |
| Examineur | Mme DJELTI Farah | MCB | Université De Tlemcen |

Année universitaire 2022/2023

ركزت دراستنا على تثبيط MT1-MMPs بهدف تقييد نمو الجنين لمقاطعة نمو الحمل. بهذا المعنى ، شرعنا في دراسة التأثيرات المثبطة للبنى التحتية للجزيء NSC405020 على مجال HPX لـ MT1-MMP باستخدام تقنيات السيليكو ، ولا سيما الالتحام الجزيئي ، تمكنا من تحديد الجزيء CID 43232702 باعتباره الجزيء الذي يتمتع بأفضل خصائص الحرائك الدوائية وأفضل طاقة ربط (-7.3 كيلو كالوري / مول) بين 787 بنية فرعية للجزيء NSC405020 وبالتالي ، يمكن تقديم هذا الجزيء كحل لمنع الحمل في حالات الحمل غير المرغوب فيه.

الكلمات الرئيسية: تقييد نمو الجنين ، MT1-MMP ، الالتحام الجزيئي.

Résumé

Notre étude s'est concentrée sur l'inhibition d des MT1-MMP avec comme finalité la restriction de la croissance fœtale pour interrompre le développement gestatif. Dans ce sens nous avons procédé à étudier les effets inhibiteurs des sous structures de la molécules NSC405020 sur le domaine HPX de la MT1-MMP.

En utilisant des techniques in silico notamment le docking moléculaire, nous avons pu identifier la molécule CID 43232702 comme celle présentant les meilleures propriété pharmacocinétique et la meilleure énergie de liaison (-7.3 kcal /mol) parmi 787 sous structure de la molécule NSC405020. En conséquent cette molécule peut être proposée solution contraceptive pour des cas de grossesses non désirées.

Mots clés : Restriction de la croissance fœtale , MT1-MMP , docking moléculaire.

Abstract

Our study focused on the inhibition of MT1-MMP with the aim of restricting fetal growth and interrupting gestational development. To this end, we studied the inhibitory effects of sub-structures of the NSC405020 molecule on the HPX domain of MT1-MMP.

Using in silico techniques, in particular molecular docking, we were able to identify the CID 43232702 molecule as having the best pharmacokinetic properties and the best binding energy (-7.3 kcal/mol) among 787 sub-structures of the NSC405020 molecule. This molecule can therefore be proposed as a contraceptive solution for cases of unwanted pregnancy.

Key words: Fetal growth restriction, MT1-MMP, molecular docking.

INTRODUCTION

La restriction de la croissance fœtale (RCF) est un état pathologique caractérisé par une croissance fœtale altérée qui est souvent associée à des complications pouvant être fatales. Cette pathologie survient entre 5 à 10 % des grossesses (Nardoza et al., 2017) et plusieurs facteurs génétiques (Abuzzahab et al., 2003) et ou environnementaux peuvent en être de cause.

Sur le plan clinique, l'étiologie peut être répartie entre causes fœtales, placentaires ou maternelles. Cependant, il est plus plausible de parler de chevauchement de causes dans le cas de la RCF. L'insuffisance placentaire semble être un facteur déterminant (Chaddha et al., 2004). Elle se traduit par un approvisionnement insuffisant du fœtus et, par conséquent, par une croissance fœtale insuffisante. Les répercussions pouvant être bilatérales, cette maladie présente aussi bien un réel risque de malformation congénitales ou même de mortinatalité pour le fœtus, que de pré éclampsie et de diabète gestationnel pour la mère.

Les Métalloprotéinases (MMP) sont des enzymes protéolytiques qui participent activement à la régulation de l'activité cellulaire en dégradant des composants clés de la matrice extracellulaire (MEC), tels que le collagène et la fibronectine (Visse & Nagase, 2003). Cette famille d'enzymes est ainsi impliquée dans la modulation de nombreux processus biologiques et cellulaire tels que l'embryogenèse et l'angiogenèse. Les MT-MMP sont caractérisées par un acide aminé hydrophobe à l'extrémité C-terminale qui peut pénétrer dans la membrane cellulaire et agir comme un domaine transmembranaire fixant les enzymes sur la membrane cellulaire (Bjørn et al., 2000). Leur structure est composée de plusieurs domaines fonctionnels, notamment un domaine catalytique pouvant cliver les liaisons peptidiques des substrats de la matrice extra cellulaire. Parmi les MMP on retrouve les Métalloprotéinase matriciel de type membranaire MT-MMP, qui sont des enzymes protéolytiques transmembranaires exprimée dans différentes cellules y compris les cellules trophoblastiques qui sont responsables de la formation du placenta et de la croissance fœtale.

La régulation de l'activité des MMP par les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases) est un mécanisme clé pour maintenir l'intégrité de la matrice extracellulaire. Les TIMP sont des protéines qui inhibent l'activité des MMP en se liant aux sites actifs de ces derniers ce qui empêche leur interaction avec les substrats de la MEC et donc empêche leur action protéolytique (Brew et al., 2000)

La MEC utérine humaine étant principalement constituée de collagène de types I et III, l'équilibre entre l'activité de dégradation des collagénases MT1- MMP, -13 et de leurs inhibiteurs tissulaires TIMP-1 et -2 est nécessaire (Ohuchi et al., 1997). Par conséquent, si le ratio MMP/TIMP est détérioré, le renouvellement du collagène de type I et III est altéré. Cela peut conduire à une réduction de la pression de perfusion sanguine utérine, à des anomalies vasculaires et à un remodelage anormal de la MEC utérine au niveau de l'interface materno-fœtale (Lim, 1997). Ces processus conduisent à un dépôt excessif de collagène, qui peut affecter le remodelage de l'artère spiralée utérine et constituer un facteur important

dans la pathogenèse de la pré-éclampsie et une restriction fœtale par la suite. Ces processus conduisent à un dépôt excessif de collagène, qui peut affecter le remodelage de l'artère spiralee utérine et constituer un facteur important dans la pathogenèse de la pré-éclampsie et une restriction fœtale par la suite.

L'invasion des trophoblastes au cours des premières semaines de grossesse détermine de façon cruciale l'issue et le succès de la grossesse, car une invasion peu profonde est associée à une perte de grossesse précoce, à une restriction de la croissance fœtale et à une pré-éclampsie (Kaufmann et al., 2003). Dans la présente étude, il a été démontré que les processus clés de la fonction du trophoblaste c'est-à-dire la migration, la prolifération et la fusion dépendent de l'activité MT1-MMP (Hiden et al., 2013), ainsi une étude réalisée sur des cas de RCF a démontré une différence négative de concentration en MT1-MMP chez les placentas de cas de RCF par rapport aux placentas contrôles d'un âge gestationnel similaire (Hiden et al., 2013,)

Compte tenu de son importance dans la migration cellulaire et la croissance tumorale, de nombreuses tentatives ont été menées pour mettre au point des inhibiteurs sélectifs de la MT1-MMP (Cathcart & Cao, 2015). Néanmoins il est particulièrement délicat d'obtenir la spécificité requise avec des inhibiteurs de petit poids moléculaire et, jusqu'à présent, les progrès ont été limités en raison de la grande homologie du domaine catalytique des membres de la famille des MMP.

Une variante de la stratégie d'inhibition de la MT1-MMP pourrait porter sur le domaine de l'hémopexine (HPX), qui est moins conservé parmi les MMP que le site catalytique et qui s'est révélé indispensable à l'homodimérisation de la MT1-MMP (Tochowicz et al., 2011).

Plusieurs études réalisées *in vitro* et sur des modèles animaux ont présenté des résultats concluants et on pu établir que les molécules qui se lient au domaine HPX et qui préviennent la dimerisation diminuent de manière significative la taille des tumeurs et inhibent l'invasion cellulaire médiée par les MMP (Zarrabi et al., 2011) (Remacle et al., 2012).

Une étude a proposé une petite molécule (NSC405020) ciblant le domaine HPX de la MT1-MMP, et son effet anti-tumorale s'est révélé efficace suite à des démonstrations *in vivo* (Remacle et al., 2012).

La perspective de notre recherche réside à étudier les sous structures de cette molécule pouvant éventuellement inhiber le domaine HPX de la MT1-MMP .

MATERIEL ET METHODE

La structure tridimensionnelle de la MT1-MMP a été récupérée à partir de bases de données Protein Data Bank (PDB) (identifiant PDB: 3C7X), et ne présentait aucune mutation ni partie non résolue.

La protéine a été ensuite préparée en utilisant le logiciel UCSF Chiméra. Ainsi les résidus non standards et les molécules d'eau sont éliminés. Une autre fonctionnalité DockPrep a servi à ajouter des

atomes d'hydrogène et des charges a la structure de notre protéine, ceci sert à la préparer au screening moléculaire.

Des ligands potentiels ciblant le domaine de l'hémopexine de la MT1-MMP ont également été identifiés à partir de la base de données PUBCHEM en effectuant une recherche par similarité de structure a une molécule qui a prouvé son efficacité quant à l'inhibition du domaine HPX de la MT1-MMP par l'équipe de Remacle (2012) et qui enregistré dans la base de données PUBCHEM sous l'identifiant (CID : 346721). Une liste de 787 sous structure de cette molécule a été préparé en filtrant les résultats de la recherche primaire (masse molaire <450 G/MOL ; complexity <400 ; XLogP <5) et téléchargé sous format sdf. Ces molécules ont été ensuite traitées par l'outil Open Babel afin de minimiser leurs énergies et les enregistrer sous format pdbqt pour les préparé à l'éventuel screening.

Le criblage a été réalisé sur le programme PyRx ou la structure cristallisée de la protéine MT1-MMP a été mise en interaction avec les 787 molécules préparées au préalable, ceci pour désigner les molécules s'impliquant dans des interactions avec notre protéine d'intérêt. Les résultats ont été ensuite ordonnés selon leurs énergies de liaison et leurs RMSD. Les ligands avec les 9 meilleures énergies de liaisons ont été dockés par le logiciel Chimera.

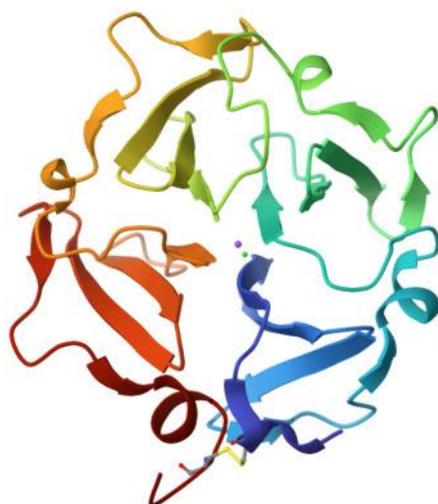


Figure 1 Structure cristallographique du domaine HPX de la MT1-MMP (PDB : 3C7X).

RESULTATS

Après une première étape de criblage par le logiciel PyRx ou 787 molécules ont été filtré au préalable et ont été mis en contact avec la structure du domaine HPX (id PDB : 3C7X), les résultats vont être englobé dans un tableau présentant les énergies de liaisons (ΔG) et les RMSD de chaque pose. Ensuite les ligands présentant les 9 meilleures ΔG ont subi individuellement une seconde étape de docking moléculaire sur le logiciel Chimera, et les résultats de cette étape sont résumés dans le **tableau 1**.

Tableau 1 résultats docking sur chimera des 9 ligands présentant les meilleurs ΔG

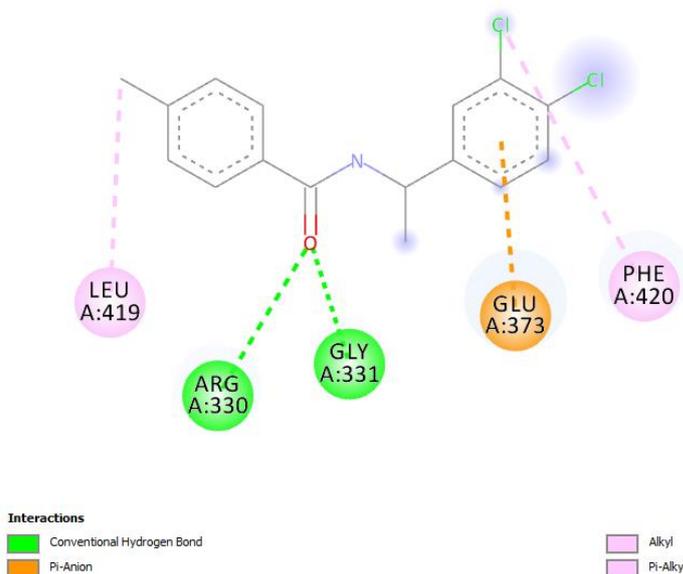
| Ligands | Formule | Poids moleculaire (g/mol) | ΔG (-kcal /mol) |
|----------|--|---------------------------|-------------------------|
| 24396680 | C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ NO | 308,2 | -7,3 |
| 43232702 | C ₁₆ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O | 323,2 | -7,3 |
| 68847354 | C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ NO | 308,2 | -7,3 |
| 896323 | C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ FNO | 298,1 | -7 |
| 57571683 | C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ FNO | 312,2 | -6,8 |
| 828500 | C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ FNO | 312,2 | -6,6 |
| 346735 | C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ NO | 280,1 | -6,4 |
| 45739028 | C ₁₅ H ₁₃ Cl ₂ NO | 294,2 | -6,4 |
| 346721 | C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO | 260,16 | -5,1 |

Les résultats du docking par Chimera présentent les molécules **CID24396980** et **CID43232702** comme ayant les meilleures énergies de liaisons (-7,3 kcal /mol) . Les liaisons établies entre les différents ligands et la protéine ont été étudié à travers le logiciel Biovia Discovery. Les ligands qui ont démontrés les meilleures énergies de liaison après le passage par le logiciel Chimera ont été choisis pour cette étude. Les diagrammes A, B, C, D, E de la **figure 2** démontrent par des diagrammes 2D les différentes types d'interactions entre le domaine HPX et les ligands.

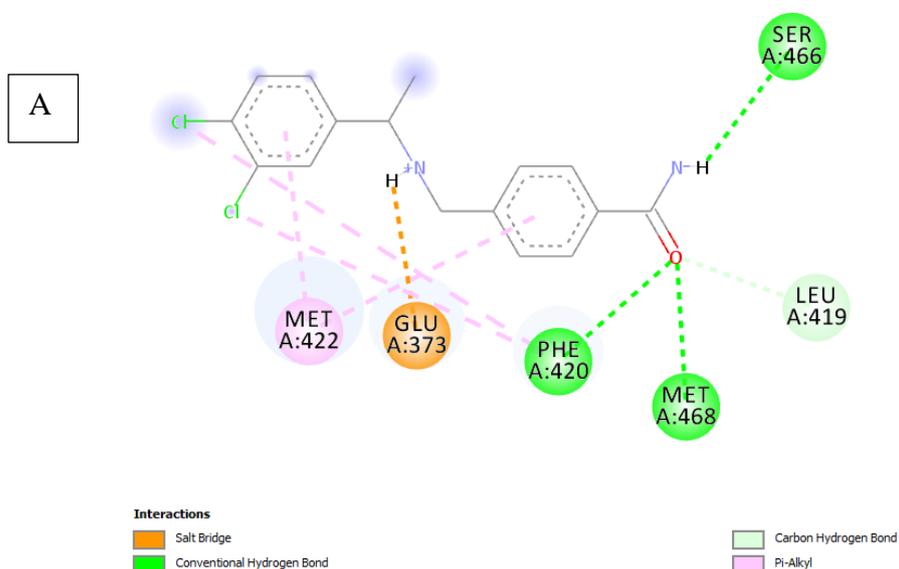
Pour CID24396980 on remarque la présence de deux liaisons hydrogènes (ARG 330 ; GLY 331) dont une avec un acide aminée (ARG330) qui est documenté comme interagissant notre molécule initiale (Remacle et al., 2012), ainsi que des liaisons hydrophobique Pi-anion, alkyle et Pi-alkyle avec différents acides aminés de la protéine. La molécules CID43232702 a son tour établie 3 liaisons hydrogène (Phe430 ; Met468 ; Ser466 ; Leu419), 2 liaisons Pi-alkyl dont une avec l'acide aminé Met422 reconnu

comme faisant partie HPX (Remacle et al., nous indiquent que **CID24396980** et présentent de bien liaisons avec le à la molécule initiale Kcal /mol).

effectuées entre le ligands ont été **tableau 2.**

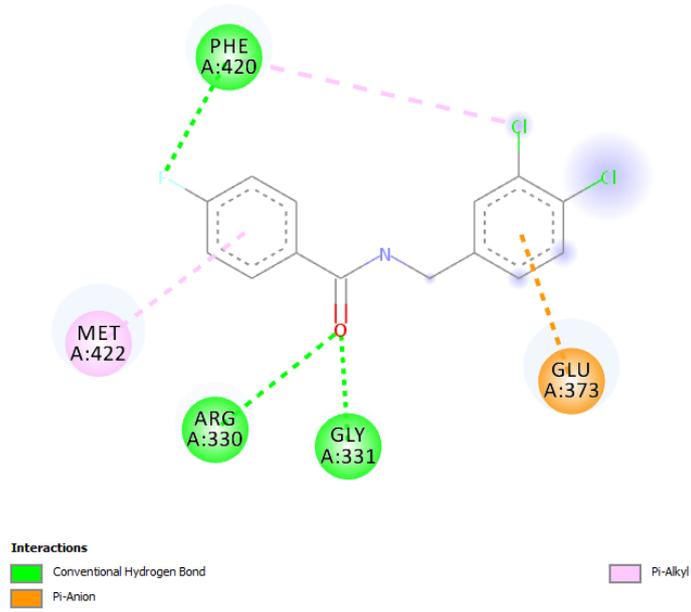


du site actif du domaine (Remacle et al., 2012). Ces résultats les deux molécules **CID43232702** meilleures énergies de domaine HPX comparé **CID346721** (-5,1 L'ensemble des liaisons domaine HPX et les résumées dans le

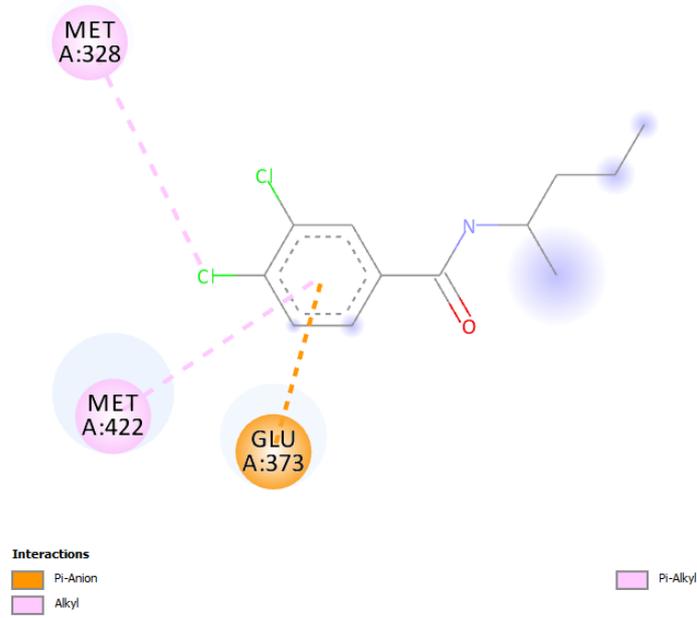


B

C



D



E

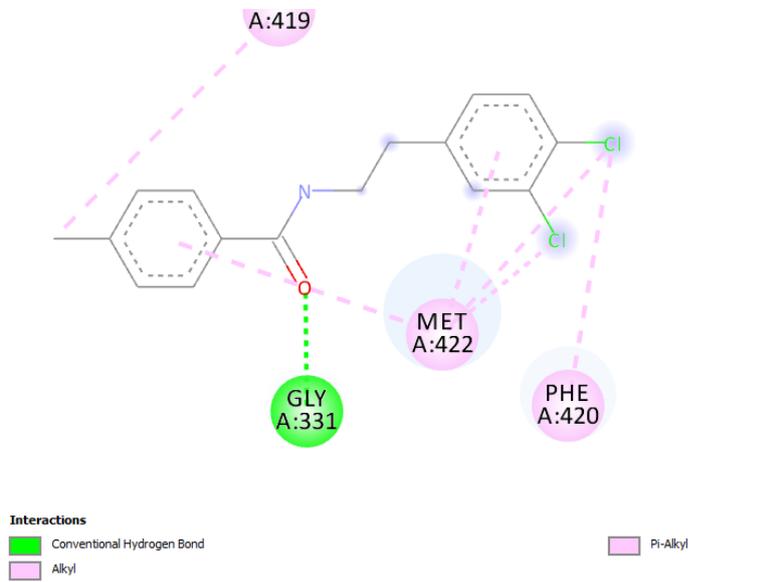


Figure 2 Diagrammes 2D d'interaction entre les différents ligands et le domaine HPX 24396680 (A) , 43232702 (B) , 68847354 (C) , 896323 (D) , 346721 (E)

Table 2 interactions entre ligands avec les meilleures energies de liaisons et la PROT

| Composés | Types liaisons | Acide aminés |
|-----------------|----------------------------|--------------------------|
| CID 24396980 | Conventional Hydrogen Bond | Arg330 ; Gly331 |
| | Pi-Anion | Glu 373 |
| | Alkyl | Leu419 |
| | Pi-Alkyl | Phe420 |
| CID 43232702 | Salt Bridge | Glu373 |
| | Conventional Hydrogen Bond | Phe430 ; Met468 ; Ser466 |
| | Carbon Hydrogen Bond | Leu419 |
| | Pi-Alkyl | Phe420 ; Met422 |
| CID 68847354 | Conventional Hydrogen Bond | Gly 331 |
| | Alkyl | Met422 ; Leu419 |

| | | |
|------------|----------------------------|--------------------------|
| | Pi-Alkyl | Phe420 ; Met422 |
| CID 896323 | Conventional Hydrogen Bond | Arg330 ; Gly331 ; Phe420 |
| | Pi-Anion | Glu373 |
| | Pi-Alkyl | Phe420 ; Met422 |
| CID 346721 | Pi-Anion | Glu 373 |
| | Alkyl | Met328 |
| | Pi-Alkyl | Met422 |

Les profils pharmacocinétiques des 4 ligands sont exposés dans le tableau 3

Table 3 propriétés ADME des analogues présentant les meilleures ΔG .

| Molécules | ΔG | LogP | mw | Csp3 | Ws | TPSA | NROTB |
|-----------|------------|------|--------|------|-------|-------|-------|
| 24396980 | -7,3 | 4,71 | 308,20 | 0,19 | -4,90 | 29,10 | 4 |
| 43232702 | -7,3 | 3,32 | 323,22 | 0,19 | -4,03 | 55,12 | 5 |
| 68847354 | -7,3 | 4,78 | 308,20 | 0,19 | -4,88 | 29,10 | 5 |
| 896323 | -7,0 | 7,05 | 298,14 | 0,07 | -4,44 | 29,10 | 4 |
| 346721 | -5,1 | 4,89 | 260,16 | 0,42 | -4,48 | 29,10 | 5 |

MW : Molecular weight ; Csp3 : Fraction Csp3 ; Ws : Waer solubility ; TPSA : Topological Polar Surface Area ; NROTB : Number of rotatable bonds ; LogP : Log(C_{oct}/C_{eau})

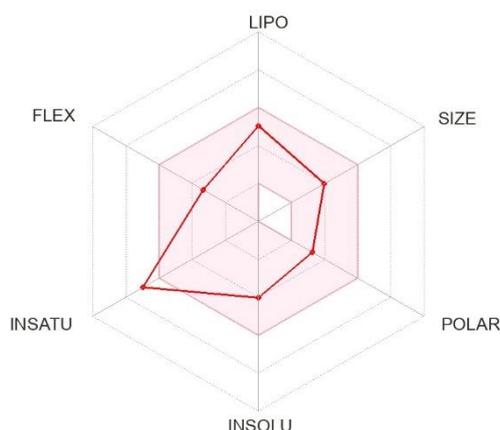
Toutes la molécule présente des valeurs pharmacocinétiques semblables et donc des profils pharmacologiques quasiment identiques. Néanmoins on remarque des valeurs éloignées de la moyenne acceptée pour la 4eme molécule (CID : 896323) (LogP 7.05 >5), (Csp3 0.07 <0.25). La deuxième molécule (CID : 43232702) est prédite comme présentant le meilleur profil pharmacocinétique, et par la suite démontre le plus de chances pour être commercialisée dans le marché. La **figure 3** illustre un ensemble de caractéristiques de la molécule CID 43232702.

CONCLUSION

*Figure 3 diagramme de biodisponibilité de la molécule
CID43232702*

Dans le but d'établir une contraception moléculaire en provoquant une restriction du développement fœtale par l'inhibition de la MT1-MMP et à travers une série de simulations moléculaires, nous avons évalué l'affinité de 787 molécules vis-à-vis de la MT1-MMP.

La molécule CID 43232702 présente des résultats intéressants tant au niveau pharmacocinétique de par sa grande solubilité et polarité, qu'au nombre de liaisons établies avec le domaine hemopexine de la MT1-MMP. ces résultats nous permettent de prédire l'efficacité d'une éventuelle utilisation de cette molécule pour induire une restriction de la croissance fœtale. Des recherches supplémentaires pourraient valider nos résultats et évaluer la possibilité d'une utilisation plus répandue de cette méthode de contraception.



REFERENCES

- Abuzzahab, M. J., Schneider, A., Goddard, A., Grigorescu, F., Lautier, C., Keller, E., Kiess, W., Klammt, J., Kratzsch, J., Osgood, D., Pfäffle, R., Raile, K., Seidel, B., Smith, R. J., & Chernausek, S. D. (2003). IGF-I Receptor Mutations Resulting in Intrauterine and Postnatal Growth Retardation. *New England Journal of Medicine*, 349(23), 2211–2222. <https://doi.org/10.1056/nejmoa010107>
- Bjørn, S. F., Hastrup, N., Larsen, J. F., Lund, L. R., & Pyke, C. (2000). Messenger RNA for Membrane-type 2 Matrix Metalloproteinase, MT2-MMP, is Expressed in Human Placenta of First Trimester. *Placenta*, 21(2-3), 170–176. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0447>
- Brew, K., Dinakarandian, D., & Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases : evolution, structure and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1-2), 267–283. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(99\)00279-4](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(99)00279-4)
- Cathcart, J., & Cao, J. (2015). MMP Inhibitors Past present and future. *Frontiers in Bioscience*, 20(7), 1164-1178. <https://doi.org/10.2741/4365>
- Chaddha, V., Viero, S., Huppertz, B., & Kingdom, J. (2004). Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 9(5), 357–369. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2004.03.006>

- Hiden, U., Ghaffari-Tabrizi, N., Gauster, M., Tam-Amersdorfer, C., Cetin, I., Dieber-Rotheneder, M., Lang, U., & Desoye, G. (2013). Membrane-Type Matrix Metalloproteinase 1 Regulates Trophoblast Functions and Is Reduced in Fetal Growth Restriction. *The American Journal of Pathology*, 182(5), 1563–1571. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.011>
- Holmbeck, K., Bianco, P., Caterina, J., Yamada, S., Kromer, M., Kuznetsov, S. A., Mankani, M., Gehron Robey, P., Poole, A. R., Pidoux, I., Ward, J. M., & Birkedal-Hansen, H. (1999). MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate Collagen Turnover. *Cell*, 99(1), 81–92. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80064-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80064-1)
- Kaufmann, P., Black, S., & Huppertz, B. (2003). Endovascular Trophoblast Invasion : Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction*, 69(1), 1–7. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014977>
- Lim, K. H. (1997). Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. *PubMed Central (PMC)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1858365/>
- MURPHY, G., & NAGASE, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), 290–308. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.002>
- Nardoza, L. M. M., Caetano, A. C. R., Zamarian, A. C. P., Mazzola, J. B., Silva, C. P., Marçal, V. M. G., Lobo, T. F., Peixoto, A. B., & Araujo Júnior, E. (2017). Fetal growth restriction : current knowledge. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 295(5), 1061–1077. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4341-9>
- Ohuchi, E., Imai, K., Fujii, Y., Sato, H., Seiki, M., & Okada, Y. (1997). Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Digests Interstitial Collagens and Other Extracellular Matrix Macromolecules. *Journal of Biological Chemistry*, 272(4), 2446–2451. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.4.2446>
- Remacle, A. G., Golubkov, V. S., Shiryaev, S. A., Dahl, R., Stebbins, J. L., Chernov, A. V., Cheltsov, A., Pellicchia, M., & Strongin, A. Y. (2012). Novel MT1-MMP Small-Molecule Inhibitors Based on Insights into Hemopexin Domain Function in Tumor Growth. *Cancer Research*, 72(9), 2339-2349. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-11-4149>
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circulation Research*, 92(8), 827–839. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000070112.80711.3d>
- Will, H., Atkinson, S. J., Butler, G. S., Smith, B., & Murphy, G. (1996). The Soluble Catalytic Domain of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Cleaves the Propeptide of Progelatinase A and Initiates Autoproteolytic Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17119–17123. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.29.17119>

- Zarrabi, K., Dufour, A., Li, J., Kuscü, C., Pulkoski-Gross, A., Zhi, J., Huang, J., Sampson, N. S., Zucker, S., & Cao, J. (2011). Inhibition of Matrix Metalloproteinase 14 (MMP-14)-mediated Cancer Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33167-33177. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.256644>